



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Efeito Neuroprotetor do Transplante de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Dente Decíduo Humano em Ratos Wistar Submetidos à Lesão Medular

Fabício do Couto Nicola

PORTO ALEGRE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Efeito Neuroprotetor do Transplante de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Dente Decíduo Humano em Ratos Wistar Submetidos à Lesão Medular

Fabício do Couto Nicola

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Neurociências

PORTO ALEGRE

2017

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas uma alma humana. ”

Carl Gustav Jung

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Carlos Alexandre Netto por ter-me aceitado como aluno; pela dedicação irrestrita, apoio e respeito, proporcionando todos os meios para o amadurecimento científico. Por acreditar no potencial e se esforçar para que os seus alunos atinjam os seus objetivos.

À professora Patricia Pranke, pela oportunidade de trabalhar com as células-tronco derivadas do dente. Sempre muito presente e solícita, deu especial atenção a este trabalho.

À professora Carla Dalmaz, pelas valiosas e “profundas” opiniões sobre o conteúdo textual.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Gonçalves e ao laboratório LabS100, que contribuíram com a técnica de ELISA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências pela oportunidade de estudo.

Aos professores do PPG em Neurociências, por serem exemplos de neurocientistas.

Aos colegas de laboratório, em especial à Marília Marques, Felipe Odorcyk, Eduardo Sanches, Danusa Arcego, Letícia Petenuzzo, Dirceu Aristimunha, Daniela Pereira, Natasha Maurmann pelas valiosas ajudas. Aos demais, agradeço pelo convívio.

Aos meus pais, Júlio Nicola e Dinora Nicola, pelo apoio e amor incondicional, por estar sempre ao meu lado.

À Saman Casagrande, meu amor, que me acompanha e incentiva. Sempre de bom humor. Pela paciência e compreensão da minha ausência, por fazer os meus dias mais leves e muito mais felizes.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à CAPES pela oportunidade e pela bolsa concedida durante o período.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Anatomia e fisiologia da medula espinal.....	3
1.2 Lesão medular.....	4
1.2.1 Resposta inflamatória e imunológica	8
1.2.2 Morte celular por apoptose	9
1.2.3 Modulação dos astrócitos e células precursoras neurais	10
1.3 Células-Tronco	11
1.3.1 Mecanismos de ação das células-tronco.....	13
1.3.2 Células-Tronco derivadas do dente decíduo humano (SHED).....	16
1.4 Justificativa.....	17
1.5 Hipótese de trabalho	17
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....	19
3.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais.....	19
3.2 Breve descrição dos materiais e métodos	20
3.2.1 Modelo de lesão medular traumática.....	21
3.2.2 Perfusão	22
3.2.3 Análise do Volume da Cavitação	23
3.3 Resultados.....	23
3.3.1 Avaliações biológicas.....	23
3.2 Capítulo I.....	25
3.3 Capítulo II.....	36
4. DISCUSSÃO	73
4.1 Déficits funcionais e volume da lesão	74
4.2 Morte neuronal e neuroproteção.....	74
4.3 Sistema imune – macrófagos/microglia e células T	77
4.4 Modulação do astrócito	78
4.5 Aumento do potencial das células progenitoras endógenas	79
4.6 Estudo do fenótipo das SHED na fase de cultura.....	80
5. CONCLUSÃO.....	82

6. PERSPECTIVAS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXOS	96
8.1 Carta de aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS).....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AQP4 – *Aquaporin-4*

BDNF – *Brain-derived growth factor*

BMSC – *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*

CSPGs – *Chondroitin sulphate proteoglycans*

CT – *Células-tronco*

CTM – *Célula-tronco mesenquimal*

DPSC – *Dental pulp stem cells*

GDNF – *Glial-derived neurotrophic factor*

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*

IGF – *Insulin-like growth factor*

IL – *Interleukin*

Kir 4.1 – *Inwardly rectifying potassium channel 4.1*

LM – *Lesão Medular*

ME – *Medula espinal*

NGF – *Nerve growth factor*

NMDA – *N-methyl-d-aspartate*

nNOS – *Neuronal nitric oxide synthase*

SHED – *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*

SNC – *Sistema nervoso central*

S100B – *Proteína ligante de cálcio*

TNF- α – *Tumor necrosis factor- α*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Anatomia da medula espinal.....	4
Figura 02 - Eventos patofisiológicos após a lesão medular – subdivisão da lesão secundária em fase aguda, subaguda e crônica.....	6
Figura 03 - Patofisiologia da lesão medular na fase aguda e fase crônica.....	7
Figura 04 - Representação esquemática dos eventos relacionados com a apoptose celular.....	10
Figura 05 - Desenho esquemático da auto-renovação e diferenciação de células-tronco.....	12
Figura 06 - Fotos ilustrativas do equipamento New York University impactor.....	20
Figura 07 – Infográfico dos principais resultados da presente tese	71

Capítulo I

Figura 01 – Experimental design of the three experiments.....	23
Figura 02 – Progress of hind limbs function after spinal cord contusion assessed through Basso, Beattie, and Bresnahan scale (BBB).....	24
Figura 03 – Morphologic analysis of spinal cord samples.....	25
Figura 04 – Flow cytometry of distinct cell types at six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after contusion in the spinal cord of control, SCI and SHED groups.....	26
Figura 05 – TNF- α expression at six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after contusion in the spinal cord of control, SCI and SHED groups.....	26
Figura 06 – Flow cytometry to measure apoptotic neurons at six hours in the spinal cord of control, SCI and SHED groups.....	27
Figura 07 – Western Blots analysis of different proteins assessed six hours after lesion in the spinal cord of control, SCI and SHED groups.....	27

Capítulo II

Figura 01 – Flow cytometry of vimentin+ cells at six, twenty-four and forty-eight hours after spinal cord lesion; Naive, SCI and SHED experimental groups.....	57
--	----

Figura 02 – ELISA of GFAP (A) and S100B (B) expression in Naive, SCI and SHED groups, run six, twenty-four and forty-eight hours after spinal cord lesion.....	57
Figura 03 – Western blot analysis of AQP 4 and Kir 4.1 run six hours after spinal cord injury; Naive, SCI and SHED experimental groups.....	58
Figura 04 – Representative immunostaining of β -III tubulin, GFAP, Vimentin and S100B of SHED in the culture phase.....	59
Figura 05 – Flow cytometry and Dot blot of SHED <i>in vitro</i> phase labeled with S100B.....	60

RESUMO

A lesão medular (LM) é uma patologia incapacitante que resulta em déficits sensoriais e motores. No Brasil, a incidência anual é de 30 novos casos de lesão medular a cada 1 milhão de indivíduos e, infelizmente, a LM permanece sem um tratamento eficaz. Células-tronco derivadas do dente decíduo humano estão entre as potenciais fontes de células-tronco para transplante após a lesão medular, cujo objetivo é de promover a proteção ou a recuperação da lesão na medula espinal. Buscou-se nesta tese avaliar os efeitos do transplante, uma hora após a lesão, das células tronco de dente decíduo humano (SHED) no período agudo, subagudo e crônico sobre a neuroproteção, proteção tecidual e recuperação funcional em ratos Wistar submetidos à lesão medular por contusão. Os principais objetivos foram: a) investigar os efeitos do transplante das SHED sobre a recuperação funcional, volume da lesão e morte neuronal; b) verificar os efeitos do transplante sobre as células progenitoras, formação da cicatriz glial e modificações astrocíticas após o modelo de contusão medular. Observou-se a melhora na recuperação funcional, redução do volume da lesão e morte neuronal na medula espinal dos animais que receberam o transplante de SHED após a lesão medular. As SHED aumentam o número de células precursoras na medula espinal, no período subagudo, reduzem a expressão da proteína fibrilar glial ácida (GFAP) e aumentam a expressão do canal retificador de influxo de potássio 4.1, ambas proteínas astrocíticas. Concluímos que o transplante de células-tronco derivadas do dente decíduo humano após a lesão medular promove a recuperação funcional a partir do efeito neuroprotetor iniciado na fase aguda, confirmado pelo maior número de neurônios motores presentes seis semanas após a contusão. As SHED são capazes de aumentar o número de células precursoras e de produzir modificações astrocíticas na medula espinal de ratos lesados na fase subaguda, reduzindo a formação da cicatriz glial.

Palavras-chave: Lesão medular, células-tronco mesenquimais, célula de dente humano, proteção tecidual, neuroproteção, morte celular, apoptose, astrogliose, cicatriz glial, células progenitoras, recuperação funcional.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) is a disabling condition that results in sensory and motor deficits. The estimated annual incidence in Brazil is of 30 new cases of spinal cord injury per 1 million of individuals; unfortunately SCI remains without an effective treatment. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) are one among potential sources of stem cells for transplantation after spinal cord injury in order to promote protection or tissue and functional recovery after spinal cord injury. The aim of this Thesis was to evaluate the effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) transplantation, one hour after lesion, in the acute, subacute and chronic phases on neuroprotection, tissue protection and functional recovery in Wistar rats submitted to spinal cord injury by contusion. The main goals were: a) to investigate the effects of SHED transplantation on functional recovery, lesion volume, and neuronal death; b) to verify the effects of the transplantation on the progenitor cells number, glial scar formation and astrocytic modifications after spinal cord contusion. Improvement of functional recovery, reduction of lesion volume and neuronal death were observed in the spinal cord of animals submitted to spinal cord injury and SHED transplantation. SHEDs increased the number of precursor cells in the spinal cord in the subacute period, reduced the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and increased the expression of the potassium influx rectifier channel 4.1, both astrocyte proteins. We conclude that transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth after spinal cord injury promotes functional recovery from the neuroprotection effect, which starts in the acute phase and is confirmed six weeks after the contusion with a higher number of motor neurons in the ventral horn of spinal cord. SHEDs are able to increase the number of precursor cells and produce astrocyte modifications in the spinal cord of injured rats in the subacute phase, reducing glial scar formation.

Key-words: Spinal cord injury, mesenchymal stem cell, dental pulp stem cell, tissue protection, neuroprotection, cell death, apoptosis, astrogliosis, glial scar, progenitor cells, functional recovery.

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é definida como dano à medula espinal que provoca mudanças na sua função de modo temporário ou permanente, podendo ser dividida, quanto à sua etiologia, em traumática e não traumática (Jia et al., 2013). A LM traumática ocorre com maior frequência, perfazendo cerca de 80 % dos casos (Shin et al., 2013), e acontece quando há um impacto físico externo decorrente, por exemplo, de acidentes automobilísticos, quedas, lesões relacionadas com a prática de esportes ou violência física que provoque uma lesão aguda na medula espinal. Já as lesões não traumáticas decorrem de um processo agudo ou crônico do desenvolvimento de patologias como tumores, infecção ou processos degenerativos dos discos intervertebrais (Ahuja et al., 2017).

O dano primário, ou lesão primária, compromete parte das células presentes no parênquima da medula espinal, e também inicia uma complexa cascata de vias metabólicas que caracterizam o processo de lesão secundária, as quais, de maneira cíclica, produzem morte de neurônios e células gliais (Casella et al., 2006; Nicola et al., 2017), isquemia, e inflamação (Pineau et al., 2010; Tator and Fehlings, 1991). Essa cascata é seguida de mudanças na citoarquitetura da medula espinal como a formação de cavidades císticas e cicatriz glial, o que prejudica o crescimento axonal e a remielinização, o que reduz o potencial de recuperação intrínseco da medula espinal e embasa os déficits neurológicos permanentes (Obermair et al., 2008; Oyinbo, 2011).

As últimas três décadas configuram um período excitante para o campo de estudo da lesão medular, uma vez que diversas terapias neuroprotetoras, tais como bloqueadores de cálcio, antagonistas do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA), anti-inflamatórios, hipotermia, bem como neuroregenerativas como o uso de enzimas que degradam o proteoglicano sulfato de condroitina (CSPGs), e o uso de células tronco, foram transportadas de estudos pré-clínicos para ensaios clínicos (Kim et al., 2017). No entanto, a lesão medular permanece sem tratamento efetivo e, sem dúvida, há muito ainda a aprender sobre a cascata patofisiológica da lesão medular para iluminar a busca por novas estratégias terapêuticas.

Uma importante estratégia de tratamento é o uso do transplante de células-tronco (CT), uma das possíveis abordagens capazes de promover a recuperação da lesão medular. As células-tronco embrionárias, células-tronco adultas, e as células pré-diferenciadas são fontes potenciais para o transplante, com o objetivo de minimizar a lesão, promovendo a recuperação dos tecidos

lesados e a função locomotora (Shende and Subedi, 2017). Já é sabido que após o transplante de células-tronco há a melhora na função motora em modelos animais (Nicola et al., 2016; Rodrigues et al., 2012; Sakai et al., 2012), porém, os mecanismos pelos quais ocorre tal recuperação ainda não são claros. Existem três modelos teóricos para explicar a recuperação da função neural e por consequência a função motora após o transplante de células-tronco: o primeiro é a diferenciação das células implantadas em células do tecido alvo, por exemplo, a diferenciação das células-tronco em neurônios; o segundo é a integração das células no tecido sem a diferenciação, promovendo a fusão celular, uma forma de expressar o mesmo fenótipo de células do tecido local e fornecer um suporte metabólico às células; e o terceiro é a liberação de fatores tróficos pelas células-tronco (Maltman et al., 2011). Sabe-se que as células-tronco mesenquimais são capazes de produzir e secretar uma variedade de citocinas, entre elas, citocinas pró- e anti-inflamatórias (Djouad et al., 2007), e também são capazes de induzir a produção e a liberação de fatores tróficos como o BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo), o IGF (fator de crescimento insulínico) e o NGF (fator de crescimento do nervo) (Nicaise et al., 2011), que podem favorecer o reestabelecimento das conexões axonais e, por consequência, a recuperação da função motora. Essas três teorias podem estar atuando de modo separado, células-tronco que apenas exercem efeito parácrino após o transplante, por exemplo; ou em conjunto.

Recentemente, as células de dente decíduo humano (SHED, do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) foram isoladas e caracterizadas (Gronthos et al., 2000), e o primeiro estudo com o transplante dessas células após a lesão medular em ratos foi realizado em 2011 (de Almeida et al., 2011). Acredita-se que essas células do dente humano se originem das cristas neurais e expressam tanto marcadores de células-tronco mesenquimais como de células-tronco neuronais (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003). O transplante de SHED é capaz de promover a recuperação funcional, reduzir a lesão na medula espinal, reduzir a cicatriz glial, aumentar a mielinização e o número de axônios (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Apesar das SHED serem superiores às células-tronco de medula óssea (BMSC do inglês *bone marrow stem cells*), em termos de expressão gênica para determinadas funções (Sakai et al., 2012), ainda se sabe muito pouco sobre os mecanismos que essas células desencadeiam após o transplante em uma medula lesionada.

Os efeitos das SHED são multifatoriais, sendo assim, é difícil atribuir à apenas um mecanismo a recuperação funcional. Para melhor apresentação dos dados de parte dos mecanismos produzidos pelo transplante de SHED após a lesão medular por contusão em ratos,

esta tese foi dividida em dois capítulos: o primeiro capítulo teve como objetivo reafirmar os achados prévios quanto à recuperação funcional e volume de lesão e avaliar os efeitos do transplante precoce das SHED sobre os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α , a morte por apoptose 6 horas após a lesão, na perda e migração/proliferação de neurônios, astrócitos, microglia e células T nos períodos de 6 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas após a lesão e sobre o número de neurônios motores no corno anterior da medula espinal 6 semanas após a contusão. O segundo capítulo teve como objetivo verificar a influencia do transplante das SHED sobre o número de células potencialmente progenitoras na medula espinal e sobre as alterações astrocitárias como modificações na produção de filamento intermediário GFAP (do termo em inglês: *Glial fibrillary acidic protein*), S100B (proteína ligante de cálcio), do canal de transporte de água (AQP 4) e canal retificador de potássio (Kir 4.1).

1.1 Anatomia e fisiologia da medula espinal

A medula espinal (ME) é organizada em substâncias branca e cinzenta. Na substância cinzenta se encontram os corpos das células neuronais enquanto que na substância branca encontramos os axônios dos neurônios. Existe uma subdivisão em tratos ascendentes e descendentes na substância branca, os quais são compostos por feixes de axônios que se projetam para regiões específicas do encéfalo ou para a periferia. Esses tratos transportam a informação sensorial (por exemplo: dor, temperatura, coceira) ou informações motoras. Por meio da raiz sensorial ou dorsal são transmitidas as informações sensoriais no sentido periferia-centro; já as informações motoras, são transmitidas por meio da raiz motora ou ventral no sentido centro-periferia (Figura 1 A) (Ahuja et al., 2017; Bradbury and McMahon, 2006). A medula espinal está fortemente protegida pela coluna vertebral que, em humanos, está segmentada em 7 vértebras cervicais, 12 torácicas, 5 lombares e 5 sacrais, formando uma barreira óssea, protegendo a medula em conjunto com os ligamentos e meninges (dura-máter, aracnoide e pia-máter), onde está localizado o líquido cefalorraquidiano. O aporte sanguíneo é fornecido à medula espinal por meio das artérias espinais da região anterior e posterior da medula que se ramificam para perfundir o parênquima (Figura 1 B) (Ahuja et al., 2017).

Para cada segmento vertebral há um par de raízes espinal, que inerva uma região específica da pele, da musculatura ou grupos de órgãos (Figura 1 C) (Lee and Thumbikat, 2015). A lesão na medula espinal pode resultar em perda parcial ou completa da função abaixo do nível da lesão.

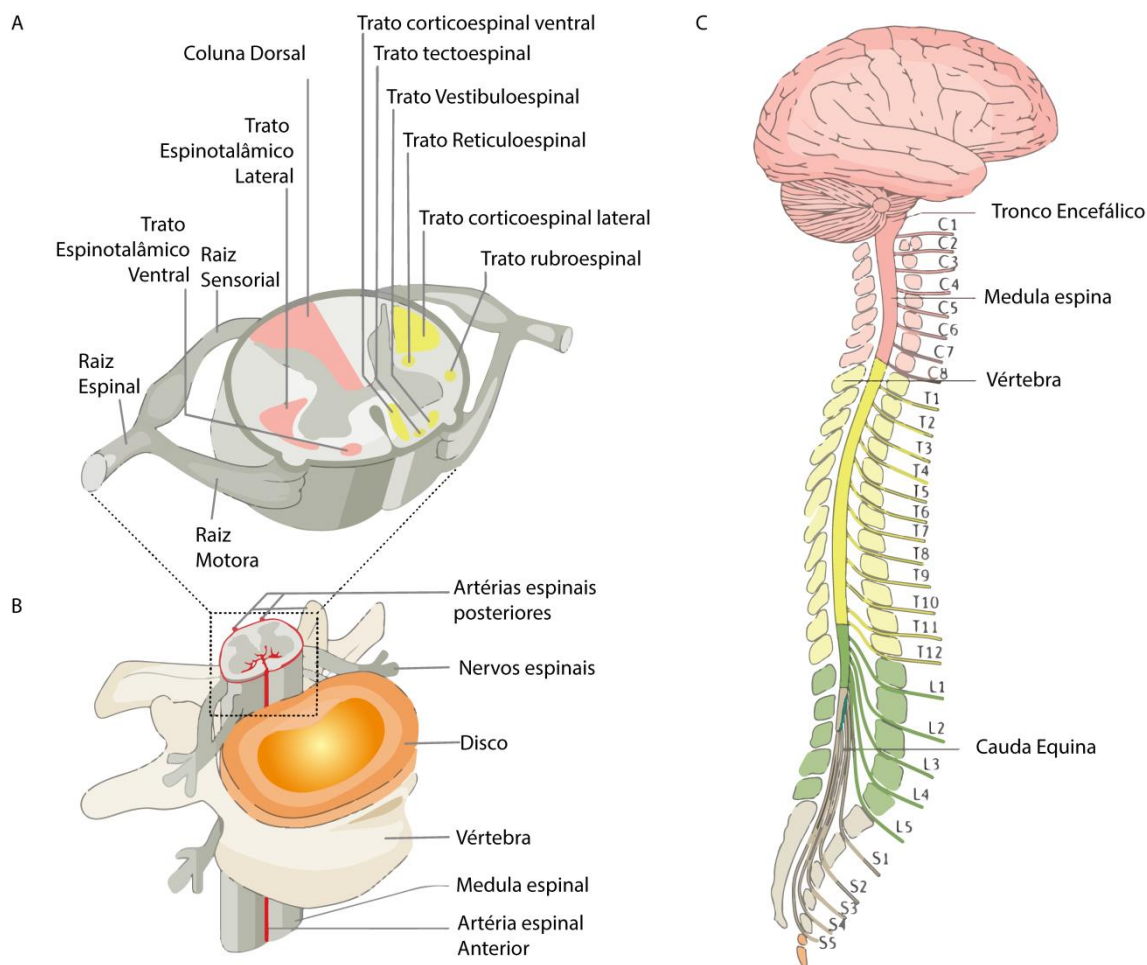


Figura 1. Anatomia da medula espinal. Representação da substância cinzenta, substância branca e tratos de vias ascendentes e descendentes (A). Representação de um segmento vertebral em um corte transversal; em destaque, a medula espinal e representação das artérias e nervos espinais (B). Segmentação da medula espinal e distribuição dos pares de nervos espinais (C). Figura adaptada de Ahuja e colaboradores (2017) (Ahuja et al., 2017).

1.2 Lesão medular

No Brasil, a lesão medular acomete anualmente de 10 a 29 indivíduos por milhão, estando distribuída de modo uniforme em todas as faixas etárias (Lee et al., 2014). O índice de mortalidade dos indivíduos, após a lesão medular, é de 3,8% no primeiro ano, de 1,6% no segundo ano e então, 1,2 % para cada ano adicional (Academy et al., 2014).

A lesão medular (LM) leva a perda de tecido que incluem os tratos de fibras mielinizadas (as vias descendentes e as vias ascendentes) onde são conduzidas as informações motoras e

sensoriais do encéfalo para a periferia ou da periferia ao encéfalo (Ahuja et al., 2017; Bradbury and McMahon, 2006; Lee and Thumbikat, 2015). Os indivíduos que sofrem a lesão medular podem apresentar o quadro de paraplegia ou paraparesia, se a lesão for abaixo do nível medular T1, e tetraplegia ou tetraparesia, se for acima deste nível. Quando não há preservação sensitiva e motora abaixo do nível de lesão, é considerada lesão completa, enquanto que, a lesão incompleta é definida quando existe a preservação parcial da sensibilidade e/ou da função motora abaixo do nível neurológico acometido (BURNS *et al.*, 2012).

A patofisiologia da lesão medular é descrita como sendo bifásica, consistindo de uma fase primária e outra secundária. A lesão primária se refere à lesão direta, provocada pelo dano mecânico à medula. Os mecanismos que se estendem da lesão primária levam à lesão secundária, sendo que esses mecanismos são considerados importantes alvos terapêuticos para a prevenção da propagação da lesão no parênquima (Rowland et al., 2008). Existem subdivisões da lesão secundária de acordo com o tempo e os mecanismos em ação na medula. Essa subdivisão se dá em fases aguda, subaguda e crônica (Figura 2) (KWON, 2004). A fase aguda é considerada até 48 horas após o início da lesão primária e está associada com a ruptura vascular, hemorragia e isquemia. Após a ruptura de micro vasos ocorre a desregulação iônica, excitotoxicidade e aumento na disponibilidade de glutamato, o que torna a célula mais sensível à despolarização; excessiva produção de radicais livres e inflamação, os quais são responsáveis pelos danos aos neurônios e células gliais, promovendo a morte celular (Ahuja et al., 2017). Em questão de minutos já há perda considerável de neurônios na medula espinal (Casella et al., 2006).

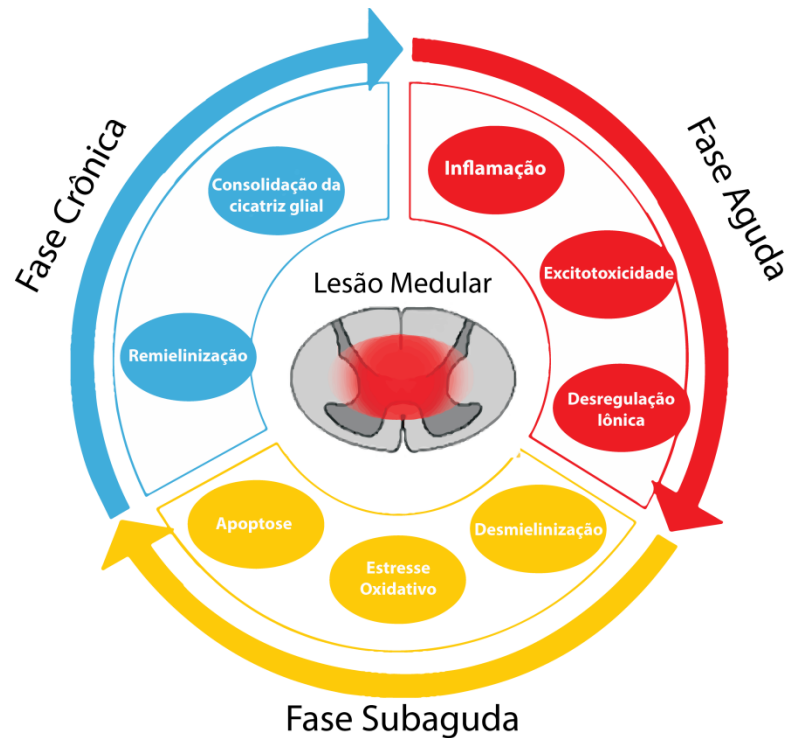


Figura 2. Eventos patofisiológicos após a lesão medular – subdivisão da lesão secundária em fase aguda, subaguda e crônica. Adaptação de Kim e colaboradores (2017) (Kim et al., 2017).

Na fase subaguda há uma perda considerável de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Figura 3 A) (Assinck et al., 2017a; Casella et al., 2006). A perda das células endoteliais que compõem o tecido vascular em conjunto com a redução do número de astrócitos leva a ruptura da barreira hematoencefálica, facilitando a entrada de células do sistema imune, como microglias, macrófagos e outras células inflamatórias, no parênquima da medula espinhal, que acabam sendo recrutadas para o local de lesão. Nessa fase, os astrócitos aumentam a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), se tornam reativos e proliferam para formar a cicatriz glial (Figura 3 A) (Assinck et al., 2017a; Kim et al., 2017).

A fase crônica tem o seu início entre a sexta e oitava semana após a lesão inicial. Nessa fase, os astrócitos e outras células gliais aumentam a espessura da cicatriz glial, limitando uma região específica do parênquima da medula espinhal, um espaço que ao longo do tempo acumulou líquido, chamado de cavidade cística e que frequentemente está localizado no centro da lesão (Figura 3 B) (Assinck et al., 2017a; Obermair et al., 2008). Algumas células se diferenciam formando novos oligodendrócitos, e também nessa fase, identificam-se células de Schwann próximo ao sítio da lesão (Figura 3 B) (Assinck et al., 2017a).

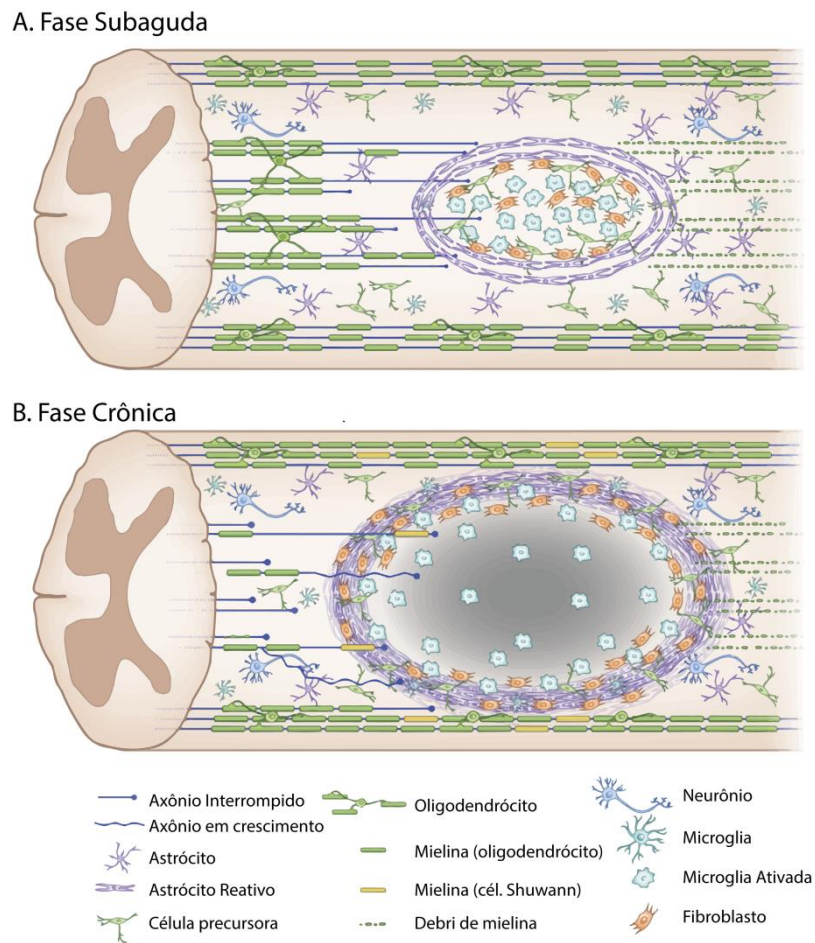


Figura 3. Patofisiologia da lesão medular na fase aguda (A) e fase crônica (B). Imagem adaptada de Assink e colaboradores (2017) (Assink et al., 2017a).

É importante ressaltar que, apesar de existir as divisões em fase aguda, subaguda e crônica e em cada uma das fases ser atribuído eventos específicos que estão ocorrendo no parênquima, existe sobreposição dos eventos nas diferentes fases. Então, a morte celular por apoptose ocorre nas 3 fases (aguda, subaguda e crônica) (Casella et al., 2006; Oyinbo, 2011); edema, isquemia e apoptose são encontrados tanto na fase aguda como na fase subaguda; e desmielinização, formação da cavidade cística e formação da cicatriz glial são eventos que estão presentes tanto na fase subaguda como na fase crônica (Oyinbo, 2011).

1.2.1 Resposta inflamatória e imunológica

A inflamação é uma defesa universal dos tecidos que pode gerar uma resposta de reparo frente a um dano. Na medula espinhal não é diferente, e por se tratar de um tecido do sistema nervoso central, a reação inflamatória e imunológica que ocorre na medula espinhal é considerada mais severa do que a encontrada em outros tecidos (Schwartz et al., 1999). A resposta inflamatória e imunológica envolve células do sistema imune como os neutrófilos, macrófagos e células T, e substâncias como as citocinas e prostaglandinas. Após a lesão medular, o local da lesão é rapidamente infiltrado por neutrófilos provenientes do sangue, que secretam enzimas líticas e citocinas que podem aumentar a lesão no tecido local e posteriormente recrutar outras células inflamatórias (Pineau et al., 2010; Popovich et al., 1997). Monócitos e macrófagos provenientes do sangue são recrutados, assim como a microglia residente no tecido local, que subsequentemente invadem o tecido para realizar a fagocitose das células ali danificadas (Dusart and Schwab, 1994; Loane and Byrnes, 2010). Essas e outras células reativas do sistema imune produzem citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas e interferons que participam da resposta inflamatória, podendo contribuir para futuros danos ao tecido (Bartholdi and Schwab, 1997; Klusman and Schwab, 1997; Smith et al., 2012).

Dentre as várias citocinas envolvidas na lesão secundária do SNC, o TNF- α é talvez a mais estudada. Esta pode ser produzida por diversas células, que incluem os neutrófilos, macrófagos, microglia, astrócitos e células T (Cacci et al., 2005; Yan et al., 2001). Sabe-se que após a lesão medular, o TNF- α se acumula rapidamente no local de lesão (Bethea et al., 1999). A sua liberação após a lesão medular promove a migração de leucócitos provenientes do sangue, que podem estimular a produção de outras citocinas. Estudos com animais revelam ambas as propriedades, neurotóxica e de neuroproteção, do TNF- α . Por exemplo, a inibição do TNF- α após lesão do SNC promove a recuperação funcional, sugerindo um papel citotóxico do TNF- α (Bethea et al., 1999; Lavine et al., 1998). Da mesma forma, visualiza-se que a inibição tardia do TNF- α não promove a recuperação da função motora (Vidal et al., 2013b). Já em ratos transgênicos com a falta de receptores para TNF- α (tornando-os menos sensíveis aos efeitos do TNF- α endógeno) há perda de tecido e déficits funcionais maiores do que em ratos que não foram submetidos à dessensibilização dos receptores após a lesão medular, sugerindo que o TNF- α pode apresentar um efeito de neuroproteção (Kim et al., 2001).

Após a lesão medular, a inflamação é considerada como “uma faca de dois gumes”, com ambas as propriedades, neurotóxica e neuroprotetora (Bethea, 2000). Embora muitas citocinas propaguem uma resposta inflamatória, outras citocinas como a interleucina (IL)-10 tem propriedades anti-inflamatórias (Knobloch and Faden, 1998; Vidal et al., 2013a). A IL-10 é produzida por muitas das células que produzem o TNF- α , o que inclui os leucócitos, macrófagos, astrócitos e a microglia, sendo que a sua administração mostra ser neuroprotetora após a lesão medular, provavelmente pela produção de genes anti-apoptóticos (Bethea et al., 1999; Brewer et al., 1999). Esses exemplos fornecem algumas ideias da enorme complexidade da resposta imune e inflamatória após a lesão medular. Existe um crescente entendimento de que as primeiras fases da inflamação são deletérias, enquanto que as fases tardias da inflamação fornecem neuroproteção. Para o desenvolvimento de estratégias de neuroproteção é necessário um melhor entendimento dessas repostas benéficas e prejudiciais da neuroimunologia e inflamação.

1.2.2 Morte celular por apoptose

Cerca de noventa por cento dos neurônios morrem nas primeiras oito horas após a lesão medular, sendo a apoptose, ou morte celular programada, uma das responsáveis por grande parte dessa morte celular (Casella et al., 2006; Lou et al., 1998). Citocinas pró-inflamatórias e o dano à membrana mitocondrial são fatores que podem desencadear a morte celular por apoptose (Elmore, 2007), assim como a excitotoxicidade glutamatérgica, que resulta no influxo de cálcio; uma das consequências é a ativação da enzima neuronal Oxido Nítrico Sintase (nNOS). A nNOS pode, então, participar do processo que leva ao dano às membranas, entre elas a membrana mitocondrial, prejudicar a fosforilação oxidativa e levar à liberação de enzimas como a citocromo C oxidase, a qual pode ativar os mecanismos de morte celular por apoptose (Blomgren et al., 2007; Zhu et al., 2004). Todos esses eventos convergem para uma mesma via de ativação da apoptose, iniciando-se pela ativação da caspase-3 e seguindo para a fragmentação do DNA, degradação da proteínas do citoesqueleto e das proteínas nucleares, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para células fagocíticas, o que facilita o reconhecimento dessas células por parte das células do sistema imune, que finalmente removem esses corpos apoptóticos por meio da fagocitose (Figura 4) (Blomgren et al., 2007; Elmore, 2007). Em todos os níveis desse complexo processo há possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da lesão medular.

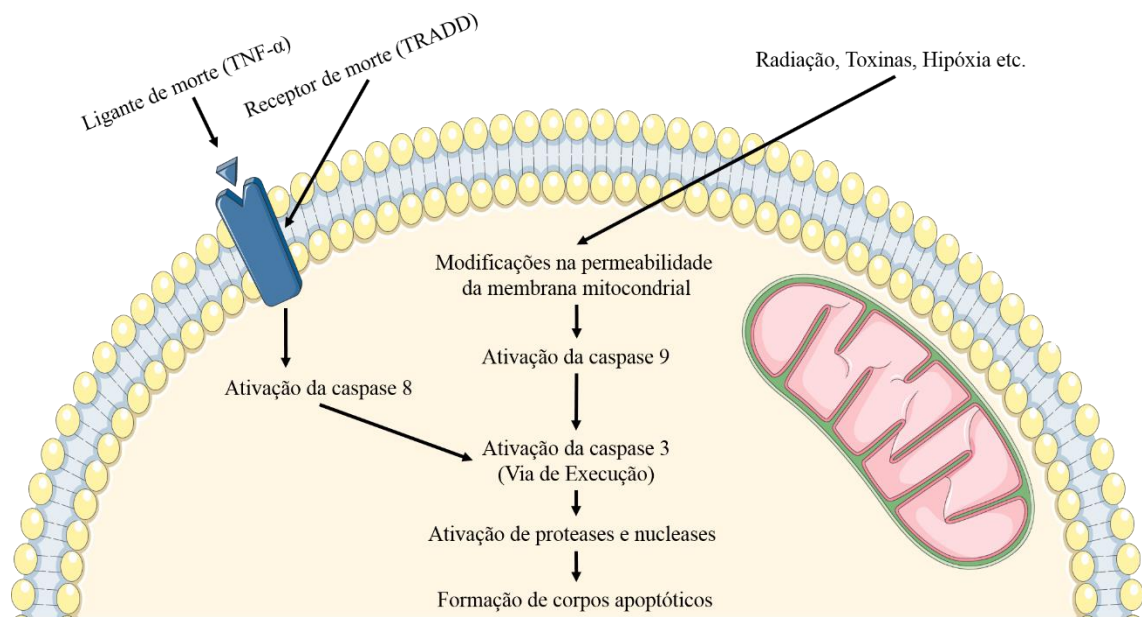


Figura 4. Representação esquemática dos eventos relacionados com a apoptose celular (fonte: do autor).

1.2.3 Modulação dos astrócitos e células precursoras neurais

O processo de proliferação, migração e hipertrofia dos astrócitos que é acompanhada do aumento da produção de GFAP é denominado astrogliose (Ridet et al., 1997; Sofroniew, 2009). Os astrócitos têm características únicas em sua citoarquitetura e fenótipo, proteínas que expressam e dão forma ao astrócito, que, de modo dinâmico respondem às mudanças no ambiente a partir dos inúmeros contatos com o tecido, prolongam suas projeções, formando complexos emaranhados de filamentos, processos altamente especializados com uma variedade de receptores e canais iônicos que formam os chamados domínios, com distintas funções para distintas regiões (Allaman et al., 2011; Oliveira et al., 2015). Interconectados, astrócitos com astrócitos, com neurônios e vasos, os astrócitos podem regular o acúmulo de água no sistema através do transporte da molécula de água pelos canais de aquaporina 4 (AQP 4) e assim controlar a expansão de um dos sinais da lesão secundária, o edema (Nesic et al., 2010; Saadoun and Papadopoulos, 2010; Tait et al., 2008). Outra forma de o astrócito atuar para a manutenção da homeostasia é removendo o íon potássio do meio extracelular através dos canais retificadores de influxo de potássio Kir (Kir 4.1) (Allaman et al., 2011; Butt and Kalsi, 2006; Nichols and Lopatin, 1997; Sibille et al., 2014). Esses canais têm um papel importante, pois removendo o

potássio do meio extracelular são capazes de reduzir a excitabilidade neuronal, já que tendem a normalizar o desequilíbrio do gradiente de concentração desse íon (Butt and Kalsi, 2006).

Após a lesão medular, células presentes na região do canal central da medula, células ependimárias, expressam novamente marcadores de células precursoras (células em um estágio mais primitivo), proliferam em estímulo à lesão e migram do canal central da medula em direção ao parênquima. Quatorze dias após a lesão, identifica-se que essas células que partiram do canal central para o parênquima expressam GFAP e conclui-se que essas células tenham se diferenciado em astrócitos maduros (MOTHE and TATOR, 2005). Essas células, quando estimuladas por fatores tróficos, são capazes de proliferar e até promover a recuperação funcional de ratos submetidos à lesão medular por contusão (Kojima and Tator, 2002). Fatores tróficos podem estar sendo estimulados após um evento danoso ao tecido. Um exemplo é o aumento na produção da proteína ligante de cálcio (S100B) pelos astrócitos, que não é um fator trófico por definição, mas que dependendo da concentração pode agir como se o fosse (Donato et al., 2013), estimulando o próprio desenvolvimento, proliferação e migração dessas células precursoras endógenas.

1.3 Células-Tronco

A célula-tronco é uma célula indiferenciada primitiva, não especializada e com capacidade de se auto-renovar, que pode se dividir para se reproduzir (auto-renovação) e dar origem a células diferenciadas (Figura 05) (Yamashita et al., 2007; Zech, 2004); por possuir tais características, as CT podem ser classificadas de acordo com sua potencialidade em toti-, pluri- ou multipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários; as pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião, e são provenientes da massa interna do blastocisto (CT embrionárias); são classificadas como multipotentes as células que originam apenas um subgrupo de linhagem celular, por exemplo, as CT mesenquimais (CTM) e neurais (Mothe et al., 2013; Wagers and Weissman, 2004; Yin et al., 2014).

Entre diversas abordagens, a terapia celular é mais uma estratégia que se encontra em estudo para tentar minimizar as consequências da lesão medular. Células-tronco (CT) representam uma alternativa promissora para o tratamento da lesão medular, sendo capazes de promover a recuperação funcional em modelos experimentais (de Almeida et al., 2011;

Matsubara et al., 2015; Nicola et al., 2017, 2016; Rodrigues et al., 2012; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Células-tronco mesenquimais da parede de cordão umbilical, CT mononucleares do sangue de cordão umbilical (Rodrigues et al., 2012), CT precursoras neurais (Giusto et al., 2014) e células-tronco derivadas de dente decíduo humano (SHEDS) (Sakai et al., 2012) são fontes potenciais para o transplante após a LM.

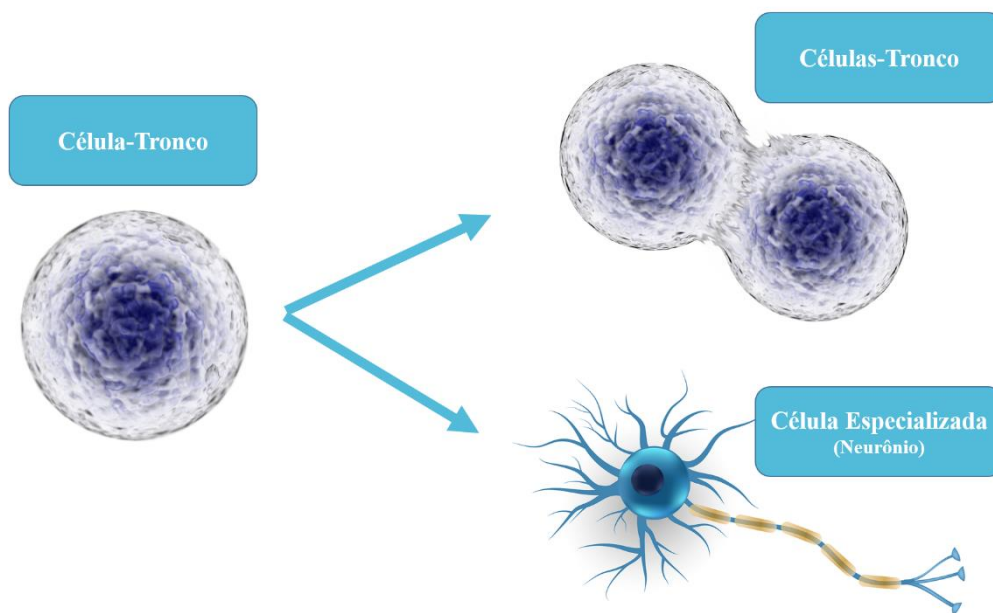


Figura 05. Desenho esquemático da auto-renovação e diferenciação de células-tronco. Uma célula-tronco pode se auto-renovar ou se diferenciar em células especializadas, exemplo o neurônio (fonte: do autor).

No processo de diferenciação, as CT passam a ser chamadas de células progenitoras, e desenvolvem características de um tecido específico. Células progenitoras são células em processo de diferenciação que quando comparadas com células embrionárias, são células adultas que possuem um decréscimo na habilidade de se auto-renovar (Verfaillie, 2005). CT obtidas de tecidos adultos como células-tronco adultas da medula óssea, do tecido adiposo, do sangue de cordão umbilical (Ragni et al., 2013); do cérebro (Mothe et al., 2013); dos músculos (Birbrair et al., 2013); do dente (Sakai et al., 2012) e de outros locais têm sido amplamente estudadas (Shanti et al., 2007); por exemplo, em desordens ou danos no sistema nervoso, onde se percebe uma perda celular neuronal específica, o transplante de células progenitoras neurais induzem a neuroproteção pela recolocação da perda celular, diminuição da apoptose e da

astrogliose local (Giusto et al., 2014). Tendo em vista que o sistema nervoso central (SNC) tem pobre capacidade para gerar novos neurônios ou células gliais (Wislet-Gendebien, 2003), o transplante de CT parece ser uma alternativa importante para reparar a perda celular após o dano.

Células-tronco mesenquimais (CTM) são células adultas que podem ser encontradas em uma variedade de tecidos adultos, incluindo a medula óssea, gordura, dente e são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, como condrócitos, osteófitos, adipócitos, miócitos e neurônios (Kern et al., 2006; Zuk, 2002). Recentemente as células-tronco mesenquimais provenientes da polpa dentária (DPSC) têm sido estudadas (de Almeida et al., 2011; Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012)

As DPSC estão localizadas na cavidade central do dente, onde contém o tecido pulpar, sendo considerada uma fonte de células progenitoras/tronco que pode se proliferar e se diferenciar em diferentes linhagens celulares *in vitro* (Gronthos et al., 2002, 2000), incluindo células neurais (Miura et al., 2003). CT mesenquimais derivadas do dente, quando aplicadas na medula de ratos que sofreram LM, mostram ser capazes de se diferenciar em oligodendrócitos, um dos mecanismos de ação sugeridos para justificar a recuperação da função motora dos animais (Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012).

Torna-se claro, após evidências de recuperação funcional (de Almeida et al., 2011; Matsubara et al., 2015; Nicola et al., 2017, 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012) que o transplante de CTM provenientes da polpa dentária pode ser útil para o tratamento dos danos que acometem o SNC. Porém, os mecanismos responsáveis por tal melhora ainda não são conhecidos.

1.3.1 Mecanismos de ação das células-tronco

Dentre os mecanismos propostos de ação das células-tronco estão: diferenciação das CT em células do tecido alvo, neuroproteção, imunomodulação, regeneração axonal, formação de pontes, modificações na cicatriz glial e regeneração da mielina. A neuroproteção está relacionada com a proteção tecidual ao dano secundário, sendo sugerida a denominação neuroproteção quando há a preservação tecidual como um dos efeitos positivos após o transplante de células-tronco, especialmente quando esse transplante é realizado minutos ou

horas após a lesão medular (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Imunomodulação, a complexa natureza da inflamação pode ser exemplificada separando o fenótipo das células como macrófagos e microglia em neurotóxico ou pró-inflamatório, convencionalmente chamado de M1; e anti-inflamatório, convencionalmente chamado de M2; sendo as células-tronco capazes de induzir a modulação dessas células de um estado pró-inflamatório (M1) para um estado anti-inflamatório (M2) (Assinck et al., 2017b; Matsubara et al., 2015). A redução na cicatriz glial por meio do transplante de células tronco já está bem documentada na literatura (Shende and Subedi, 2017); essa redução na formação da cicatriz glial favorece a regeneração dos axônios comprometidos, além de, as células poderem servir de “pontes”, auxiliando no crescimento e direcionamento desses axônios (Assinck et al., 2017b).

De modo geral é possível agrupar esses mecanismos em 3 grandes grupos: efeito parácrino, fusão celular e diferenciação celular. O mecanismo primário pelo qual as CT agem no tecido neural ainda não foi esclarecido. Essa classificação representa, de fato, três teorias que tentam explicar a neurogênese ou a reparação neural após o transplante das CT. A primeira proposta é que as células-tronco possam se diferenciar, por exemplo, a diferenciação da célula transplantada em uma célula neural capaz de substituir os neurônios ou células gliais que sofreram com o dano neurológico. Na fusão celular, acredita-se que a células transplantadas se fundam com as células do tecido lesado, adquirido as propriedades fenotípicas das células neurais do hospedeiro. Já a proposta da atividade parácrina defende que as CT exerçam efeitos neurotróficos pela liberação de moléculas complementares que promovem mecanismos de reparo tecidual. Dentre essas moléculas estão as citocinas, os fatores neurotróficos, proteínas da matriz extracelular e componentes reguladores da matriz extracelular (Maltman et al., 2011).

De outra forma, as teorias podem ser reagrupadas em duas distintas e inter-relacionadas estratégias de “neuroproteção” e “neuroreparação/neuroregeneração”. Neuroproteção, quando se fala em efeitos parácrinos, inibição da morte celular, de ação próxima à lesão. Enquanto que neuroreparação se refere à regeneração dos axônios lesados, brotamento, plasticidade dos axônios intactos, diferenciação celular e também pela ação parácrina. Investigar a habilidade que a célula transplantada apresenta em migrar, se implantar e sobreviver no local de lesão é essencial para confirmar a existência de alguma das teorias citadas. Após a verificação da sobrevivência das células no local de lesão, a diferenciação celular se torna um tema recorrente nos trabalhos que envolvem o transplante de células-tronco, por vezes com resultados positivos (Sakai et al., 2012), ou resultados negativos (Rodrigues et al., 2012), porém, em ambos os casos

a diferenciação celular não é o papel determinante para promover a recuperação da função motora.

Atribui-se à ação parácrina, liberação de componentes como citocinas e fatores tróficos, um dos principais mecanismos que a célula-tronco pode desempenhar. As CTM expressam diversos fatores tróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento neural (NGF), e citocinas como as interleucinas (IL), IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 (Maltman et al., 2011). Os efeitos desses fatores no tecido podem ser amplamente classificados como angiogênico (a formação de novos vasos sanguíneos), neurogênico (formação de novos tecidos neurais), neuroprotetor (proteção do tecido contra a degeneração), sinaptogênico (formação de sinapses e contatos sinápticos) e inibidores da cicatriz glial, o que pode permitir a reconstrução ou reparação da circuitaria neuronal após a lesão (Finetti et al., 2012; Ninan, 2014). Alguns desses fatores tróficos e citocinas têm sido encontrados nas células-tronco derivadas de dente humano (Gronthos et al., 2000; Matsubara et al., 2015; Miura et al., 2003).

As CTM são capazes de secretar fatores neurotróficos e citocinas (Yalvaç et al., 2013), citocina como IL-10, que participa diretamente no processo inflamatório. A IL-10 é primeiramente uma citocina com caráter anti-inflamatório (Vidal et al., 2013a) que inibe a expressão gênica da síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas células T/macrófagos, além de diminuir a sua capacidade de apresentar antígeno por essas células (Moore et al., 1993). Com a liberação de IL-10 também é possível perceber a redução da produção de TNF- α pelos astrócitos e os antígenos apresentados por astrócitos e células da microglia (Balasingam and Yong, 1996). Esses exemplos de neuroproteção constituem uma das principais vias de atuação das células-tronco, pois propicia a regeneração, brotamento e/ou plasticidade no local de lesão, podendo contribuir para os resultados funcionais. Para compreender a eficácia das células-tronco, o estudo do modo de transplante é fundamental, assim como o tempo de administração, pois o tempo em que será transplantada e as diferentes vias de administração de células podem fornecer resultados morfológicos e funcionais distintos. Em um estudo prévio, realizando o transplante de células-tronco em diferentes períodos após a lesão medular, identificou-se que o melhor tempo de administração está no período agudo após a lesão medular, nesse caso, uma hora após a lesão medular (Rodrigues et al., 2012).

1.3.2 Células-Tronco derivadas do dente decíduo humano (SHED)

As células-tronco derivadas de dente decíduo humano (SHED) são uma fonte de células-tronco de fácil obtenção, que não causam efeitos adversos à saúde, e são apontadas como excelente forma de tratamento da lesão medular experimental (Sakai et al., 2012). SHED são encontradas dentro do nicho perivascular da polpa dentária (Gronthos et al., 2002), expressam marcadores de células-tronco mesenquimais e de células neuroectodermas (Achilleos and Trainor, 2012; Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003), seguindo os critérios estabelecidos para definir as células-tronco mesenquimais (Dominici et al., 2006); expressando marcadores associados às CTM (CD90, CD105) e a ausência de CD34, que marca células progenitoras hematopoiéticas e células endoteliais; CD14, que é predominantemente expresso por monócitos e macrófagos; para o marcador de leucócitos CD45; e para células B (CD19) (Dominici et al., 2006). Outra habilidade relevante para os critérios de identificação de células mesenquimais e que as células de dente têm, é a de formar colônias (Zhao and Chai, 2015).

Até o momento, não há relatos de formação teratogênica após o transplante de células-tronco derivadas do dente. Considerações éticas e de imunocompatibilidade estão ausentes quando se trata de células derivadas do dente; pois, elas são facilmente isoladas de uma fonte autóloga (Abdullah et al., 2014).

O transplante de SHED têm sido usado em modelos experimentais da doença de Alzheimer, com uma administração via nasal foi capaz de melhorar a função cognitiva dos animais, promover neuroproteção, alongamento axonal, supressão da inflamação e regulação da microglia (Mita et al., 2015). Em uma administração no local da lesão após a isquemia cerebral em camundongos, as SHED foram capazes de reverter os déficits neurológicos (Yamagata et al., 2013).

Diversos estudos já demonstraram que o transplante das SHED após a lesão medular por contusão promove a recuperação funcional dos membros posteriores de roedores (de Almeida et al., 2011; De Berdt et al., 2015; Matsubara et al., 2015; Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012), são capazes de reduzir a cicatriz glial e favorecer a preservação de axônios de neurônios no local da lesão (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012). Alguns autores utilizaram o transplante precoce das SHED após a lesão medular por contusão, e por isso têm atribuído os efeitos benéficos da recuperação funcional e tecidual à possível neuroproteção proporcionada pelas SHED (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Em parte, esses efeitos foram esclarecidos quando se demonstrou que as SHED são

capazes de modificar o fenótipo de macrófagos; elas não foram capazes de reduzir a entrada de macrófagos no parênquima da medula espinal, mas elas modificaram o fenótipo dos macrófagos de M1, pró-inflamatório para M2, anti-inflamatório (Matsubara et al., 2015) e isso sugere que as SHED poderiam estar favorecendo uma redução da perda celular precoce.

1.4 Justificativa

Até o momento não há tratamento curativo para a lesão contusa da medula espinal, o que torna os pacientes cronicamente incapacitados. Diversas abordagens experimentais já foram testadas, mas nenhuma foi capaz de reverter os déficits causados pela lesão medular. As células-tronco têm sido estudadas como uma alternativa terapêutica, estando relacionada com resultados promissores após a lesão medular quanto à recuperação funcional, além de relatos de diferenciação celular em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos após o transplante. As células-tronco, mesmo não se diferenciando em células neurais, são capazes de secretar citocinas e fatores neurotróficos, que são capazes de interferir positivamente na recuperação da medula lesada. Um dos tipos de célula eleita para o transplante são as células de dente decíduo humano (SHED), que nos anos 2000 foi isolada e utilizada como uma forma de transplante na tentativa de reparar a lesão medular experimental em 2011. Neste curto período de tempo, de 2011 a 2017, as SHED se mostraram ser promissoras para uso clínico, uma vez que apresentam melhores resultados funcionais nos animais que receberam o tratamento. Até o momento as SHED têm sido transplantadas uma hora após a lesão medular e os efeitos do transplante analisados semanas após. O presente trabalho transplantou as SHED uma hora após a lesão e teve como objetivo avaliar os efeitos na medula espinal nos períodos agudo, iniciando seis horas; subagudo, até setenta e duas horas; e crônico, seis semanas após a lesão medular.

1.5 Hipótese de trabalho

As hipóteses que testamos neste estudo foram: a) o transplante agudo das SHED são capazes de promover a recuperação funcional, proteção tecidual, reduzindo o volume da lesão; neuroproteção, favorecendo a preservação de neurônios a partir da fase aguda da lesão. b) animais que receberam o transplante de SHED uma hora após a lesão apresentarão aumento de células progenitoras e redução da expressão de GFAP na medula espinal no período subagudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do transplante das células tronco de dente decíduo humano no período agudo, subagudo e crônico sobre a neuroproteção, proteção tecidual e recuperação funcional em ratos Wistar submetidos à lesão medular por contusão.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Verificar os efeitos do transplante das células-tronco de dente decíduo humano sobre a recuperação funcional, volume de lesão, número de células neuronais, astrocitárias, microgliais e de células T na medula espinal de ratos submetidos à lesão medular;

2.2.2 Quantificar a apoptose neuronal na fase aguda após a lesão medular e o transplante de células de dente decíduo humano;

2.2.3 Avaliar a evolução da expressão de GFAP e S100B e do número de células precursoras neurais na medula espinal de ratos submetidos à lesão medular por contusão e o transplante de células de dente decíduo humano.

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais

Foram utilizados os protocolos descritos na literatura e já estabelecidos pelo laboratório.

3.1.1 Análise morfológica das culturas celulares

A presença das células aderentes e a sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus, durante as culturas de células-tronco.

3.1.2 Análise imunofenotípica das células cultivadas

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente a partir da verificação da presença de marcadores de células mesenquimais e ausência de células hematopoéticas, por meio de citometria de fluxo. As CTMs foram analisadas anteriormente a décima passagem da cultura celular. Os anticorpos utilizados foram os específicos para identificar os marcadores de CTM, tais como CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105; bem como confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, como CD14, CD34, CD45, CD184, HLA-DR e STRO-1. A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 2 μ L de anticorpo monoclonal anti-humano (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para cada uma das moléculas. O 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) foi utilizado como critério de exclusão, para permitir a avaliação apenas de células vivas.

Após a incubação com os anticorpos durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. O 7AAD foi utilizado a uma concentração final de 1 μ g/mL em PBS e incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSaria III (BD Biosciences). O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos PE (do inglês phycoerythrin - ficoeritrina) e FITC (do inglês fluorescein isothiocyanate - isotiocianato de fluoresceína). A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se em torno de 10.000 eventos de cada amostra, e a análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva versão 6.0 (BD Biosciences).

3.1.3 Diferenciação celular in vitro

A diferenciação em tipos celulares mesenquimais, necessária para confirmação da identidade da população obtida, foi testada a partir da quinta passagem. Ensaios de

diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados seguindo protocolos já descritos.

3.1.4 Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, realizou-se o cultivo celular por cerca de 25 dias em meio contendo SFB (15%), dexametasona (10⁻¹¹M), ácido ascórbico 2-fosfato (50mM) e β-glicerofosfato (15mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

3.1.5 Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais, realizou-se o cultivo celular por cerca de 30 dias em meio DMEM contendo 10% de SFB, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (0,5mM), dexametasona (1μM), insulina (1,74μM), indometacina (50μM), rosiglitazona (1μM). Os adipócitos foram identificados por observação de gotículas de gordura ao microscópio com contraste de fase e por coloração das mesmas com o corante Oil Red O.

3.1.6 Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células aderentes foram cultivadas em meio de diferenciação durante 30 dias. O meio foi constituído de DMEM suplementado com SFB (10%), dexametasona (0,1μM), ITS 1x (0,01mg/mL de insulina humana recombinante, 5,5μg/mL de transferrina humana, e 5ng/mL de selenito de sódio), 10ng/mL de TGF-α1 e 50μM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). A condrogênese foi demonstrada pela coloração com Alcian Blue.

Todos os meios de cultivo foram trocados a cada 3-4 dias e quando diferenciadas, as células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com água mili-Q, e por fim realizada a coloração específica.

3.2 Breve descrição dos materiais e métodos

Esta seção tem o objetivo de apresentar, sucintamente, a caracterização das células-tronco, o modelo de lesão medular, os procedimentos de perfusão e de avaliação do volume da lesão. A descrição detalhada dos demais materiais e métodos é encontrada nos capítulos I e II.

3.2.1 Modelo de lesão medular traumática

Todos os animais foram submetidos à tricotomia, analgesia com tramadol (5mg/Kg, i.p., Grunenthal, Alemanha) e anestesiados com isoflurano (2-4%, Cristália, Brasil) previamente à cirurgia de laminectomia. Para o procedimento cirúrgico, o animal foi posicionado em decúbito ventral e uma incisão de aproximadamente 5 cm de pele e subcutâneo sob a linha média da região dorsal foi realizada, expondo a região da coluna vertebral entre T8 e T12; os músculos paravertebrais que se inserem entre T9 e T11 foram dissecados. Após a exposição das vertebrae, a lâmina da vértebra de T10 e o processo espinhoso de T9 foram removidos com o uso de um microscapa-bocados.

A lesão medular traumática, ao nível de T10 foi realizada por meio do equipamento New York University impactor (NYU impactor), descrito por Gruner (1992), que provoca uma lesão moderada (10 g X 25 mm). Este é um dos métodos mais empregados na literatura devido a sua reprodutibilidade (Figura 6) (McDonald et al., 2004; McDonald and Howard, 2002).

Após a lesão medular traumática os animais foram suturados, acondicionados isoladamente nas caixas, mantidos nas mesmas condições de temperatura e controle de luz. Todos os animais receberam 0,1 mL de Enrofloxacino (Bayer, Brasil) para as infecções do trato urinário e analgesia com tramadol (5mg/Kg, i.p., Grunenthal, Alemanha), com administração de 12 em 12 horas por 5 dias após a lesão. Foram submetidos à manobra vesical manual, de uma a duas vezes ao dia, pelo método de Crede, por 5 dias ou até adquirirem o controle voluntário desta função. A partir do terceiro dia os animais foram agrupados em caixas com no máximo 5 animais por caixa.

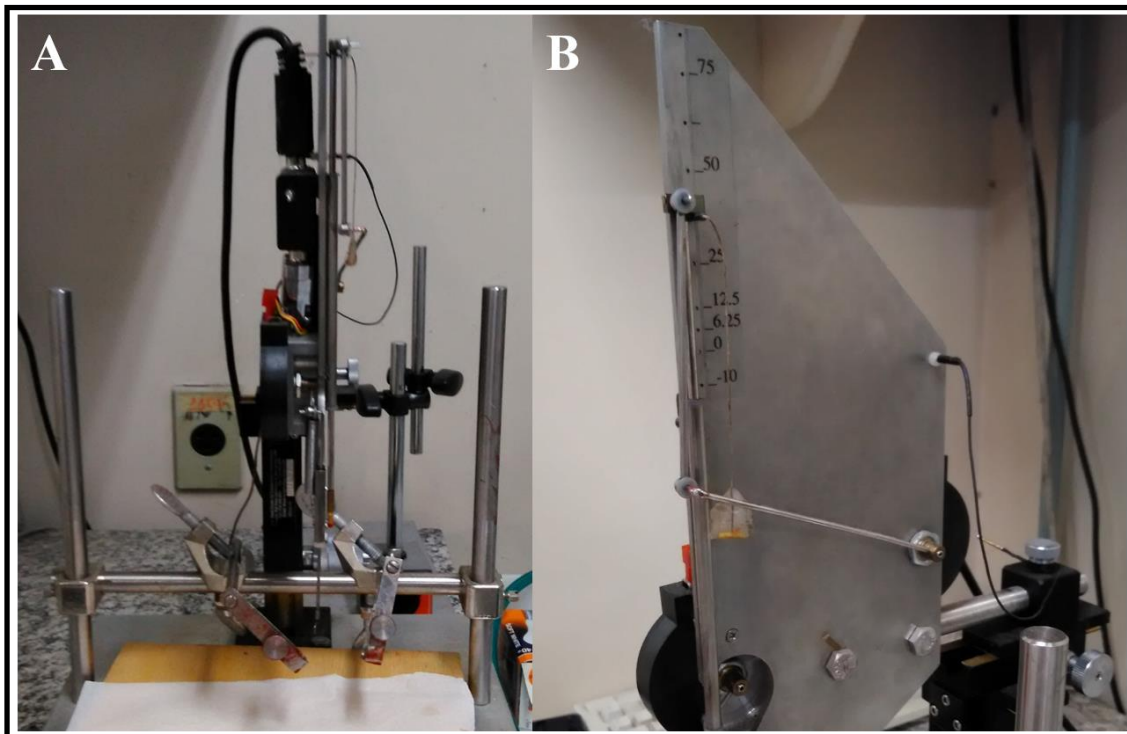


Figura 06. Fotos ilustrativas do equipamento New York University impactor. Visão frontal do equipamento (A) e visão lateral com destaque às diferentes alturas para o posicionamento da haste (B).

3.2.2 Perfusão

Os animais foram anestesiados com tiopental (Cristália, Brasil) na dose de 25 ± 5 mg/kg no final da sexta semana, realizou-se a toracotomia com exposição do coração. Foi injetado 1000 UI de heparina sódica no ventrículo esquerdo, e por meio de uma incisão neste mesmo ventrículo foi inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Control Company), a qual realizou a perfusão inicialmente com uma solução salina (150 ml) para lavagem da árvore vascular e posteriormente com uma solução fixadora (300 ml), composta de paraformaldeído (PFA) (Reagen, Brasil) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Após esse procedimento, a medula espinhal foi removida entre C5 à L5, sendo pós-fixada na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão por 4 horas em temperatura ambiente (Mestriner et al., 2011).

As medulas espinhais foram crioprotetidas pela imersão em sacarose 15% diluída em TF à 4°C, onde permanecem até submergirem. Trocou-se a solução sacarose por uma de maior concentração, 30% diluída em TF à 4°C onde, novamente, permaneceram até submergirem. Depois de realizar a crioproteção, as medulas foram congeladas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -70°C.

3.2.3 Análise do Volume da Cavitação

Para analisar o volume de cavitação, aproximadamente 30 secções no sentido transversal, com espessura de 20 µm de cada medula de todos os animais foram processados em criostato (Leica, Germany). Posteriormente, esses cortes foram corados com a técnica de Hematoxilina e Eosina. Secções sequenciais com um intervalo de 300 µm entre cada corte foram escolhidas, sendo que a área de cavitação de cada secção foi calculada para encontrar o corte com a maior área de cavitação (nomeado como epicentro), a partir do epicentro foram escolhidas 21 secções (modificado de MENEZES et al., 2010) (10 cortes acima, 10 cortes abaixo e o epicentro) (Menezes et al., 2010). A área de cavitação foi mensurada por meio do software Image J (USA) versão 1.46. Todo e qualquer tipo de tecido necrótico dentro da cavidade foi contabilizado como parte da lesão (Parr et al., 2008). Para o cálculo do volume, utilizou-se a soma das áreas multiplicada pelo intervalo entre cada secção (Rodrigues et al., 2012). Para a obtenção do volume da substância branca foi utilizado o seguinte cálculo: o volume total da secção da medula subtraído da soma dos volumes da substância cinzenta e cavitação. Seis secções abaixo da lesão foram usadas para a contagem dos neurônios motores no corno anterior da medula espinal.

3.3 Resultados

3.3.1 Avaliações biológicas

Com relação aos pré-requisitos para classificação das células como CTMs, as mesmas foram rotineiramente acompanhadas através de microscópio óptico para avaliação de sua morfologia fibroblastoide e capacidade de aderência ao plástico da placa de cultivo por aproximadamente doze passagens. Em seguida, as mesmas foram submetidas aos protocolos descritos e foram eficientemente capazes de diferenciar-se com os meios adipogênico, osteogênico e condrogênico, como pode ser observado na figura 7. As células foram capazes de produzir gotículas de gordura, coradas em vermelho no interior das células, caracterizando adipócitos (Figura 7D); glicosaminoglicanas, corados em azul, acompanhados de mudança na morfologia celular, evidenciando os condrócitos (Figura 7E); e matriz óssea, corada em vermelho no exterior das células (Figura 7F).

Na análise imunofenotípica da cultura primária de CTMs, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-humanos contra os marcadores celulares característicos de células-tronco. As células mostraram positividade para CD29 (99,8%), CD90 (99,7%), CD105 (99,7%), CD44

(99,8%), CD73 (99,8%). Já os marcadores de células hematopoéticas apresentaram baixa expressividade de CD14 (0,1%), CD34 (<0,1%), CD184 (0,1%), CD45 (<0,1%) (Figura 7).

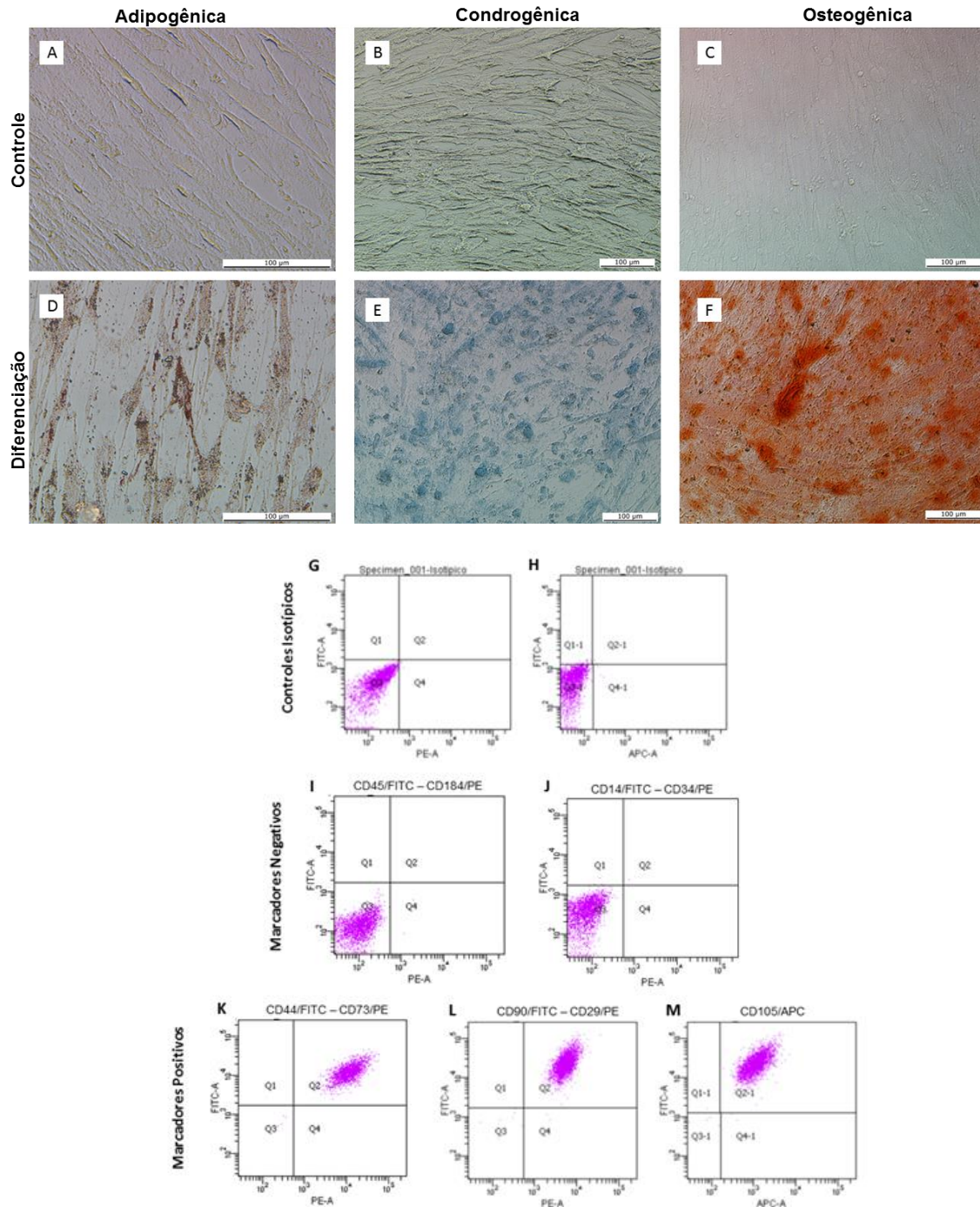


Figura 7. Caracterização das CTMs. Microfotografias da diferenciação celular. (A) Controle Adipogênico, (B) Controle condrogênico, (C) Controle osteogênico, (D) Diferenciação adipogênica, (E) Diferenciação condrogênica, (F) Diferenciação osteogênica. A escala corresponde a 100 µm. Caracterização imunofenotípica das CTM. Houve baixa expressão (<2%) para (I) CD45 e CD184, (J) CD14 e CD34. Positividade (>99,5%) para (K) CD44 e CD73, (L) CD90 e CD29, (M) CD105.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bres

Research report

Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis



Fabrício do Couto Nicola^{a,b,*}, Marília Rossato Marques^{a,b}, Felipe Odorczyk^{a,b}, Danusa Mar Arcego^b, Letícia Petenuzzo^b, Dirceu Aristimunha^b, Adriana Vizuete^b, Eduardo Farias Sanches^b, Daniela Pavulack Pereira^c, Natasha Maurmann^c, Carla Dalmaz^b, Patricia Pranke^{c,d}, Carlos A. Netto^b

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Post Graduate Program in Neuroscience, Porto Alegre, Brazil

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Biochemistry, Porto Alegre, Brazil

^c Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hematology and Stem Cell Laboratory, Porto Alegre, Brazil

^d Stem Cell Research Institute, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 February 2017

Received in revised form 12 March 2017

Accepted 13 March 2017

Available online 16 March 2017

Keywords:

Mesenchymal stem cell

Dental pulp stem cell

Tissue protection

Neuroprotection

Cell death

Apoptosis

ABSTRACT

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) transplants have been investigated as a possible treatment strategy for spinal cord injuries (SCI) due to their potential for promoting functional recovery. The aim of present study was to investigate the effects of SHED on neuronal death after an experimental model of SCI. Methods: Wistar rats were spinalized using NYU impactor[®]. Animals were randomly distributed into 4 groups: Control (Naive) or Surgical control, Sham (laminectomy with no SCI); SCI (laminectomy followed by SCI, treated with vehicle); SHED (SCI treated with intraspinal transplantation of 3×10^5 SHED, 1 h after SCI). Functional evaluations and morphological analysis were performed to confirm the spinal injury and the benefit of SHED transplantation on behavior, tissue protection and motor neuron survival. Flow cytometry of neurons, astrocytes, macrophages/microglia and T cells of spinal cord tissue were run at six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after lesion. Six hours after SCI, ELISA and Western Blot were run to assess pro- and anti-apoptotic factors. The SHED group showed a significant functional improvement in comparison to the SCI animals, as from the first week until the end of the experiment. This behavioral protection was associated with less tissue impairment and greater motor neuron preservation. SHED reduced neuronal loss over time, as well as the overexpression of pro-apoptotic factor TNF- α , while maintained basal levels of the anti-apoptotic BCL-XL six hours after lesion. Data here presented show that SHED transplantation one hour after SCI interferes with the balance between pro- and anti-apoptotic factors and reduces early neuronal apoptosis, what contributes to tissue and motor neuron preservation and hind limbs functional recovery.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Spinal Cord Injury (SCI) leads to major deficits or complete loss of sensory-motor function and to disruption of autonomic function; and the development of a treatment for SCI is one of the major challenges in biomedical research (Lee and Thumbikat, 2015; Rowland et al., 2008; Sadowsky et al., 2002). The primary spinal injury occurs after the physical deformation of the cord; however, a large number of neurons are lost due to a variety of

pathophysiologic events that are initiated by the original mechanical insult, the secondary injury (Anderson and Hall, 1993; Lee and Thumbikat, 2015; Rowland et al., 2008; Sadowsky et al., 2002). This secondary spinal cord injury includes necrosis (Ducker et al., 1971), free radical formation (Anderson et al., 1985; Braugher and Hall, 1989; Kurihara, 1985), K⁺ accumulation in the extracellular space (Chesler et al., 1994; Young et al., 1982), glutamate-mediated excitotoxicity (Dorsett et al., 2016), edema (Ge et al., 2013; Sharma and Olsson, 1990), and apoptosis (Crowe et al., 1997; Liu et al., 1997).

Ninety percent of neurons are lost in the first eight hours after the spinal injury, mostly due to apoptosis (Casella et al., 2006; Lou et al., 1998). Pro-inflammatory cytokines may activate

* Corresponding author at: Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Ramiro Barcelos, 2600 anexo, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91003-003, Brazil.

E-mail address: fabriconicola@hotmail.com (F.C. Nicola).

programmed cell death, as well as mitochondrial membrane disruption, what releases pro-apoptotic factors (Elmore, 2007). On the other hand, glutamatergic excitotoxicity results in the influx of calcium and subsequent calmodulin-mediated activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS); this activation of nNOS may participate in the mitochondrial membrane impairment process and the consequent activation of apoptosis-related mechanisms (Blomgren et al., 2007; Zhu et al., 2004). These events converge to the same execution pathway, beginning with the cleavage of caspase-3 followed by DNA fragmentation, degradation of cytoskeletal and nuclear proteins, cross-linking of proteins, formation of apoptotic bodies, expression of ligands for phagocytic cell receptors and finally uptake by phagocytic cells (Blomgren et al., 2007; Elmore, 2007). All of these processes could be considered possible targets for the treatment of spinal cord injury.

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), found within the perivascular niche of dental pulp (Gronthos et al., 2002), express early markers for both mesenchymal and neuroectodermal stem cells (Achilleos and Trainor, 2012; Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003). It has been recently shown that engrafting SHED promotes functional recovery after spinal cord injury (De Berdt et al., 2015; Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012) and this effect can be partly explained by SHED anti-inflammatory action evidenced by macrophage modulation 72 h after spinal cord contusion (Matsubara et al., 2015).

The present study was designed to verify the short- and long-term effects of SHED transplantation one hour after spinal cord contusion on neuronal survival associated with motor function recovery. The working hypothesis is that SHED transplantation would reduce acute neuronal loss probably by reducing neuronal apoptosis.

2. Results

2.1. Functional evaluation

Two days before, two days after and weekly until the sixth week post contusion, the behavioral assessment was conducted through the BBB Locomotor Rating Scale. All animals showed normal locomotor function in the preoperative evaluation; however, hind limb function of lesioned groups, SCI and SHED, was greatly impaired

two days after the injury, as compared to the control group (Fig. 2). In the seventh day, spontaneous motor function recovery was observed in both lesioned groups ($P < 0.05$, Fig. 2). A further significant increment in hind limb function was seen in the SHED group as early as one week post lesion; such difference remained until the sixth week. Animals of the control group reached maximal scores in BBB scale in all assessments, i.e., presented normal motor function.

2.2. Tissue loss

The SCI group presented large cavity areas ($0.27 \pm 0.01 \text{ mm}^3$) extending along the spinal cord as assessed six weeks after contusion (Fig. 3 A). The early injection of SHED reduced tissue loss ($0.16 \pm 0.02 \text{ mm}^3$) at the epicenter and 200 μm caudally to the lesion site, as revealed by lower cystic cavity volume (Fig. 3 A, B) [$t(1,9) = 3.11$, $P < 0.05$]. Interestingly, the SHED group also presented larger white matter volume ($0.82 \pm 0.004 \text{ mm}^3$) when compared to SCI rats ($0.77 \pm 0.01 \text{ mm}^3$) (Fig. 3 C) [$t(1,9) = 4.09$, $P < 0.05$]. These results indicate that this type of spinal cord injury promotes severe tissue loss that is greatly prevented by SHED treatment.

2.3. Motor neuron evaluation

Histological evaluation confirmed a reduction of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord in the SCI group (4.15 ± 0.70 motor neurons/section) as compared to the control group (16.08 ± 0.84 motor neurons/section) assessed six weeks after lesion; the treatment with SHED was able to partly preserve the number of motor neurons (9.77 ± 0.96 motor neurons/section) (Fig. 3 D, E) [$F(2,12) = 37.54$, $P < 0.05$]. The maintenance of motor neurons was associated with hind limbs motor recovery, as revealed by the strong Pearson's positive correlation between motor neuron number and the score of the last functional BBB section ($r = 0.866$, $P < 0.05$); this indicates that SHED partially prevented the loss of motor neurons in the ventral spinal cord and that was associated with functional recovery.

2.4. Spinal cord cell quantification by flow cytometry

Flow cytometry was run six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after SCI in order to evaluate the number of

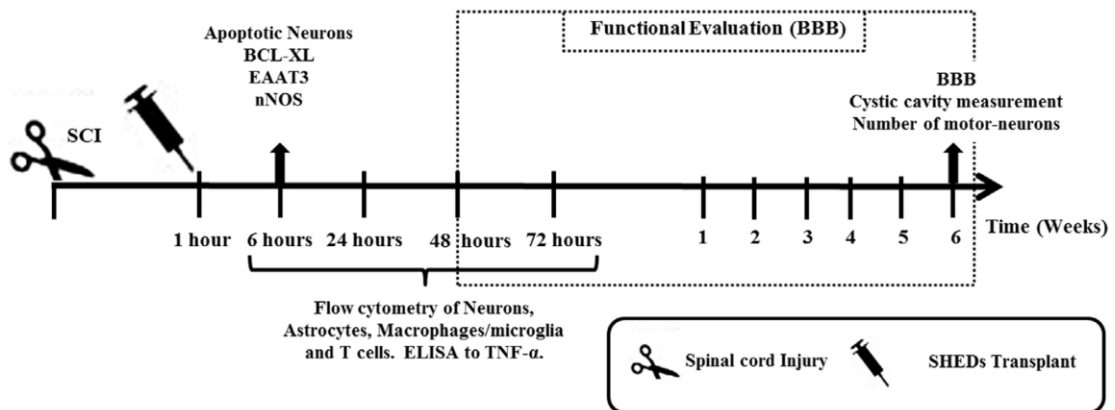


Fig. 1. Experimental design of the three experiments. The spinal cord injury was performed in two groups: SCI and SHED. The SHED group received cell administration one hour after lesion. In the first experiment, all animals were conducted to the functional evaluation forty-eight hours and weekly after SCI. Six weeks after, the animals were euthanized and samples were collected to proceed with the morphologic analyzes of cystic cavity, white matter volume and number of motor neurons in the spinal cord. In the second experiment, samples of spinal cord were collected six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after lesion to perform flow cytometry of neurons, astrocytes, macrophages/microglia and T cells. At the same time points TNF- α levels were assessed. In the third experiment, samples of spinal cord were collected six hours after SCI to evaluate apoptotic neurons by flow cytometry and the expression of BCL-XL, EAAT3 and nNOS by Western Blot.

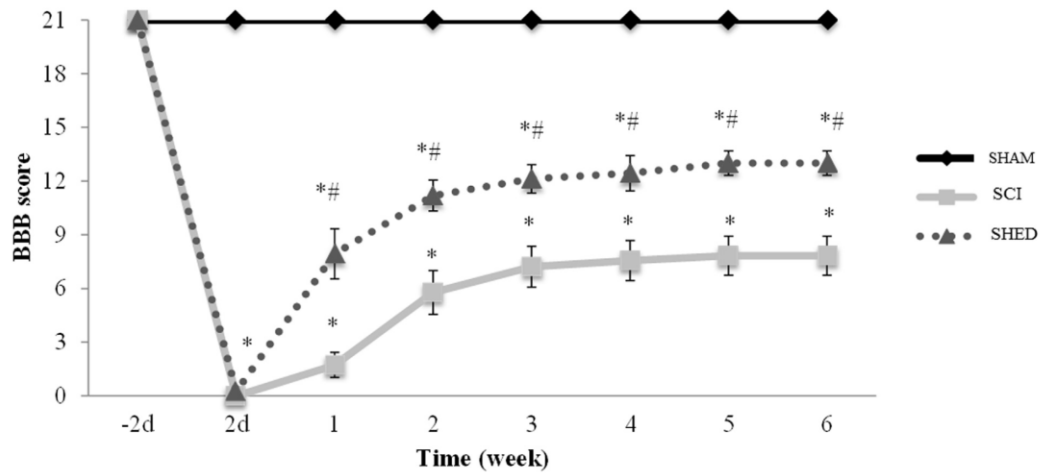


Fig. 2. Progress of hind limbs function after spinal cord contusion assessed through Basso, Beattie, and Bresnahan scale (BBB). Data expressed as mean \pm SE of BBB scores. *Difference from the control group. #Difference from SCI group.

neurons, astrocytes, macrophage/microglia and T cells in spinal cord tissue. There was a loss of $\sim 25.7\%$ of neurons in the first six hours after injury; the SCI ($5.65 \pm 0.34\%$ of neurons) and SHED ($6.06 \pm 0.46\%$ of neurons) groups showed significant neuronal reduction in comparison to control group ($7.88 \pm 0.18\%$ of neurons) [$F(2,16) = 18.51, P < 0.05$]. A loss of $\sim 76\%$ of neurons was recorded twenty-four hours after lesion, the SCI group reduced to only $1.70 \pm 0.12\%$ of neurons and SHED group to $2.00 \pm 0.04\%$ of neurons [$F(2,16) = 380.47, P < 0.05$]. Although SCI ($1.29 \pm 0.14\%$ of neurons) rats had a further reduction of neurons after forty-eight hours the SHED group ($1.84 \pm 0.04\%$ of neurons) showed a stabilization of neuronal number, being different from SCI group [$F(2,16) = 407.97, P < 0.05$]. Similar results were seen seventy-two hours after SCI ($1.50 \pm 0.23\%$ of neurons) and SHED ($2.61 \pm 0.44\%$ of neurons), with no further neuronal loss [$F(2,16) = 222.54, P < 0.05$]. As seen in Fig. 4A, the progressive neuronal loss that occurs at early stages was reduced by SHED transplantation.

Interestingly, there was no change in the astrocyte numbers six hours after lesion in both SCI and SHED groups ($P > 0.05$) (Fig. 4 B). The number astrocytes decreases at twenty-four hours in SCI ($2.82 \pm 0.28\%$ of astrocytes) and SHED ($3.22 \pm 0.46\%$ of astrocytes) [$F(2,18) = 28.69, P < 0.05$], as well as at forty-eight hours in SCI ($4.26 \pm 0.58\%$ of astrocytes) and SHED groups ($4.99 \pm 0.32\%$ of astrocytes) [$F(2,18) = 9.58, P < 0.05$]. Interestingly, SCI caused an increase of astrocytes measured seventy-two hours after injury ($12.76 \pm 1.11\%$ of astrocytes). The number of astrocytes in the SHED group was kept in basal values ($9.12 \pm 1.33\%$ of astrocytes) when compared to controls at this time point [$F(2,16) = 4.98, P < 0.05$], suggesting that SHED was able to prevent astrocyte hyperplasia in the parenchyma of spinal cord seventy-two hours after contusion.

Measurements of macrophage/microglia, as well as of T cells were performed to evaluate the immune response (Fig. 4 C). In the first twenty-four hours, there was a reduction of macrophage/microglia cells in the spinal cord in both spinalized groups, SCI ($1.88 \pm 0.11\%$ of macrophage/microglia) and SHED ($2.06 \pm 0.25\%$ of macrophage/microglia) [$F(2,18) = 19.85, P < 0.05$]. Forty-eight hours after injury both SCI ($8.15 \pm 0.20\%$ of macrophage/microglia) and SHED groups ($7.82 \pm 0.36\%$ of macrophage/microglia) showed increased macrophage/microglia numbers in comparison to controls ($4.42 \pm 0.57\%$ of macrophage/microglia) [$F(2,17) = 23.68, P < 0.05$]. There was a further increase seventy-two hours after

injury, when both injured groups showed an increase of macrophage/microglia in the spinal cord. SCI ($11.31 \pm 0.98\%$ of macrophage/microglia) and SHED ($11.43 \pm 0.95\%$ of macrophage/microglia) [$F(2,18) = 18.77, P < 0.05$].

As shown in Fig. 4D, there was an increase of T cells measured in the spinal cord only seventy-two hours in the SCI group ($7.01 \pm 1.81\%$ of T cells) in comparison to control group ($2.10 \pm 0.31\%$ of T cells) [$F(2,18) = 6.58, P < 0.05$]. The SHED group remained with normal T cells counts at all times studied, indicating that T cells infiltration was reduced, or blocked, by the SHED transplant.

2.5. TNF- α measurement

The expression of TNF- α was measured six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after lesion to provide one parameter of inflammation process. TNF- α increases in both spinalized groups, SCI ($239.50 \pm 19.89\%$ of control) and SHED groups ($156.80 \pm 12.29\%$ of control) six hours after spinal cord injury [$F(2,17) = 29.69, P < 0.05$] (Fig. 5). However, SHED group showed a significant reduction of TNF- α level at six hours when compared to SCI group. Two peaks of TNF- α was seen at forty-eight hours, SCI ($148.10 \pm 11.29\%$ of control) [$F(2,16) = 4.94, P < 0.05$], as well as at seventy-two hours, SCI ($172.20 \pm 22.34\%$ of control) [$F(2,16) = 6.51, P < 0.05$]. SHED group remained at normal levels at forty-eight hours, ($128.60 \pm 15.97\%$ of control) and showed a significant reduction of TNF- α at seventy-two hours ($99.30 \pm 23.48\%$ of control) as compared to SCI group, a result similar to that of controls. Therefore, grafted SHED was able to reduce the increase of TNF- α levels following spinal injury.

2.6. Neuronal apoptosis

Six hours after injury, double labeled samples with antibodies against MAP-2 and cleaved caspase 3 were subjected to flow cytometry to quantify apoptotic neurons (Fig. 6). Flow cytometry took into account all neurons of the samples and data are presented as percentage of neurons in apoptosis process. There was an increase of neuronal apoptosis in the SCI group ($2.53 \pm 0.46\%$ of neurons) in comparison to control group ($0.73 \pm 0.13\%$ of neurons). However, the transplant of SHED ($1.35 \pm 0.14\%$ of neurons) was able to reduce the percentage of apoptotic neurons (Fig. 6 A-

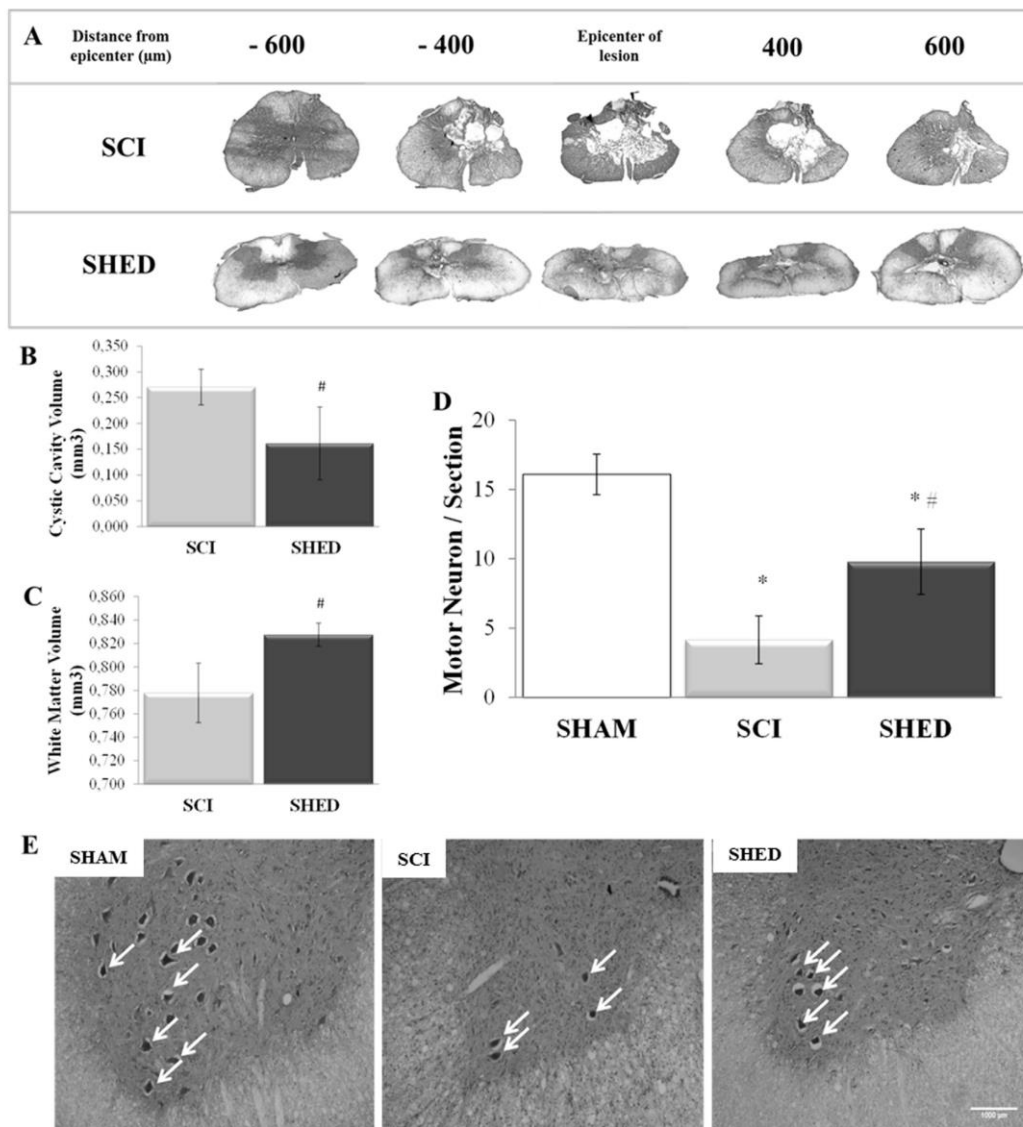


Fig. 3. Morphologic analysis of spinal cord samples. Representative images from cross sections of spinal cord of SCI and SHEDs groups in the epicenter of lesion and at 400 and 600 μm cephalic and caudally away from the epicenter of lesion (A). Volume of the cystic cavity of injured spinal cord of SCI and SHED groups (B). White matter volume of injured spinal cord of SCI and SHED groups (C). Number of motor neurons in the ventral horn of spinal cord of Sham, SCI and SHED groups (D). Representative images of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord of Sham, SCI and SHED groups (E). Data expressed as mean ± SE. ^{*}Difference from the Sham group. [#]Difference from the SCI group.

B) [$F(2,10) = 6.97$, $P < 0.05$]. These confirm that SHED was able to reduce the early neuronal apoptosis in the spinal cord.

2.7. Correlation between anti/pro-apoptotic factors and neuronal apoptosis

Pearson's correlation was run to verify the possible association between apoptotic related factors and neuronal apoptosis. Interestingly, $TNF-\alpha$ levels correlated positively with neuronal apoptosis ($r = 0.547$, $P < 0.05$), i.e., the reduction of $TNF-\alpha$ levels is associated with less neuronal apoptosis. Following this line,

we evaluated the expression of the anti-apoptotic factor BCL-XL six hours after lesion. BCL-XL was reduced in the SCI group ($60.60 \pm 10.78\%$ of control) while in SHED group ($93.70 \pm 7.97\%$ of control) it remained similar to controls (Fig. 7 A-B) [$F(2,10) = 5.21$, $P < 0.05$]. However, no correlation between BCL-XL and neuronal apoptosis was shown ($r = -0.457$, $P > 0.05$). Despite SHED transplantation maintained BCL-XL expression similar to controls, it didn't seem to influence neuronal apoptosis. Nevertheless, SHED was able to reduce the increment of $TNF-\alpha$ and to prevent the early neuronal apoptosis in the spinal cord after contusion.

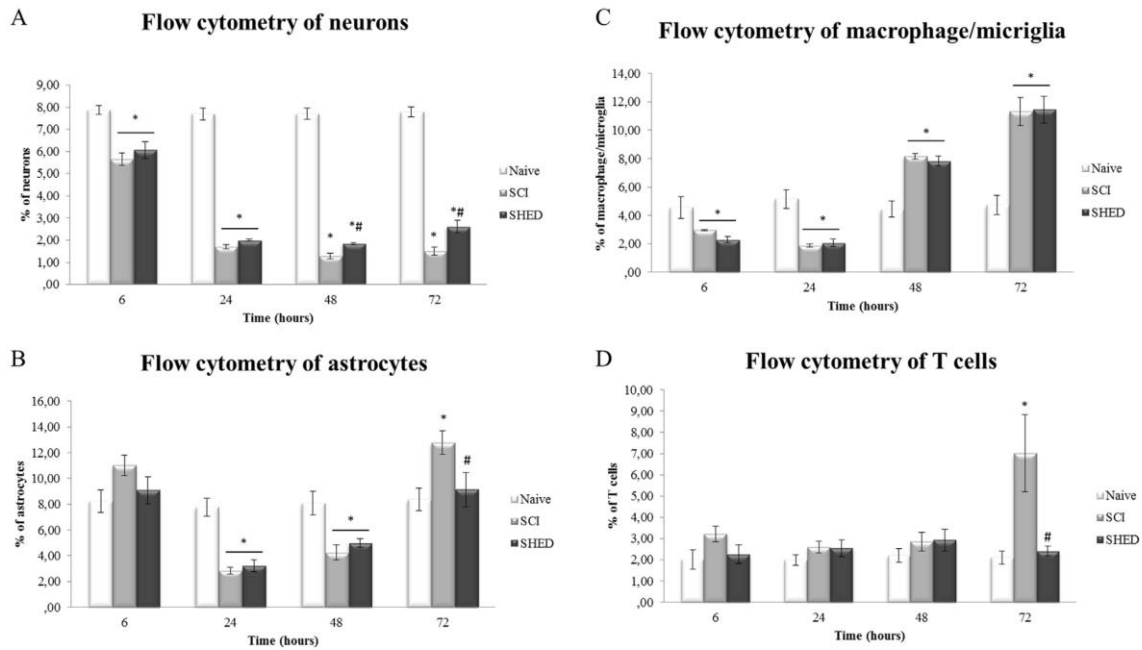


Fig. 4. Flow cytometry of distinct cell types at six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after contusion in the spinal cord of control, SCI and SHED groups. Neurons (A), astrocytes (B), macrophage /microglia (C) and T cells (D). Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group. #Difference from the SCI group.

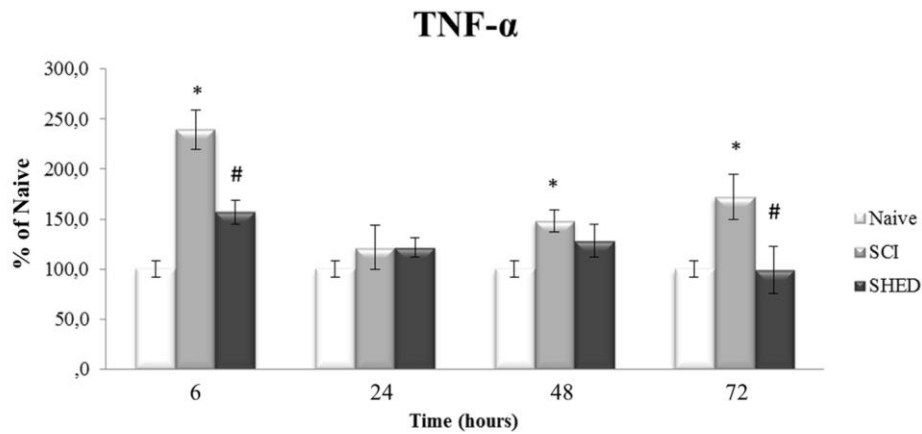


Fig. 5. TNF- α expression at six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after contusion in the spinal cord of control, SCI and SHED groups. Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group. #Difference from the SCI group.

2.8. Expression of EAAT3 and nNOS

The expression of excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) into neurons was assessed by Western Blot. There was an increase of EAAT3 expression in both lesioned groups, SCI group ($755.80 \pm 155.07\%$ of control) and SHED group ($406.50 \pm 67.81\%$ of control) measured six hours after injury; however, EAAT3 was significantly lower in the SHED group (Fig. 7C) when compared to SCI [$F(2,10) = 10.82, P < 0.05$].

To verify the effects of SHED on the expression of nNOS, Western Blot analysis was run six hours after spinal cord lesion. SCI ($203.10 \pm 27.73\%$ of control) and SHED groups

($149.80 \pm 30.22\%$ of control) increased the expression of nNOS. However, SHED presented lower levels in comparison to SCI group (Fig. 7D), i.e., reduced the overexpression of nNOS ($F(2,10) = 13.64, P < 0.05$). Interestingly, this increase in nNOS expression was negatively correlated with that mitochondrial membrane protein BCL-XL expression ($r = -0.646, P < 0.05$) and also correlated positively with neuronal apoptosis ($r = 0.600, P < 0.05$). These indicate an association between the expression of nNOS, the damage of mitochondrial membrane and neuronal apoptosis. Furthermore, a positive correlation was found between EAAT3 expression and nNOS expression ($r = 0.620, P < 0.05$).

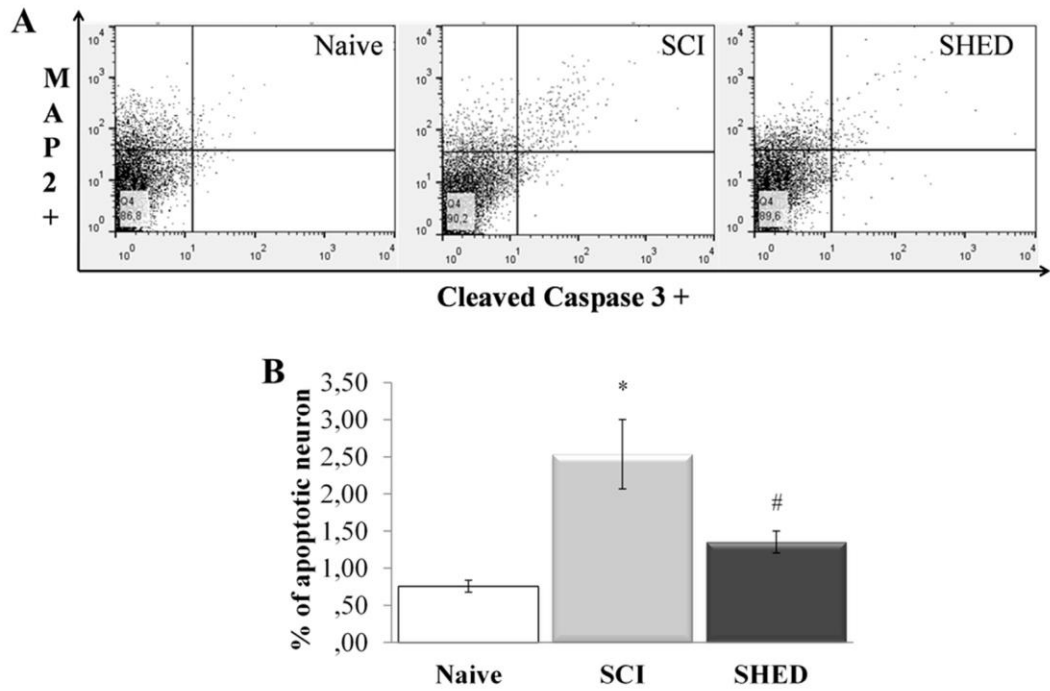


Fig. 6. Flow cytometry to measure apoptotic neurons at six hours in the spinal cord of control, SCI and SHED groups. Representative gates of flow cytometry analysis (A). Apoptotic neurons (double labeled with MAP2 and Cleaved caspase 3) (B). Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group. #Difference from the SCI group.

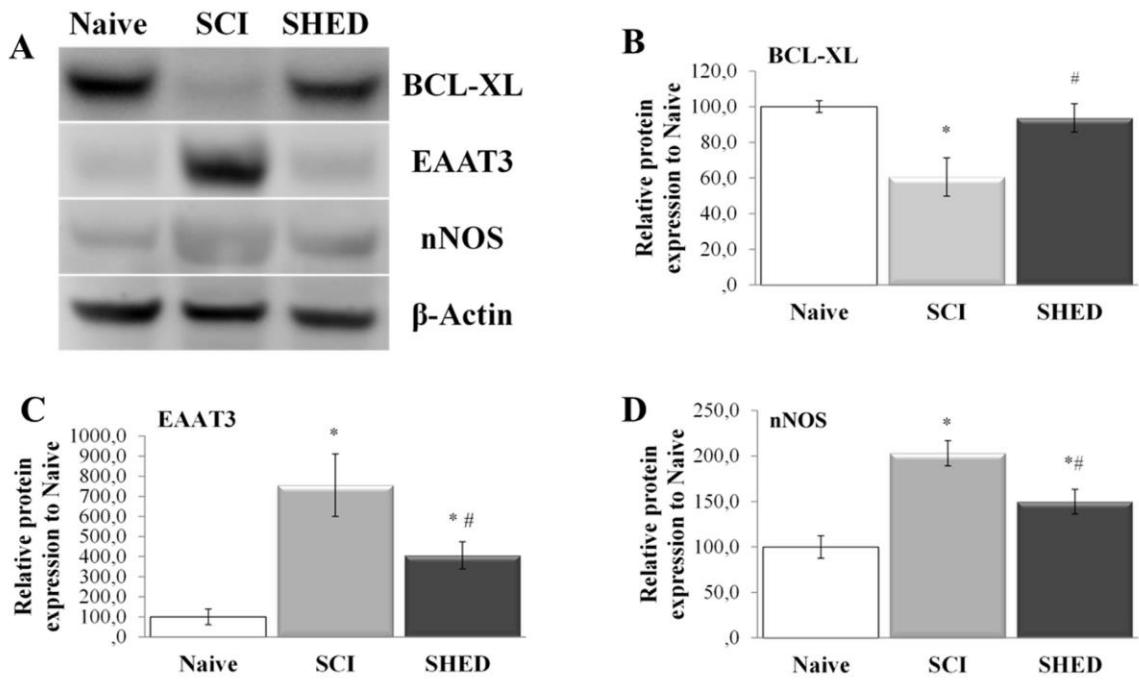


Fig. 7. Western Blots analysis of different proteins assessed six hours after lesion in the spinal cord of control, SCI and SHED groups. Representative images of BCL-XL, EAAT3 and nNOS (A). BCL-XL levels (B). Expression of glutamate transporter EAAT3 (C). Expression of nNOS (D). Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group. #Difference from the SCI group.

3. Discussion

Data presented confirms that human dental pulp stem cells transplantation promotes functional recovery and tissue protection after spinal cord contusion. For the first time, the effects of SHED transplant were assessed in the acute phase of spinal cord injury, starting just six hours after the injury. Results demonstrated that SHED protected neurons against early loss and favored greater motor neurons survival in the ventral horn of spinal cord that lasted for the whole experiment, i.e., six week post lesion. SHED transplantation acted on a variety of mechanisms: reducing astrocytes hyperplasia, T cells entrance and expression of pro-apoptotic factor (TNF- α), as well as keeping the mitochondrial constitutive protein (BCL-XL) at normal levels in spinal tissue. Additionally, SHED transplantation prevented the overexpression of neuronal excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) and of neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Probably the integration and the prolonged survival of SHED into spinal cord parenchyma (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012) contributed to these short and long term effects.

SCI caused functional deficits assessed by the BBB scale (Fig. 2), as expected from the second day after lesion (Basso et al., 1995; Rodrigues et al., 2012; Sakai et al., 2012). The functional recovery promoted by SHED transplantation (de Almeida et al., 2011; Nicola et al., 2016) was confirmed, as depicted in Fig. 2; SHED rats performed better hindlimbs movements than SCI animals from the first week, an improvement that remained significant until the sixth week. The early benefit on functional recovery confirms the potential of SHED transplantation and suggests a neuroprotective effect (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). This hypothesis is reinforced by tissue and neuronal cells preservation.

The functional recovery promoted by SHED treatment can be explained by tissue preservation in the spinal cord six weeks after injury (Fig. 3 A-C), since functional deficits tend to be proportional to the lesion severity, that is, tissue loss causes functional impairment (Basso et al., 1996) and tissue protection promotes functional recovery. Having confirmed tissue preservation, the next step was to evaluate the number of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord. Interestingly, the SHED transplantation was able to reduce motor neuron loss, showing a higher number of these cells than SCI group six weeks after lesion (Fig. 3 D-E); furthermore, the number of motor neurons presented a strong positive correlation with the last-day BBB scores, suggesting that hind limb locomotor ability depends on the survival of motor neurons below the lesion site.

Considering the early functional recovery, already present seven days after contusion, and the higher number of motor neurons in the anterior horn of spinal cord in the treated group, putative mechanisms of the neuroprotection promoted by SHED were investigated (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Firstly, flow cytometry was used to verify the progression and the critical time point where the neuronal loss was occurring. Neuronal loss was shown to be progressive, as previously reported (Casella et al., 2006) and stabilized forty-eight hours after lesion. SHED transplantation was able to reduce such prolonged neuronal loss and stabilized twenty-four hours, earlier than expected. The basal number of neurons is in accordance with previous report (Burish et al., 2010). Additionally, flow cytometry of astrocytes, macrophages/ microglia and T cells was run to verify whether the presence of these cells would be related to neuronal loss in the spinal cord.

Astrocytes, like neurons, die in the acute phase after spinal cord lesion (Casella et al., 2006) and we demonstrated that SHED did not interfere in the early loss of astrocyte cells. The reduction of astrocytes in the spinal cord remained until twenty-four hours; from

that time on there was astrocytic proliferation with a peak at seventy-two hours after lesion, interpreted as hyperplasia (Burda and Sofroniew, 2014). Such proliferation and astrocyte hypertrophy are considered a typical response of the neural tissue to injury that may be intrinsically linked to glial scar formation (Ridet et al., 1997; Sofroniew, 2009). SHED group showed an increase of astrocytes until seventy-two hours where remained equal to control group and different from SCI group, i.e., SHED showed a reduction of the astrocyte proliferation relative to that of SCI group at seventy-two hours. It is important to note that the increment of astrocyte cells occurred seventy-two hours after SCI and probably did not interfere with neuronal death, which was complete twenty-four hours after lesion.

The immune response mediated by macrophages/microglia plays an important role in the secondary spinal cord damage by cell phagocytosis and release of cytokines (David and Kroner, 2011). There is an increase in the number of macrophages/microglia in spinal tissue as evidenced by flow cytometry (Beck et al., 2010). Macrophages/microglia numbers increased progressively in both injured groups, an effect not influenced by SHED transplantation, what corroborated with a previous report (Matsubara et al., 2015). It is known that T cells, peripheral immune cells, infiltrate the injured tissue (Benjelloun et al., 1999) and contribute to cell death at the lesion site by enhancing the inflammatory process (Fathali et al., 2013). Although SHED transplant did not reduce the number of macrophages/microglia, they were able to inhibit the entry of T cells into the spinal parenchyma seventy-two hours post-injury. It is suggested that SHED may be inhibiting chemokine signals that recruit T cells (Jones et al., 2005); further studies are needed to clarify this point.

Pro-inflammatory cytokine TNF- α was assessed in the spinal cord to evaluate if the presence of immune cells in spinal tissue altered the inflammatory responses. The spinal cord showed an overexpression of TNF- α at six hours after lesion, which was reduced by SHED transplantation (Fig. 5), a known effect of mesenchymal stem cells (Nakajima et al., 2012). Although both SCI and SHED groups showed increased numbers of macrophages/ microglia, TNF- α levels remained high until seventy-two hours only in the SCI group; SHED transplantation stabilized TNF- α levels as early as twenty-four hours after lesion. Matsubara and colleagues (2015) described that SHED has the ability to modulate macrophages/microglia function, being able to modify the phenotype of these cells from pro-inflammatory to the anti-inflammatory phenotype (Matsubara et al., 2015).

Apoptosis has been consistently reported as one of the most important mechanisms of cell death after spinal cord injury (Crowe et al., 1997; Emery et al., 1998; Grossman et al., 2001; Liu et al., 1997; Lou et al., 1998; Ríos et al., 2015). Here, neuronal apoptosis was measured by flow cytometry from double labeling against MAP-2 (a neuronal marker) and cleaved caspase 3 (to mark cells undergoing an apoptotic process) six hours after SCI. Caspase 3 is recognized as a starter molecule of the apoptotic pathway (Elmore, 2007) and its expression is widely used to verify apoptosis after SCI (Emery et al., 1998; Ríos et al., 2015). The SHED group presented a smaller number of apoptotic neurons than the SCI group, and this phenomenon probably contributed to the survival of the motor neurons observed in the histology analysis six weeks after SCI (Fig. 3 D-E). To our knowledge, this is the first description of an anti-apoptotic effect of transplanted SHED in this model of spinal cord contusion injury (Fig. 6).

The mechanisms of apoptosis are complex and involve an energy-dependent cascade of molecular events. There are two main apoptotic pathways: the extrinsic, or death receptor pathway, activated by TNF- α ; and the intrinsic or mitochondrial pathway that depends on this organelle membrane integrity (Elmore, 2007). The increase of TNF- α levels after spinal cord contusion

activate the death receptor in the outside of the cellular membrane, which starts the cleavage of caspases and leads to apoptosis (Elmore, 2007; Qiu et al., 2001). At the same time, spinal cord injury decreases the expression of mitochondrial BCL-XL that is a constitutive membrane protein of this organelle (Elmore, 2007; Qiu et al., 2001; Yune et al., 2003). This mitochondrial damage results in loss of mitochondrial function, which releases pro-apoptotic factors, including cytochrome *c* (Holohan et al., 2008). In the cytosol, cytochrome *c* triggers caspase cleavage resulting in apoptosis (Elmore, 2007). Here, SHED kept the BCL-XL levels six hours after SCI (Fig. 7 A-B), probably preventing mitochondrial-mediated apoptosis by maintaining the membrane integrity (Green and Reed, 1998; Holohan et al., 2008; Sawatzky et al., 2006). The maintenance of BCL-XL and the inhibition of over-expression of TNF- α promoted by SHED transplantation probably contributed to decreasing neuronal apoptosis in the spinal cord. However, other mechanisms associated with neuronal death may be subjected to SHED modulation.

Excitotoxic events leading to calcium influx through NMDA receptors as well as inflammatory cytokines, such as TNF- α , may induce apoptosis through the activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Anwar et al., 2016; Blomgren et al., 2007; Holohan et al., 2008), that increases the nitric oxide levels and may result in irreversible damage to mitochondria membrane (Blomgren et al., 2007). Here the expression of nNOS and EAAT3, the excitatory amino acid transporter 3 related to removal of glutamate from the extracellular space were studied. SHED reduced the overexpression of nNOS in the spinal cord what could be favoring the oxide nitric homeostasis (Fig. 7 A, D). Additionally, there was a positive correlation of neuronal apoptosis, nNOS expression and TNF- α levels, that is, the increase of nNOS or/and TNF- α produced greater neuronal apoptosis, reinforcing the idea of an interaction between these two factors and neuronal death. Besides, the increase of excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) in the SCI group can be interpreted as an increased need to capture extracellular glutamate (Fig. 7 A, C); SHED inhibited the EAAT3 overexpression. However, further studies will be needed to shed light on this. The fact is that SHED transplantation one hour after spinal cord injury was capable to reduce the increase of TNF- α , EAAT3 and nNOS expression and it may have contributed to reducing neuronal apoptosis.

Summarizing, the acute transplantation of SHED promoted functional recovery, tissue preservation and long-term motor neuron survival. The neuronal loss occurred progressively after the injury, and the early intervention was crucial to increase neuronal survival in the injured spinal cord. Acute transplantation of SHED modulated a variety of events, contributing to the early reduction in the neuronal loss by apoptosis, promoting a greater number of neurons as from forty-eight hours. Probably the reduction of TNF- α increase, and the overexpression of EAAT3 and of nNOS, with BCL-XL at normal levels contributed to lower neuronal apoptosis. The understanding of mechanisms related to functional recovery caused by SHED transplantation can contribute to the development of new treatment strategies and/or definition of new therapeutic windows for spinal cord contusion.

4. Experimental procedure

4.1. Isolation and culture of SHED

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) were collected, isolated and cultured following the protocol of Bernardi and colleagues (Bernardi et al., 2011). The donor gave written informed consent to participate in the study, which was approved

by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (#296/08).

Dental pulp was removed and incubated at 37 °C for 60 min in buffer containing 0.2% type 1 collagenase (Gibco, USA). Dental pulp cells were removed from the dental parenchyma and cultivated as previously described (Luisi et al., 2007). All pulp tissue was removed (crown and root) from the dentin and the resulting cell suspension was seeded onto a 12-well plate. The culture medium DMEM (Dulbecco's), supplemented with 10% fetal bovine serum (Laborclin, Brazil), was changed 24 h after the initial plating and every 3 or 4 days, thereafter. When 90% confluence was reached, a passage using trypsin-EDTA 0.5% (Sigma-Aldrich, USA) was performed to loosen the cells from the plate. The density seeded cells in each passage was 10^4 cells/cm². Cells of the 5th passage were utilized for cell transplantation and for culture characterization analysis.

4.2. Characterization of SHED by flow cytometry

10^6 cells from cultivated human exfoliated teeth in the 5th passage ($n = 3$) were incubated with the following conjugated antibodies against human cell surface molecules: CD29, CD34 (hematopoietic stem/progenitor cells/endothelium), CD44, CD45, CD73, CD90 (common leukocyte antigens), HLA-DR (human leukocyte antigen, class II), CD14 (monocyte/macrophage), CD184 and STRO-1 (Stromal Cell Surface Marker) (PharMingen-BD Biosciences, USA), conjugated with FITC (Santacruz, USA) or PE (PharMingen-BD Biosciences, USA). Data acquisition was performed using the FACS Aria III flow cytometer (BD Biosciences, USA) and 10,000 events were analyzed using FACS Diva 6.1.3 software (BD Biosciences, USA) (Bernardi et al., 2011).

4.3. Experimental design

Male Wistar rats aged 2 months (200–250 g body weight) were obtained from the Animal House of the Instituto de Ciências Básicas da Saúde of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. They were maintained in a temperature-controlled room (21 ± 2 °C) on a 12/12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. All procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA) and with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University (#26116). The animals were randomly divided into four experimental groups: Naive (without any manipulation) or Surgical control, Sham (laminectomy with no SCI); SCI (laminectomy followed by SCI, treated with vehicle); SHEDs (SCI treated with SHEDs). Three experiments were run: 1) functional long-term assessment of animals was run 2 days after SCI and weekly until the seventh week; at the end of the experiment samples were processed for histological analysis to estimate the cystic cavity volume and the presence of motor neurons in the ventral horn of spinal cord ($n = 8-9$ per group); 2) six, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after contusion, flow cytometry analysis was run to quantify neurons, astrocytes, macrophages/microglia and T cells in the spinal cord; a pro-inflammatory cytokine (TNF- α) was measured by ELISA at the same time points to show a parameter of inflammation over time in the spinal cord ($n = 7$ per group); 3) for the short-term, apoptotic neurons were quantified by flow cytometry and some key proteins related to cell death were measured by Western Blot six hours after SCI ($n = 5-6$ per group). For the first experiment, Sham animals were used as controls; in the second and in the third experiments Naive animals were used as controls, aiming to reduce the number of experimental animals. There was a 10% death rate after the surgical procedure. Animal care was in accordance with the Multicen-

ter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS) protocols (Weeks and Hart, 2004). The experimental design is depicted in Fig. 1.

4.4. Spinal cord injury and SHED transplant

The animals were previously anesthetized with a mixture of xylazine (100–150 mg/kg) and ketamine (60–90 mg/kg). Laminectomy was performed at the level of 9th thoracic vertebra (T9) and injury was induced through the drop of a 10 g weight from 25 mm height by the use of New York University Impactor device (NYU-Impactor[®]; W.M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, USA) (Park et al., 2013). The SHED group received the administration of 3×10^5 cells diluted in 0.9% NaCl. 10- μ L of cell suspension injected at the lesion site 1 h after the injury with a 25- μ L sterile Hamilton syringe, and carried out without immunosuppression (Xavier Acasigua et al., 2014). Animals were sutured following the surgical procedure and housed in individual cages; bladder evacuation was performed daily until function was restored. Antibiotic (Enrofloxacin, Bayer, Brazil; 6 mg/kg) was administered for 7 days after the procedure to prevent infection.

4.5. Locomotor activity assessment

Behavior was recorded in an open field and following this, the motor function of the hind limbs was evaluated using the Basso, Beattie, and Bresnahan scale (BBB), which assesses hind limb motor function with scores ranging from 0 (complete paralysis) to 21 (normal locomotion) (Basso et al., 1995). Evaluation began 2 days before injury or laminectomy (in the Sham group) and was repeated 2 days after, and then weekly until the sixth week after SCI. A video recording was observed for scale scoring by two examiners who were blind to the animal's treatments (Basso et al., 1995).

4.6. Morphologic analysis

Animals were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil) followed by transcardiac perfusion with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.4). The spinal cord was removed from C5 to L5 in the thoracic region, post-fixed in the same fixative solution and cryoprotected with 15% and 30% sucrose diluted in phosphate buffer saline (PBS). After cryoprotection, the samples were frozen in isopentane and cooled in liquid nitrogen until slicing (Rodrigues et al., 2012). For histological and immunohistochemistry analysis, the thoracic region of the spinal cord was transversally cut into 20 μ m sections in cryostat (Leica, Germany). The sections were stained with hematoxylin and eosin and the images were captured using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Japan) coupled with a digital camera.

Thirty transversal 20 μ m sections from each animal were processed to estimate the cavitation area and the number of motor neurons. Sequential sections with an interval of 300 μ m were collected. The cavitation area in each sequential slice was determined and the largest cavitation area slice (called the epicenter) of each rat was determined. The cavitation area was estimated using the software Image J v. 1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>); any necrotic tissue within the cavities was considered as part of the lesion and the total sum of areas was measured. Six sequential slices below the lesion epicenter were used to assess the number of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord.

4.7. Flow cytometry analysis

The spinal cords were dissociated with Trypsin/PBS (0.006 g/mL) (Sigma-Aldrich – T2600000) and the cells were then perme-

abilized with 0.1% PBS Triton X-100 for 10 min at room temperature, blocked for 15 min with 3% normal goat serum (Sigma-Aldrich – G9023). After blocking, the cells were incubated with primary antibodies, against neuron MAP-2 (Mouse, Sigma Aldrich – M4403), against astrocyte GFAP (Rabbit, Sigma Aldrich – G4546 or Mouse, G3893, Sigma Aldrich), against macrophage/microglia CD11b (Mouse, Millipore – CBL1512), against T cells CD3 (Rabbit, Sigma Aldrich – C7930). For neuronal apoptosis the cells were double labeled with MAP-2 (Mouse, Sigma Aldrich – M4403) and Cleaved caspase 3 (Rabbit, Cell Signalling – #9661), an apoptosis cell marker at final concentration of 1:100 at room temperature for 2 h. The cells were washed twice with PBS and incubated for 1 h with IgG antibody Alexa-fluor 633 anti-rabbit and IgG antibody Alexa-fluor 488 anti-mouse, at a final concentration of 1:200. Negative controls (samples with the secondary antibody) were included for setting up the machine voltages and to determine the negative region of dot plot. The emission of fluorochromes was recorded through a specific band-pass fluorescence filter: red (FL-4; 670 nm long pass) or green (FL-1; 488 nm long pass). Fluorescence emissions were collected using logarithmic amplification. Data from 10,000 events (intact cells) were acquired and the number of cells was determined after exclusion of debris events from the data set. The number of cells in each quadrant was computed and cells stained separately was expressed as the percentage of positive immune labeled cells (Heimfarth et al., 2013). All flow cytometric acquisitions and analyses were performed using FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and Flow Jo software v10.1 (Weis et al., 2012).

4.8. Quantification of TNF-alpha

TNF- α concentration in the spinal cord tissue was measured by using TNF- α ELISA kit (eBioscience, Ref. 88-7340, San Diego, USA), according to the manufacturer's protocol.

4.9. Western blotting

Tissue was homogenized in ice-cold lysis buffer (10 mM KCl, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.6 mM EDTA, 1% NP 40, 1% Triton-X, 1% sodium deoxycholate, 1% glycerol, and 1% protease inhibitor cocktail) pH 7.9, and centrifuged at 1000g for 30 min. Equal protein concentrations (40 μ g/lane of total protein, determined using a commercial kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, U.S.A]) were loaded onto NuPAGE[®] 4–12% Bis-Tris Gels and subsequently transferred (XCell SureLock[®] Mini-Cell, Invitrogen) to nitrocellulose membranes for 1 h in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% SDS) (Arcego et al., 2016). The blot was incubated 2 h in blocking solution [Tris-buffered saline (TBS; 0.14 M NaCl, 2.4 mM Trizma, pH 7.7) plus 5% bovine serum albumin], followed by incubation overnight at 4 °C in a blocking solution containing one of the following antibodies, at a final dilution of 1:1000: anti-BCL-XL (Rabbit, Cell Signaling – #2762), anti-EAAT3 (Mouse, Millipore – MAB1587), anti-nNOS (Rabbit, Cell Signaling – #4234) and anti- β -actin (Rabbit, Cell Signaling – #4967). The blot was then washed three times for 5 min with Tween-TBS and incubated for 2 h in solution containing peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (GE Life Sciences – RPN4301) or anti-mouse IgG (Millipore – 402335) diluted 1:1000. The blot was washed again three times for 10 min with Tween-TBS and once for 10 min with TBS. The signal was detected using a chemiluminescence ECL Kit (GE Life Sciences – RPN2109). Immunoblots were quantified by scanning the membranes in ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences – United Kingdom) and determining optical densities through Image Studio Lite V5.0 (LI-COR Biosciences – US). Results were expressed as the ratio of

intensity of the protein of interest to that of anti- β -actin from the same membrane.

4.10. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA was used to analyze quantitative data, followed by Duncan *post hoc* test to reveal differences between the groups whenever indicated. Correlation coefficients (r) were calculated by Pearson's correlation. Significance was assumed at $P < 0.05$. All analyses were carried out using IBM SPSS Statistics software v.19.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Stem Cell Research Institute.

References

- Achilleos, A., Trainor, P.A., 2012. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res.* 22, 288–304.
- Anderson, D.K., Hall, E.D., 1993. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann. Emerg. Med.* 22, 987–992.
- Anderson, D.K., Saunders, R.D., Demediuk, P., Dugan, L.L., Braughler, J.M., Hall, E.D., Means, E.D., Horrocks, L.A., 1985. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent. Nerv. Syst. Trauma* 2, 257–267.
- Anwar, M.A., Al Shehaby, T.S., Eid, A.H., 2016. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 98.
- Arcego, D.M., Krolow, R., Lampert, C., Toniazco, A.P., Berlitz, C., Lazzaretti, C., Schimitz, F., Rodrigues, A.F., Wyse, A.T.S., Dalmaz, C., 2016. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: interplay of these factors changes these effects. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 50, 16–25.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* 139, 244–256.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12, 1–21.
- Beck, K.D., Nguyen, H.X., Galvan, M.D., Salazar, D.L., Woodruff, T.M., Anderson, A.J., 2010. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: Evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain* 133, 433–447.
- Benjelloun, N., Renolleau, S., Represa, A., Ben-Ari, Y., Charriaud-Marlangue, C., 1999. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal rat. *Stroke* 30, 1916–1923–1924.
- Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Dalberto, T.P., Valentim, L., Bogo Chies, J.A., Medeiros Fossati, A.C., Pranke, P., 2011. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J. Endod.* 37, 973–979.
- Blomgren, K., Leist, M., Groc, L., 2007. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* 12, 993–1010.
- Braughler, J.M., Hall, E.D., 1989. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 289–301.
- Burda, J.E., Sofroniew, M.V., 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–248.
- Burish, M.J., Peebles, J.K., Baldwin, M.K., Tavares, L., Kaas, J.H., Herculano-Houzel, S., 2010. Cellular scaling rules for primate spinal cords. *Brain Behav. Evol.* 76, 45–59.
- Casella, G.T.B., Bunge, M.B., Wood, P.M., 2006. Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp. Neurol.* 202, 8–20.
- Chesler, M., Young, W., Hassan, A.Z., Sakatani, K., Moriya, T., 1994. Elevation and clearance of extracellular K^+ following graded contusion of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 125, 93–98.
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., Beattie, M.S., 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.* 3, 73–76.
- David, S., Kroner, A., 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 388–399.
- de Almeida, F.M., Marques, S.A., Ramalho, B.D.S., Rodrigues, R.F., Cadihne, D.V., Furtado, D., Kerkis, I., Pereira, L.V., Rehen, S.K., Martinez, A.M.B., 2011. Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 28, 1939–1949.
- De Berdt, P., Vanacker, J., Ucakar, B., Elens, L., Diogenes, A., Leprince, J.G., Deumens, R., des Rieux, A., 2015. Dental apical papilla as therapy for spinal cord injury. *J. Dent. Res.* 94, 1575–1581.
- Dorsett, C.R., McGuire, J.L., DePasquale, E.A.K., Gardner, A.E., Floyd, C.L., McCullumsmith, R.E., 2016. Glutamate neurotransmission in rodent models of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 10, 1–10.
- Ducker, T.B., Kindt, G.W., Kempf, L.G., 1971. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J. Neurosurg.* 35, 700–708.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Emery, E., Aldana, P., Bunge, M.B., Puckett, W., Srinivasan, A., Keane, R.W., Bethea, J., Levi, A.D., 1998. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 89, 911–920.
- Fathali, N., Ostrowski, R.P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., Zhang, J.H., 2013. Splenic immune cells in experimental neonatal hypoxia-ischemia. *Transl. Stroke Res.* 4, 208–219.
- Ge, R., Zhu, Y., Diao, Y., Tao, L., Yuan, W., Xiong, X.C., 2013. Anti-edema effect of epigallocatechin gallate on spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 1527, 40–46.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. [Review] [59 refs]. *Science* (80-) 281, 1309–1312.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., Denbesten, P., Robey, P.G., Shi, S., 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81 (8), 531–535.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., Shi, S., 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630.
- Grossman, S.D., Rosenberg, L.J., Wrathall, J.R., 2001. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp. Neurol.* 168, 273–282.
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Petenuzzo, L., de Lima, B.O., Fernandes, C.G., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2013. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. *Neurotoxicology* 34, 175–188.
- Holohan, C., Szegezdi, E., Ritter, T., O'Brien, T., Samali, A., 2008. Cytokine-induced β -cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL: apoptosis. *J. Cell Mol. Med.* 12, 591–606.
- Jones, T.B., Hart, R.P., Popovich, P.G., 2005. Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 6576–6583.
- Kurihara, M., 1985. Role of monoamines in experimental spinal cord injury in rats. Relationship between Na^+ - K^+ -ATPase and lipid peroxidation. *J. Neurosurg.* 62, 743–749.
- Lee, J., Thumbikat, P., 2015. Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surgery*, 1–10.
- Liu, X.Z., Xu, X.M., Hu, R., Du, C., Zhang, S.X., McDonald, J.W., Dong, H.X., Wu, Y.J., Fan, G.S., Jacquin, M.F., Hsu, C.Y., Choi, D.W., 1997. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5395–5406.
- Lou, J., Lenke, L.G., Ludwig, F.J., O'Brien, M.F., 1998. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord Off. J. Int. Med. Soc. Paraplegia* 36, 683–690.
- Luisi, S., Barbachan, J., Chies, J., Filho, M., 2007. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor- β 1 and acidic fibroblast growth factor in culture. *J. Endod.* 33, 833–835.
- Matsubara, K., Matsushita, Y., Sakai, K., Kano, F., Kondo, M., Noda, M., Hashimoto, N., Imagawa, S., Ishiguro, N., Suzumura, A., Ueda, M., Furukawa, K., Yamamoto, A., 2015. Secreted ectodomain of sialic acid-binding ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J. Neurosci.* 35, 2452–2464.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S., 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807–5812.
- Nakajima, H., Uchida, K., Guerrero, A.R., Watanabe, S., Sugita, D., Takeura, N., Yoshida, A., Long, G., Wright, K.T., Johnson, W.E.B., Baba, H., 2012. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 29, 1614–1625.
- Nicola, F.C., Rodrigues, L.P., Crestani, T., Quintiliano, K., Sanches, E.F., Willborn, S., Aristimunha, D., Boisserand, L., Pranke, P., Netto, C.A., 2016. Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 49, 1–11.
- Park, D.Y., Mayle, R.E., Smith, R.L., Corcoran-Schwartz, I., Kharazi, A.J., Cheng, L., 2013. Combined transplantation of human neuronal and mesenchymal stem cells following spinal cord injury. *Glob. Spine J.* 3, 1–6.
- Qiu, J., Nesic, O., Ye, Z., Rea, H., Westlund, K.N., Xu, G.Y., McAdoo, D., Hulsebosch, C. E., Perez-Polo, J.R., 2001. Bcl-xL expression after contusion to the rat spinal cord. *J. Neurotrauma* 18, 1267–1278.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.
- Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Santander, I., Barón-Flores, V., Caram-Salas, N., Diaz-Ruiz, A., 2015. Anti-apoptotic effects of dapsone after spinal cord injury in rats. *Neurochem. Res.* 40 (6), 1243–1251.

- Rodrigues, L.P., Iglesias, D., Nicola, F.C., Steffens, D., Valentim, L., Witczak, A., Zanatta, G., Achaval, M., Pranke, P., Netto, C.A., 2012. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 49–57.
- Rowland, J.W., Hawryluk, G.W.J., Kwon, B., Fehlings, M.G., 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus* 25, E2.
- Sadowsky, C., Volshteyn, O., Schultz, L., McDonald, J.W., 2002. Spinal cord injury. *Lancet* 359, 417–425.
- Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., Ueda, M., 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J. Clin. Invest.* 122, 80–90.
- Sawatzky, D.A., Willoughby, D.A., Colville-Nash, P.R., Rossi, A.G., 2006. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am. J. Pathol.* 168, 33–41.
- Sharma, H.S., Olsson, Y., 1990. Edema formation and cellular alterations following spinal cord injury in the rat and their modification with p-chlorophenylalanine. *Acta Neuropathol.* 79, 604–610.
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Taghipour, Z., Karbalaie, K., Kiani, A., Niapour, A., Bahramian, H., Nasr-Esfahani, M. H., Baharvand, H., 2012. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev.* 21, 1794–1802.
- Weeks, J., Hart, R.P., 2004. SCI-Base: an open-source spinal cord injury animal experimentation database. *Lab Anim. (NY)* 33, 35–41.
- Weis, S.N., Pettenuzzo, L.F., Krolow, R., Valentim, L.M., Mota, C.S., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., 2012. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 12, 271–279.
- Xavier Acasigua, G., Bernardi, L., Braghiroli, D., Filho, M., Pranke, P., Medeiros Fossati, A., 2014. Nanofiber scaffolds support bone regeneration associated with pulp stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9, 330–337.
- Young, W., Koreh, I., Yen, V., Lindsay, A., 1982. Effect of sympathectomy on extracellular potassium ionic activity and blood flow in experimental spinal cord contusion. *Brain Res.* 253, 115–124.
- Yune, T.Y., Chang, M.J., Kim, S.J., Lee, Y.B., Shin, S.W., Rhim, H., Kim, Y.C., Shin, M.L., Oh, Y.J., Han, C.T., Markelonis, G.J., Oh, T.H., 2003. Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma* 20, 207–219.
- Zhu, C., Wang, X., Qiu, L., Peeters-Scholte, C., Hagberg, H., Blomgren, K., 2004. Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J. Neurochem.* 90, 462–471.

3.3 *Capítulo II*

Manuscrito: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth modulates early astrocyte response after spinal cord contusion – a ser submetido à revista Neuroscience.

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth modulates early astrocyte response after spinal cord contusion

Fabrizio do Couto Nicola^{1,2}, Marília Rossato Marques^{1,2}, Felipe Odorcyk^{1,2}, Letícia Petenuzzo², Dirceu Aristimunha², Adriana Vizuet², Eduardo Farias Sanches², Daniela Pavulack Pereira³, Natasha Maurmann³, Carlos-Alberto Gonçalves², Patricia Pranke^{3,4}, Carlos Alexandre Netto²

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Post Graduate Program in Neuroscience, Porto Alegre, Brazil

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Biochemistry, Porto Alegre, Brazil

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hematology and Stem Cell Laboratory, Porto Alegre, Brazil

⁴Stem Cell Research Institute, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author: Fabrizio do Couto Nicola, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Ramiro Barcelos, 2600 anexo, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-003, Brazil. Phone/FAX: 0055-051 33085568.

E-mail: fabricionicola@hotmail.com

Abstract

Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) has been proposed as a possible treatment strategy for spinal cord injuries (SCI) due to its potential for promoting tissue protection and functional recovery. The aim of present study was to investigate the effects of the early transplantation of SHED on progenitor cells number, glial scar formation and astrocytic reaction after an experimental model of SCI. Methods: Wistar rats were spinalized using NYU impactor. Animals were randomly distributed into 3 groups: Control (Naive) (animal without manipulation); SCI (laminectomy followed by SCI, treated with vehicle); SHED (SCI treated with intraspinal transplantation of 3×10^5 SHED, 1 h after SCI). Six, twenty-four and forty-eight hours after lesion, the Flow Cytometry to vimentin + cells was performed to verify the number of neural progenitor cells; and, ELISA technique was run to quantify the expression of GFAP and S100B in the spinal cord samples. Six hours after contusion, Western Blot was run to verify the expression of aquaporin 4 and Kir 4.1 in the spinal cord tissue. Immunofluorescence, Flow Cytometry and Dot Blot of SHED in the culture phase were run to confirm the presence and the possible release of S100B in the medium. Twenty-four, forty-eight hours after lesion, SHED group increased the number of cells expressing vimentin in the spinal cord. SHED were able to reduce the early glial scar formation, reducing GFAP, and promote early astrocyte reaction, increasing the expression of inward rectifying potassium channel (Kir). *In vitro*, SHED showed express vimentin and calcium binding protein (S100B), which may be contributing as paracrine signaling to tissue modifications.

Key words: Spinal cord injury, human dental pulp stem cells, glial scar formation, progenitor cells.

1. Introduction

Spinal cord injury (SCI) is an incapacitating condition that disconnects axons of neuronal cells, promoting deficits such as the loss of voluntary movements and sensation; its worldwide incidence is 10 to 49 individuals per million (Lee et al., 2014). The primary injury is caused by traumatic spinal cord damage, that is difficult to be prevented or treated (Oyinbo, 2011); after that, a cascade of events known as secondary injury will destroy neurons that were not damaged in the primary one (Cerqueira et al., 2013). Cell death caused by spinal cord injury involves neurons, glial cells and progenitor cells present in the spinal cord (Casella et al., 2006; Nicola et al., 2017; Seki et al., 2007). These events are mediated mainly by microglial cells, that regulate inflammation and phagocyte debris, and by astrocytes, that proliferate and act in the formation of the glial scar (Beck et al., 2010; Burda and Sofroniew, 2014). The natural replacement of progenitor cells after spinal cord lesion leads to the production of new glial cells, which can be considered a potential therapeutic target (Seki et al., 2007).

Astrocyte proliferation and migration can be seen as from seventy-two hours after the injury (Nicola et al., 2017) and the characteristic hypertrophy is a consequence of the increased expression of intermediate filaments, such as the glial fibrillary acidic protein (GFAP), a process named reactive astrocytosis or astrogliosis (Ridet et al., 1997; Sofroniew, 2009). Astrocytes bear unique and dynamic cytoarchitecture and phenotypic features activated by changes in the microenvironment. They express a wide range of receptors and ion channels that, interconnected with glial cells and neurons, regulate the water transport across membranes in response to osmotic gradients by the water aquaporin 4 channel (Nesic et al., 2010; Saadoun and Papadopoulos, 2010; Tait et al., 2008), or by buffering the potassium ion through Kir 4.1, an inward rectifying potassium channel (Kir) that removes potassium from extracellular medium (Allaman et al., 2011; Butt and Kalsi, 2006; Nichols and Lopatin, 1997; Sibille et al., 2014). Along with that, astrocytes can also stimulate cell proliferation, migration and

differentiation via the production and release of calcium-binding protein B (S100B) (Donato et al., 2013; Raponi et al., 2007).

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) are self-renewing mesenchymal stem cells (MSCs), found within the perivascular niche of the dental pulp (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003), that have been shown to reduce the early neuronal death (Nicola et al., 2017) and to promote functional recovery after engrafting into lesioned spinal cord (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Such effects have been suggested to involve paracrine mechanisms that activate endogenous tissue repairing pathways (Matsubara et al., 2015; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Previous reports show the involvement of SHED in the secretion of specific proteins to regulate the phenotype of macrophage cells (Matsubara et al., 2015) as well as the reduction of early inflammatory response and apoptosis, resulting in long-term motor neurons survival/preservation (Nicola et al., 2017).

The present study was designed to verify the effects of SHED transplantation, one hour after spinal cord contusion, on tissue astrocyte reaction and on precursor cells proliferation in the acute phase of lesion; in addition, the potential of SHED to express neural, glial and precursor proteins in the *in vitro* phase was studied. The working hypothesis is that SHED will express glial and precursor cells proteins *in vitro*, and that after transplantation, they will reduce the early hypertrophy of astrocytes and stimulate the progenitor cells proliferation in the spinal cord of injured rats.

2. Results

2.1. *In vitro* SHED characteristics

Immunofluorescence was run to verify the phenotype of SHED for specific proteins in the culture phase. As pictured in Figure 1, SHED did not express neuronal protein β III-Tubulin and astrocyte GFAP; however, they expressed vimentin, a protein of quiescent neural progenitors and astrocytes, as well as S100B, which is found in astrocytes and oligodendrocytes. These results may indicate that SHED are promoting paracrine signaling by the release of S100B. Interestingly, SHED presented 54.22 ± 5.93 % of S100B+ cells from flow cytometry analysis (Fig. 2 A, B and C). Dot Blot confirmed the presence of S100B in the SHED, as well as in the SHED medium, what suggests they could be actually releasing S100B (Fig. 2 D).

2.2. *Spinal cord vimentin+ cells*

Vimentin+ cells were quantified six, twenty-four and forty-eight hours after lesion to the spinal cord to provide a measure of progenitor cells. There was an increase of vimentin+ cells in the spinal cord six hours after the injury in the SCI group (2.35 ± 0.17 % of vimentin+ cells) and in the SHED group (1.85 ± 0.17 % of vimentin+ cells), as compared to naive rats (0.86 ± 0.08 % of vimentin+ cells) (Fig. 3) [$F(2,16) = 23.31$, $P < 0.05$]. SHED presented increased number of vimentin+ cells in the spinal cord tissue twenty-four (2.64 ± 0.15 % of vimentin+ cells) and forty-eight hours after lesion (2.26 ± 0.12 % of vimentin+ cells). It is suggested that SHED influenced the cell proliferation of vimentin+ cells or induced the vimentin protein expression in cells that were not expressing it before, or both.

2.3. GFAP and S100B expression

ELISA to evaluate the GFAP and S100B expression in spinal cord tissue was run six, twenty-four and forty-eight hours after lesion. Six hours after lesion, SCI ($32 \pm 11.76\%$ of GFAP expression) and SHED groups ($49.92 \pm 7.10\%$ of GFAP expression) had reduced expression of GFAP in comparison to the Naive group ($100 \pm 13.71\%$ of GFAP expression) (Fig. 4 A) [F(2.19) = 5.00, P < 0.05]. A further loss of GFAP was evidenced twenty-four hours in both spinalized groups, SCI ($50.55 \pm 8.21\%$ of GFAP expression) and SHED ($60.74 \pm 8.21\%$ of GFAP expression) (Fig. 4 A) [F(2.19) = 4.10, P < 0.05]. Interestingly, SCI caused an increase of GFAP expression measured forty-eight hours after lesion, recording $264.04 \pm 37.38\%$ of GFAP expression, while the SHED group ($170.04 \pm 15.20\%$ of GFAP expression) did not differ from Naive rats ($100.00 \pm 28.28\%$ of GFAP expression) (Fig. 4 A) [F(2.19) = 8.27, P < 0.05]. The early over expression of this protein was reduced by SHED, suggesting that transplanted cells were able to prevent, or reduce, astrocytic hypertrophy. As regards to S100B, it was reduced only twenty-four hours after lesion in the SCI group ($76.16 \pm 1.55\%$ of S100B expression) [F(2.18) = 3.60, P < 0.05] and in forty-eight hours in the SHED group ($69.35 \pm 5.28\%$ of S100B expression) (Fig. 4 B) [F(2.18) = 6.68, P < 0.05]. This result shows that SHED was able to delay the reduction of S100B seen 24h after SCI.

2.4. Astrocyte AQP4 and Kir4.1 expression

The contents of AQP4 and Kir4.1 were studied six hours after spinal cord injury by Western Blot of (Fig. 5 A). The AQP4 expression was reduced both in SCI ($82.72 \pm 12.89\%$ of control) and SHED ($82.52 \pm 1.67\%$ of control) groups (Fig. 5 B) [F(2.12) = 3.90, P < 0.05]. Interestingly, the Kir4.1 expression remained in control levels in the SCI group ($104.33 \pm 34.27\%$ of control) while SHED transplantation caused an increase of expression ($158.37 \pm 30.12\%$ of control) (Fig. 5 C) [F(2.13) = 5.48, P < 0.05]. These results indicate that SHED

transplantation, although not affecting AQP4, the main brain water channel, caused an increase in the expression of the inward rectifier potassium channel Kir4.1.

3. Discussion

The effects of SHED transplantation on tissue astrocytic cells in the acute phase of spinal cord injury, for the first time, were assessed starting just six hours after the injury. Results demonstrated that SHED protected the spinal cord against astrocytic hyperplasia as from forty-eight hours, promoted a delay in the reduction of calcium-binding protein S100B between twenty-four and forty-eight hours, and favored the increment of progenitor cells, increasing the number of vimentin+ cells in the spinal cord, at least until forty-eight hours. Tissue astrocytic cells showed to be modified after SHED transplantation, as increasing the expression of the inward rectifying potassium channel Kir4.1. Tissue astrocytes modifications probably have been induced by the release of S100B protein, a protein found in the culture phase of SHED as well as the expression of vimentin.

Adult spinal cord presents multiple populations of progenitor cells in the ependymal region and in the parenchyma (Blades et al., 1998; Seki et al., 2007; Yamamoto et al., 2001). In response to a spinal cord lesion, these progenitor cells are rapidly replaced by a second quiescent stem/progenitor population (Seki et al., 2007), which are suggested as a therapeutic target to be stimulated to proliferate (Obermair et al., 2008), aiming better tissue response and functional recovery after spinal cord contusion (Yamamoto et al., 2001). The vimentin is a protein present in quiescent neural progenitors and astrocytes cells (Blades et al., 1998; Encinas et al., 2006) that up-regulates after spinal cord injury, and this increase in the adult rodent spinal cord may signify a reversion to an earlier developmental state of these cells, which may facilitate the axonal growth and the plasticity (Blades et al., 1998). Six hours after lesion, vimentin was increased, remaining at high levels until forty-eight hours. SHED transplantation

increased the number of vimentin cells, overexpressing vimentin+ cells from twenty-four, maintaining until forty-eight hours, which may mean an increase of tissue plasticity.

Spinal cord injury leads to astrocytes proliferation and hypertrophy by GFAP upregulation (Frisén et al., 1995; Nicola et al., 2017). Tightly interweave of their processes helps in the glial scar formation, which inhibits the neurite outgrowth and restricts axonal regeneration (Ahuja et al., 2017; Frisén et al., 1995; McKeon et al., 1991). For decades, the reduction of the glial scar has been a goal for SCI (Xu et al., 2015); however, their ablation leads to increase neuron and oligodendrocyte loss with reduction of hind limbs motor performance (Faulkner, 2004). A reduction of GFAP expression was seen twenty-four hours after lesion, as expected by natural astrocyte loss at this time (Casella et al., 2006; Nicola et al., 2017); interestingly, there was an increase of GFAP expression forty-eight hours, which SHED transplantation was able to keep at normal levels. The reduction of GFAP expression was confirmed in a late phase of spinal cord contusion, without neuronal and functional impairments, contrariwise, promoting neuronal survival and functional recovery (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012). The reduced GFAP expression, as seen here, suggests an early inhibitory action of SHED on glial scar formation after SCI.

Calcium binding protein S100B as GFAP have been suggested as a good marker for central nervous system damage and SCI (Lee et al., 2010; Vos et al., 2010). There was a reduction of S100B expression twenty-four hours after injury, returning to normal levels at forty-eight hours. SHED transplantation slows this decline of S100B twenty-four hours, confirming the drop in levels only at forty-eight hours, being different from the Naive group. To our knowledge, this is the first description of S100B measurement in the intracellular medium at six, twenty-four and forty-eight hours after lesion. The result expected is a raise of tissue S100B from seventy-two hours (Do Carmo Cunha et al., 2007); however, it was a limitation of the present study that took the experiments up to forty-eight hours.

Besides GFAP and S100B, key astrocyte proteins as water channel protein aquaporin-4, related with edema (Chen et al., 2016; Saadoun and Papadopoulos, 2010) and inward rectifying potassium channel Kir4.1, related to the withdrawal of potassium from the extracellular medium (Butt and Kalsi, 2006; Hibino et al., 2010), were evaluated six hours after lesion. The spinal cord injury reduces the AQP4 levels in the spinal tissue in the acute phase (Nesic et al., 2006), corroborating with the results presented here. At six hours SHED were not able to prevent the loss of AQP4 in the spinal tissue, suggesting no influence of SHED on AQP4, i.e., no interference in the formation of edema. Both AQP4 and Kir4.1 may be coexpressed in the central nervous system (Nagelhus et al., 2004), and a wide-spread and loss of Kir4.1 is expected after 7 days of spinal lesion (Olsen et al., 2010). Six hours after injury, SCI group kept normal levels of Kir4.1 in the spinal cord while SHED provided an increase, i.e., probably there was an increase of potassium inward from extracellular medium to intracellular medium of astrocyte, which favors the neuroprotection described previously (Nicola et al., 2017; Sakai et al., 2012) by reducing the neuronal excitability (Butt and Kalsi, 2006).

There were some astrocyte modifications after SHED transplant in the spinal cord. To evaluate how SHED might be interfering in these modifications, the immunofluorescence, flow cytometry and dot blot were run in the *in vitro* phase. SHED express protein related to neuroprotection, axonal elongation (Matsubara et al., 2015) and neural progenitor cells such as nestin (Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012), and here, labeled with vimentin, a cytoskeletal component found in immature neural cells (Encinas et al., 2006). The expression of mature neuronal cells and GFAP proteins by SHED are controversial in the literature (Ellis et al., 2014; Sakai et al., 2012); here, they were not expressed by SHED. Another protein found by immunofluorescence was S100B. Flow cytometry and dot blot was performed to confirm the presence of the S100B. As shown here, previous report confirms the presence of S100B in the

SHED by flow cytometry (Sakai et al., 2012). Our expectations were that SHED would be releasing the expressed S100B, and the dot blot to S100B was run to confirm this hypothesis. S100B is secreted or released from astrocytes, and has double trophic and toxic effects on neurons, astrocytes and microglia, depending on the concentration (Donato et al., 2013, 2009). To support the idea that transplanted SHED stay producing and releasing acceptable levels of S100B to promoting positive tissue modifications, at the environmental conditions of lesion, more studies are needed.

Summarizing, SHED transplantation in the acute phase after spinal cord contusion promoted an increase of progenitor cells as from twenty-four hours, suggesting an influence in the tissue plasticity after lesion. Grafted SHED reduced the increase of GFAP expression forty-eight hours, promoting an early inhibition of glial scar formation. The acute transplantation of SHED modulated astrocytic proteins such as S100B, delaying the decrease of levels of this protein and promoting an increase of a key protein related to potassium buffer, essential to reducing the neuronal excitability. *In vitro*, the SHED showed express S100B protein, a protein expressed by astrocytes and oligodendrocytes, that can be released and act as trophic or toxic agent. Flow cytometry confirmed the presence of S100B and by Dot Blot showed that this protein is also present in the SHED medium, indicating a probable release or secretion of this protein, which may act as a trophic or toxic factor.

4. Experimental Procedure

4.1 Isolation and culture of SHED

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) were collected, isolated and cultured according to the protocol of Bernardi and colleagues (Bernardi et al., 2011). The donor

gave written informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (#296/08).

Dental pulp was removed and incubated at 37°C for 60 min in buffer with 300,000 U/mg of type 1 collagenase (Gibco, USA). Dental pulp cells were removed from the dental parenchyma and cultivated as previously described (Luisi et al., 2007). All pulp tissue was removed (crown and root) from the dentin and the resulting cell suspension was seeded onto a 12-well plate (5×10^3 cells/cm²). Twenty-four hours after the initial plating, the culture medium DMEM (Dulbecco's) supplemented with 10% fetal bovine serum (Laborclin, Brazil) and 1% of penicilin/estreptomycin (Sigma-Aldrich®) was changed and every 3 or 4 days, thereafter. A passage using trypsin-EDTA 0.5% (Sigma-Aldrich, USA) was performed when 90% of confluence was reached, to loosen the cells from the plate. The density of seeded cells in each passage was 10^4 cells/cm². Cells of the 5th passage were utilized for cell transplantation and for culture characterization analysis.

4.2 Characterization of mesenchymal stem cells by flow cytometry

10^6 cells from cultivated human exfoliated teeth in the 5th passage (n=3) were incubated with the following conjugated antibodies against human cell surface molecules: CD29, CD34 (hematopoietic stem/progenitor cells/endothelium), CD44, CD45, CD73, CD90 (common leukocyte antigens), HLA-DR (human leukocyte antigen, class II), CD14 (monocyte/macrophage), CD184 and STRO-1 (Stromal Cell Surface Marker) (PharMingen-BD Biosciences, USA), conjugated with FITC (Santacruz, USA) or PE (PharMingen-BD Biosciences, USA) as previous reported (Nicola et al., 2016). Data acquisition was performed using the FACS Aria III flow cytometer (BD Biosciences, USA) and 10,000 events were analyzed using FACS Diva 6.1.3 software (BD Biosciences, USA) (Bernardi et al., 2011; Nicola et al., 2016).

4.3 Experimental Design

Male Wistar rats aged 2 months (200–250 g body weight) were obtained from the Animal House of the Instituto de Ciências Básicas da Saúde of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. They were maintained in a temperature-controlled room ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12/12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. All procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA) and with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University (#26116). The animals were randomly divided into three experimental groups: Naive (without any manipulation); SCI (laminectomy followed by SCI and treated with vehicle); SHEDs (SCI treated with SHEDs). Two experiments were run: 1) spinal cord samples were collected 6, 24 and 48 hours after lesion in order to perform ELISA for GFAP and S100B, flow cytometry to quantify vimentin+ cells and Western blot analysis of AQP4 and Kir4.1 ($n = 7-8$ per group); 2) the immunofluorescence to β III-Tubulin, vimentin and S100B markers, flow cytometry to quantify the number of S100B+ cells and Dot Blot to verify the presence of S100B in the SHED medium were performed in the SHED ($n = 3$ cultures) in the *in vitro* phase. Naive rats were used as controls for the first experiment, aiming to reduce the number of experimental animals. There was a 10% death rate after the surgical procedure. Animal care was in accordance with the Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS) protocols (Weeks and Hart, 2004).

4.4 Spinal cord injury and SHED transplantation

The animals were previously anesthetized with a mixture of xylazine (100–150 mg/kg) and ketamine (60–90 mg/kg). Laminectomy was performed at the level of 9th thoracic vertebra (T9) and injury was induced through the drop of a 10 g weight from 25 mm height by the use of New York University Impactor device (NYU-Impactor[®]; W.M. Keck Center for

Collaborative Neuroscience, USA) (Nicola et al., 2016; Park et al., 2013). The SHED group received the administration of 3×10^5 cells diluted in 0.9% NaCl. Cell suspension (10- μ L) was injected at the lesion site 1 h after the injury with a 25- μ L sterile Hamilton syringe, and carried out without immunosuppression (Xavier Acasigua et al., 2014). Animals were sutured following the surgical procedure and housed in individual cages; bladder evacuation was performed daily until function was restored. Antibiotic (Enrofloxacin, Bayer, Brazil; 6 mg/kg) was administered for 7 days after the procedure to prevent infection.

4.5 ELISA of GFAP

Spinal cords were homogenized in PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄, 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), containing 1 mM EGTA and 1 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF). Microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated overnight at 4°C with 100 μ L of TBS containing 70 μ g of protein. Plates were then washed three times with 0.05 % Tween-20/TBS and blocked with 2 % bovine serum albumin for 2 h at room temperature. After blocking, anti-GFAP antibody (polyclonal anti-GFAP rabbit antibody, diluted 1:1000) was incubated for 2 h at room temperature in 0.5 % albumin/TBS. After washing with 0.05 % Tween-20/TBS, a second incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit, diluted 1:1000, was carried out for 1 h at room temperature. Peroxidase substrate (Sigma Fast OPD) was added and incubated for 30 min in the dark after washing twice with 0.05% Tween-20/TBS and once with TBS, 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 50 μ L 3NHCl and the absorbance was read at 492nm on a Microtiter plate reader (Tecan-Spectra, Japan). The standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL (Tramontina et al., 2007). Results were expressed as % of Naive.

4.6 ELISA of S100B

Spinal cords were homogenized in PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄, 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), containing 1 mM EGTA and 1 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF). Plates were previously coated overnight at 4°C with 100 µL of a fresh 1/1000 dilution of monoclonal anti-S100B in 50 mM carbonate–bicarbonate buffer (pH 9.5). Plates were washed three times with 200 µL of washing buffer (0.1% BSA in PBS containing 0.05% Tween-20). Blocking solution (2% BSA, 150 µL) were incubated for 1 h at room temperature. Plates were washed once with 200 µL of washing buffer. Then, 50 mM Tris buffer (pH 8.6) containing 50 µL of samples (diluted with PBS containing 0.2% BSA) or standard curve (range from 0.0019 to 1 ng/mL) were incubated for 2 h at 37°C on a warming plate. Plates were washed three times with 200 µL of washing buffer. Polyclonal anti-S100B antibody (diluted 1/5000 in 0.5% BSA - 100 µL) was incubated for 30 min at 37 °C. Plates were washed three times with washing buffer (200 µL). 100 µL anti-rabbit peroxidase-conjugated diluted 1/5000 in 0.5% BSA were incubated for 30 min at 37°C. Plates were washed three times with 200 µL of washing buffer and once with 200 µL PBS. 200 µL of a fresh solution of Sigma Fast OPD were incubated in the dark, for 30 min at room temperature. 50 µL of 3M HCl were added and microplates were read at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.02 to 1 ng/ml. Results were expressed as % of Naive (Leite et al., 2008).

4.7 Flow cytometry analysis

The spinal cords (Experiment 1) and SHED (Experiment 2) were dissociated with Trypsin / PBS (0,006 g/ mL) (Sigma-Aldrich - T2600000) and the cells were then permeabilized with 0.1% PBS Triton X-100 for 10 min at room temperature, blocked for 15 minutes with 3% normal goat serum (Sigma-Aldrich - G9023). After blocking, the cells were incubated with primary antibodies against Vimentin (Mouse, Sigma Aldrich – V2258) and S100B (Rabbit,

Sigma Aldrich – SAB2106315), at final concentrations of 1:100, at room temperature for 2 h. The cells were washed twice with PBS and incubated for 1 hour with IgG antibody Alexa-fluor 633 anti-rabbit and IgG antibody Alexa-fluor 488 anti-mouse, at a final concentration of 1:200. Negative controls were included for setting up the machine voltages and to determine the negative region of dot plot. The emission of fluorochromes was recorded through a specific band-pass fluorescence filter: red (FL-4; 670 nm long pass) or green (FL-1; 488 nm long pass). Fluorescence emissions were collected using logarithmic amplification. Data from 10,000 events (intact cells) were acquired and the number of cells was determined after exclusion of debris events from the data set. The number of cells in each quadrant was computed and cells stained separately was expressed as the percentage of positive immune labeled cells (Heimfarth et al., 2013). All flow cytometric acquisitions and analyses were performed using FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and Flow Jo software v10.1 (Weis et al., 2012; Nicola et al., 2017).

4.8 Immunofluorescence

Plates with stem cells were washed with PBS and were permeabilized in 0.25% PBS-Triton X and then blocked with 1% albumin for 30 min. Primary antibodies against neuronal microtubule β -III Tubulin protein (Rabbit IgG, 1:200, Abcam - ab18207); against glial fibrillary acidic protein GFAP (Mouse IgG, 1:200, Sigma Aldrich - G3893); against progenitor neural cells Vimentin (Mouse, 1:100, Abcam – ab8978) and against calcium binding protein S100B (Mouse, 1:200 Sigma Aldrich - AMAB91038) were used. This procedure was carried out in 1% albumin in PBS-Tx at 4 °C for 24 h. Following PBS washes, sections were incubated with secondary antibody anti-mouse Alexa 488 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen, USA) or secondary antibody anti-rabbit Alexa 555 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen, USA). A laser

scanning confocal microscope (Olympus FV 1000, Japan) was used for the visualization of fluorescent labeling.

4.9 Western Blotting

Tissue was homogenized in lysis buffer containing 50 mM of Tris-HCl, 4% SDS, and EDTA 2mM; it was boiled and received 25% of a solution containing 5% β -mercaptoethanol, 40% glycerol, and 0.02% bromophenol blue. Proteins were analyzed, using equal amounts of 20 μ g, through 4-12% SDS-PAGE (Mini-PROTEAN, Bio-Rad – 1658004) and subsequently transferred to nitrocellulose membrane (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad – 1703940) for 1 h in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol). The nitrocellulose membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 0.5 M NaCl, 30 mM Trizma, pH 7.5), followed by incubation overnight at 4°C in a blocking solution (TBS plus 2% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20). After incubation, the blot was washed three times for 5 minutes with TBS plus 0.05% Tween-20 (T-TBS) and then incubated overnight at 4 °C in blocking solution containing the primary antibodies, at a final dilution of 1:1000. Primary antibodies used: against AQP4 (Rabbit, Millipore - AB3594) and against Kir4.1 (Goat, Santa Cruz - sc-23637). The blot was then washed three times for 5 minutes with T-TBS and incubated for 1 h in solution containing peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (GE Life Sciences - RPN4301), anti-mouse IgG (Millipore - 402335) or anti-goat IgG (Abcam - AB6741) diluted 1:10000. The blot was washed again three times for 10 minutes with T-TBS and once for 10 minutes with TBS. The chemiluminescence signal was detected using an ECL Kit (GE Life Sciences - RPN2109). Immunoblots were quantified by scanning the membranes in ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences - United Kingdom) and determining optical densities through Image Studio Lite V5.0 (LI-COR Biosciences – US). Results were

expressed as the ratio of intensity of the protein of interest to that of anti- β -actin from the same membrane.

4.10 Dot Blot

SHED was homogenized in ice-cold lysis buffer (10 mM KCl, 150 mM NaCl, 10 mM Hepes, 0.6 mM EDTA, 1% NP 40, 1% glycerol, and 1% protease inhibitor cocktail) pH 7.9, and centrifuged at 1000g for 30 min. Equal protein concentrations of spinal cord tissue, SHED, SHED medium and medium samples (20 μ g/well of total protein, determined using a commercial kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, U.S.A]) were loaded onto nitrocellulose membranes. Thirty minutes later, the blot was incubated for 2 h in the blocking solution [Tris-buffered saline (TBS; 0.14 M NaCl, 2.4 mM Trizma, pH 7.7) plus 5% bovine serum albumin], followed by incubation overnight at 4°C with anti-S100B (Mouse, Sigma Aldrich - AMAB91038), at a final dilution of 1:1000. The blot was then washed three times for 5 min with Tween-TBS and incubated for 2 h in solution containing peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Millipore – 402335) diluted 1:1000. The blot was washed again three times for 10 min with Tween-TBS and once for 10 min with TBS. The signal was detected using a chemiluminescence ECL Kit (GE Life Sciences – RPN2109), scanning the membranes in ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences – United Kingdom) (Grimpe, 2004).

4.11 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA was used to analyze quantitative data, followed by Duncan *post hoc* test to reveal differences between the groups whenever indicated. Significance was assumed at $P < 0.05$. All analyses were carried out using IBM SPSS Statistics software v.19.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Stem Cell Research Institute.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5. References

- Abdullah, M.F., Abdullah, S.F., Omar, N.S., Mahmood, Z., Noor, S.N.F.M., Kannan, T.P., Mokhtar, K.I., 2014. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. *Cell Biol. Int.* 38, 582–590. doi:10.1002/cbin.10229
- Academy, T., Cord, S., Professionals, I., Journal, T., Medicine, S.C., 2014. Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance. *J. Spinal Cord Med.* 37, 479–480. doi:10.1179/1079026814Z.000000000322
- Achilleos, A., Trainor, P. a, 2012. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res.* 22, 288–304. doi:10.1038/cr.2012.11
- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., Fehlings, M.G., 2017. Traumatic spinal cord injury. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17018. doi:10.1038/nrdp.2017.18
- Allaman, I., Bélanger, M., Magistretti, P.J., 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/j.tins.2010.12.001
- Anwar, M.A., Al Shehabi, T.S., Eid, A.H., 2016. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 98. doi:10.3389/fncel.2016.00098
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., Tetzlaff, W., 2017a. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 20, 637–647. doi:10.1038/nn.4541
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., Tetzlaff, W., 2017b. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 20, 637–647. doi:10.1038/nn.4541
- Balasingam, V., Yong, V.W., 1996. Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J. Neurosci.* 16, 2945–2955.
- Bartholdi, D., Schwab, M.E., 1997. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1422–38.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* 139, 244–256. doi:10.1006/exnr.1996.0098
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12, 1–21.

- Beck, K.D., Nguyen, H.X., Galvan, M.D., Salazar, D.L., Woodruff, T.M., Anderson, A.J., 2010. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: Evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain* 133, 433–447. doi:10.1093/brain/awp322
- Benjelloun, N., Renolleau, S., Represa, a, Ben-Ari, Y., Charriaut-Marlangue, C., 1999. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal Rat. *Stroke*. 30, 1916-1923-1924. doi:10.1161/01.STR.30.9.1916
- Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Dalberto, T.P., Valentim, L., Bogo Chies, J.A., Medeiros Fossati, A.C., Pranke, P., 2011. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J. Endod.* 37, 973–979. doi:10.1016/j.joen.2011.04.010
- Bethea, J.R., 2000. Spinal cord injury-induced inflammation : a dual-edged sword. *Prog. Brain Res. Brain Res.* 128, 33–42.
- Bethea, J.R., Nagashima, H., Acosta, M.C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A.E., Loor, K., Green, J., Dietrich, W.D., 1999. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord. *J. Neurotrauma* 16, 851–863.
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M.L., Enikolopov, G.N., Mintz, A., Delbono, O., 2013. Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2-glia. *Exp. Cell Res.* 319, 45–63. doi:10.1016/j.yexcr.2012.09.008
- Blades, D.A., Baldwin, S.A., Broderick, R., Scheff, S.W., 1998. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP- and vimentin-positive astrocytes after spinal cord injury contusion with the New York University spinal cord injury device. *J. Neurotrauma* 15, 1015–1026.
- Blomgren, K., Leist, M., Groc, L., 2007. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* 12, 993–1010. doi:10.1007/s10495-007-0754-4
- Bradbury, E.J., McMahon, S.B., 2006. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci* 7, 644–653. doi:10.1038/nrn1964
- Brewer, K.L., Bethea, J.R., Yeziarski, R.P., 1999. Neuroprotective Effects of Interleukin-10 Following Excitotoxic Spinal Cord Injury. *Exp. Neurol.* 159, 484–493. doi:10.1006/exnr.1999.7173

- Burda, J.E., Sofroniew, M. V., 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
- Burish, M.J., Peebles, J.K., Baldwin, M.K., Tavares, L., Kaas, J.H., Herculano-Houzel, S., 2010. Cellular scaling rules for primate spinal cords. *Brain. Behav. Evol.* 76, 45–59. doi:10.1159/000319019
- Butt, A.M., Kalsi, A., 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: A special role for Kir4.1 in glial functions. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 33–44. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00289.x
- Cacci, E., Claassen, J.H., Kokaia, Z., 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor-?? exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 80, 789–797. doi:10.1002/jnr.20531
- Casella, G.T.B., Bunge, M.B., Wood, P.M., 2006. Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp. Neurol.* 202, 8–20. doi:10.1016/j.expneurol.2006.05.028
- Cerqueira, S.R., Oliveira, J.M., Silva, N. a., Leite-Almeida, H., Ribeiro-Samy, S., Almeida, A., Mano, J.F., Sousa, N., Salgado, A.J., Reis, R.L., 2013. Microglia Response and In Vivo Therapeutic Potential of Methylprednisolone-Loaded Dendrimer Nanoparticles in Spinal Cord Injury. *Small* 9, 738–749. doi:10.1002/sml.201201888
- Chen, J.-Q., Zhang, C.-C., Jiang, S.-N., Lu, H., Wang, W., 2016. Effects of Aquaporin 4 Knockdown on Brain Edema of the Uninjured Side After Traumatic Brain Injury in Rats. *Med. Sci. Monit.* 22, 4809–4819. doi:10.12659/MSM.898190
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., Beattie, M.S., 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3, 73–76.
- David, S., Kroner, A., 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 388–399. doi:10.1038/nrn3053
- de Almeida, F.M., Marques, S.A., Ramalho, B.D.S., Rodrigues, R.F., Cadilhe, D.V., Furtado, D., Kerkis, I., Pereira, L.V., Rehen, S.K., Martinez, A.M.B., 2011. Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 28, 1939–49. doi:10.1089/neu.2010.1317
- De Berdt, P., Vanacker, J., Ucakar, B., Elens, L., Diogenes, A., Lepince, J.G., Deumens, R.,

- des Rieux, A., 2015. Dental Apical Papilla as Therapy for Spinal Cord Injury. *J. Dent. Res.* 94, 1575–81. doi:10.1177/0022034515604612
- Dereli, E.E., Yaliman, A., 2010. Comparison of the effects of a physiotherapist-supervised exercise programme and a self-supervised exercise programme on quality of life in patients with Parkinson's disease. *Clin. Rehabil.* 24, 352–362. doi:10.1177/0269215509358933
- Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., Noël, D., 2007. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells* 25, 2025–2032. doi:10.1634/stemcells.2006-0548
- Do Carmo Cunha, J., De Freitas Azevedo Levy, B., De Luca, B.A., De Andrade, M.S.R., Gomide, V.C., Chadi, G., 2007. Responses of reactive astrocytes containing S100 β protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: Implications for wound repair and neuroregeneration. *Wound Repair Regen.* 15, 134–146. doi:10.1111/j.1524-475X.2006.00194.x
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- Donato, R., Cannon, B., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., J. Weber, D., L. Geczy, C., 2013. Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57. doi:10.2174/156652413804486214
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 1008–1022. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009
- Dusart, I., Schwab, M.E., 1994. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 6, 712–724.
- Ellis, K.M., Carroll, D.C.O., Lewis, M.D., Rychkov, G.Y., Koblar, S.A., 2014. Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 1–13. doi:10.1186/scrt419

- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Emery, E., Aldana, P., Bunge, M.B., Puckett, W., Srinivasan, A., Keane, R.W., Bethea, J., Levi, a D., 1998. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 89, 911–920. doi:10.3171/jns.1998.89.6.0911
- Encinas, J.M., Vaahtokari, A., Enikolopov, G., 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8233–8. doi:10.1073/pnas.0601992103
- Fathali, N., Ostrowski, R.P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., Zhang, J.H., 2013. Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Transl. Stroke Res.* 4, 208–219. doi:10.1007/s12975-012-0239-9
- Faulkner, J.R., 2004. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 24, 2143–2155. doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004
- Finetti, F., Basile, A., Capasso, D., Di Gaetano, S., Di Stasi, R., Pascale, M., Turco, C.M., Ziche, M., Morbidelli, L., D'Andrea, L.D., 2012. Functional and pharmacological characterization of a VEGF mimetic peptide on reparative angiogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 84, 303–311. doi:10.1016/j.bcp.2012.04.011
- Frisén, J., Johansson, C.B., Török, C., Risling, M., Lendahl, U., 1995. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* 131, 453–464. doi:10.1083/jcb.131.2.453
- Giusto, E., Donegà, M., Cossetti, C., Pluchino, S., 2014. Neuro-immune interactions of neural stem cell transplants: from animal disease models to human trials. *Exp Neurol* 260, 19–32. doi:10.1016/j.expneurol.2013.03.009
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. [Review] [59 refs]. *Science* (80-). 281, 1309–1312.
- Grimpe, B., 2004. A Novel DNA Enzyme Reduces Glycosaminoglycan Chains in the Glial Scar and Allows Microtransplanted Dorsal Root Ganglia Axons to Regenerate beyond Lesions in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 24, 1393–1397. doi:10.1523/JNEUROSCI.4986-03.2004
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, a, DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S., 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent.*

Res. 81, 531–535. doi:10.1177/154405910208100806

- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., Shi, S., 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630. doi:10.1073/pnas.240309797
- Grossman, S.D., Rosenberg, L.J., Wrathall, J.R., 2001. Temporal–Spatial Pattern of Acute Neuronal and Glial Loss after Spinal Cord Contusion. *Exp. Neurol.* 168, 273–282. doi:10.1006/exnr.2001.7628
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Petenuzzo, L., de Lima, B.O., Fernandes, C.G., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2013. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. *Neurotoxicology* 34, 175–188. doi:10.1016/j.neuro.2012.10.015
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I. a N., 2010. Inwardly Rectifying Potassium Channels : Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366. doi:10.1152/physrev.00021.2009.
- Holohan, C., Szegezdi, E., Ritter, T., O’Brien, T., Samali, A., 2008. Cytokine-induced ??-cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL: Apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 591–606. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00191.x
- Jia, X., Kowalski, R.G., Sciubba, D.M., Geocadin, R.G., 2013. Critical Care of Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Intensive Care Med.* 28, 12–23. doi:10.1177/0885066611403270
- Jones, T.B., Hart, R.P., Popovich, P.G., 2005. Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 6576–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.0305-05.2005
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K., 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 24, 1294–1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
- Kim, G.M., Xu, J., Song, S.K., Yan, P., Ku, G., Xu, X.M., Hsu, C.Y., 2001. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 21, 6617–25.
- Kim, Y.-H., Ha, K.-Y., Kim, S.-I., Wrathall, J., Shields, C., Roskams, A., 2017. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clin. Orthop. Surg.* 9, 1. doi:10.4055/cios.2017.9.1.1

- Klusman, I., Schwab, M.E., 1997. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res.* 762, 173–184. doi:10.1016/S0006-8993(97)00381-8
- Knobloch, S.M., Faden, a I., 1998. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 153, 143–151. doi:10.1006/exnr.1998.6877
- Kojima, A., Tator, C.H., 2002. Intrathecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes ependymal proliferation and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J.Neurotrauma* 19, 223–238.
- KWON, B., 2004. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury*1. *Spine J.* 4, 451–464. doi:10.1016/j.spinee.2003.07.007
- Lavine, S.D., Hofman, F.M., Zlokovic, B. V, 1998. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 52–58. doi:10.1097/00004647-199801000-00005
- Lee, B.B., Cripps, R. a, Fitzharris, M., Wing, P.C., 2014. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord* 52, 110–6. doi:10.1038/sc.2012.158
- Lee, J., Thumbikat, P., 2015. Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surg.* 1–10. doi:10.1016/j.mpsur.2015.04.003
- Lee, S.J., Kim, C.W., Lee, K.J., Choe, J.W., Kim, S.E., Oh, J.H., Park, Y.S., 2010. Elevated serum S100B levels in acute spinal fracture without head injury. *Emerg. Med. J.* 27, 209–212. doi:10.1136/emj.2008.063743
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., Gon??alves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.021
- Liu, X.Z., Xu, X.M., Hu, R., Du, C., Zhang, S.X., McDonald, J.W., Dong, H.X., Wu, Y.J., Fan, G.S., Jacquin, M.F., Hsu, C.Y., Choi, D.W., 1997. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5395–5406.
- Loane, D.J., Byrnes, K.R., 2010. Role of Microglia in Neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7, 366–377. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.002
- Lou, J., Lenke, L.G., Ludwig, F.J., O'Brien, M.F., 1998. Apoptosis as a mechanism of

- neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal cord Off. J. Int. Med. Soc. Paraplegia* 36, 683–690.
- Luisi, S., Barbachan, J., Chies, J., Filho, M., 2007. Behavior of Human Dental Pulp Cells Exposed to Transforming Growth Factor-Beta1 and Acidic Fibroblast Growth Factor in Culture. *J. Endod.* 33, 833–835. doi:10.1016/j.joen.2007.04.002
- Maltman, D.J., Hardy, S.A., Przyborski, S.A., 2011. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem. Int.* doi:10.1016/j.neuint.2011.06.008
- Matsubara, K., Matsushita, Y., Sakai, K., Kano, F., Kondo, M., Noda, M., Hashimoto, N., Imagama, S., Ishiguro, N., Suzumura, A., Ueda, M., Furukawa, K., Yamamoto, A., 2015. Secreted Ectodomain of Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promote Recovery after Rat Spinal Cord Injury by Altering Macrophage Polarity. *J. Neurosci.* 35, 2452–2464. doi:10.1523/JNEUROSCI.4088-14.2015
- McDonald, J.W., Becker, D., Holekamp, T.F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., Lu, J., Platik, M.M., Qu, Y., Stewart, T., Vadivelu, S., 2004. Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation. *J. Neurotrauma* 21, 383–393. doi:10.1089/089771504323004539 [doi]
- McDonald, J.W., Howard, M.J., 2002. Repairing the damaged spinal cord: A summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination, in: *Progress in Brain Research*. pp. 299–309.
- McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., Silver, J., 1991. Reduction of Neurite Outgrowth in a Model of Glial Scarring Following CNS Injury Is Correlated With the Expression of Inhibitory Molecules on Reactive Astrocytes. *J. Neurosci.* 11, 3398–3411.
- Menezes, K., de Menezes, J.R.L., Nascimento, M.A., Santos, R.D.S., Coelho-Sampaio, T., 2010. Polylaminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. *FASEB J.* 24, 4513–4522. doi:10.1096/fj.10-157628
- Mestriner, R.G., Pagnussat, A.S., Boisserand, L.S.B., Valentim, L., Netto, C.A., 2011. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp. Neurol.* 227, 53–61.
- Mita, T., Furukawa-Hibi, Y., Takeuchi, H., Hattori, H., Yamada, K., Hibi, H., Ueda, M.,

- Yamamoto, A., 2015. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 293, 189–197. doi:10.1016/j.bbr.2015.07.043
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S., 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807–5812. doi:10.1073/pnas.0937635100
- Moore, K.W., O'Garra, A., Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R., 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165–190.
- MOTHE, A., TATOR, C., 2005. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience* 131, 177–187. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.10.011
- Mothe, A.J., Tam, R.Y., Zahir, T., Tator, C.H., Shoichet, M.S., 2013. Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials* 34, 3775–3783. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.002
- Nagelhus, E. a., Mathiisen, T.M., Ottersen, O.P., 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905–913. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.053
- Nesic, O., Guest, J.D., Zivadinovic, D., Narayana, P. a., Herrera, J.J., Grill, R.J., Mokkalapati, V.U.L., Gelman, B.B., Lee, J., 2010. Aquaporins in spinal cord injury: The janus face of aquaporin 4. *Neuroscience* 168, 1019–1035. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.037
- Nesic, O., Lee, J., Ye, Z., Unabia, G.C., Rafati, D., Hulsebosch, C.E., Perez-Polo, J.R., 2006. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. *Neuroscience* 143, 779–792. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.079
- Nicaise, C., Mitrecic, D., Pochet, R., 2011. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 179–188. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01124.x
- Nichols, C.G., Lopatin, a N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 171–191. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.171
- Nicola, F. do C., Marques, M.R., Odorcyk, F., Arcego, D.M., Petenuzzo, L., Aristimunha, D., Vizquete, A., Sanches, E.F., Pereira, D.P., Maurmann, N., Dalmaz, C., Pranke, P., Netto,

- C.A., 2017. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res.* 1663, 95–105. doi:10.1016/j.brainres.2017.03.015
- Nicola, F.C., Rodrigues, L.P., Crestani, T., Quintiliano, K., Sanches, E.F., Willborn, S., Aristimunha, D., Boisserand, L., Pranke, P., Netto, C.A., 2016. Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 49, e5319. doi:10.1590/1414-431X20165319
- Ninan, I., 2014. Synaptic regulation of affective behaviors; Role of BDNF. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.011
- Obermair, F., Schröter, A., Thallmair, M., 2008. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury. *Physiology (Bethesda)*. 23, 296–304. doi:10.1152/physiol.00017.2008
- Oliveira, J.F., Sardinha, V.M., Guerra-Gomes, S., Araque, A., Sousa, N., 2015. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci.* 38, 535–549. doi:10.1016/j.tins.2015.07.006
- Olsen, M.L., Campbell, S.C., McFerrin, M.B., Floyd, C.L., Sontheimer, H., 2010. Spinal cord injury causes a wide-spread, persistent loss of Kir4.1 and glutamate transporter 1: Benefit of 17 β -oestradiol treatment. *Brain* 133, 1013–1025. doi:10.1093/brain/awq049
- Oyinbo, C.A., 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*.
- Park, D.Y., Mayle, R.E., Smith, R.L., Corcoran-Schwartz, I., Kharazi, A.I., Cheng, I., 2013. Combined Transplantation of Human Neuronal and Mesenchymal Stem Cells following Spinal Cord Injury. *Glob. Spine J.* 3, 1–6. doi:10.1055/s-0033-1337118
- Parr, A.M., Kulbatski, I., Zahir, T., Wang, X., Yue, C., Keating, A., Tator, C.H., 2008. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience* 155, 760–770.
- Pineau, I., Sun, L., Bastien, D., Lacroix, S., 2010. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain. Behav. Immun.* 24, 540–553. doi:10.1016/j.bbi.2009.11.007

- Popovich, P.G., Wei, P., Stokes, B.T., 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.* 377, 443–464. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970120)377:3<443::AID-CNE10>3.0.CO;2-S [pii]
- Qiu, J., Nesic, O., Ye, Z., Rea, H., Westlund, K.N., Xu, G.Y., McAdoo, D., Hulsebosch, C.E., Perez-Polo, J.R., 2001. Bcl-xL expression after contusion to the rat spinal cord. *J. Neurotrauma* 18, 1267–1278. doi:10.1089/089771501317095304
- Ragni, E., Montemurro, T., Montelatici, E., Lavazza, C., Viganò, M., Rebullà, P., Giordano, R., Lazzari, L., 2013. Differential microRNA signature of human mesenchymal stem cells from different sources reveals an “environmental-niche memory” for bone marrow stem cells. *Exp. Cell Res.* 319, 1562–1574. doi:10.1016/j.yexcr.2013.04.002
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., Deloulme, J.-C., 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165–177. doi:10.1002/glia.20445
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577. doi:10.1016/S0166-2236(97)01139-9
- Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Santander, I., Barón-Flores, V., Caram-Salas, N., Diaz-Ruiz, A., 2015. Anti-Apoptotic Effects of Dapsone After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem. Res.* doi:10.1007/s11064-015-1588-z
- Rodrigues, L.P., Iglesias, D., Nicola, F.C., Steffens, D., Valentim, L., Witczak, A., Zanatta, G., Achaval, M., Pranke, P., Netto, C.A., 2012. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 49–57. doi:10.1590/S0100-879X2011007500162
- Rowland, J.W., Hawryluk, G.W.J., Kwon, B., Fehlings, M.G., 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus* 25, E2. doi:10.3171/FOC.2008.25.11.E2
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 168, 1036–1046. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.019

- Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., Ueda, M., 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J. Clin. Invest.* 122, 80–90. doi:10.1172/JCI59251
- Sawatzky, D. a, Willoughby, D. a, Colville-Nash, P.R., Rossi, A.G., 2006. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am. J. Pathol.* 168, 33–41. doi:10.2353/ajpath.2006.050058
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Cohen, I.R., 1999. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/S0166-2236(99)01405-8
- Seki, T., Namba, T., Mochizuki, H., Onodera, M., 2007. Clustering, migration, and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 502, 275–290. doi:10.1002/cne
- Shanti, R.M., Li, W.-J., Nesti, L.J., Wang, X., Tuan, R.S., 2007. Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 65, 1640–7. doi:10.1016/j.joms.2007.04.008
- Shende, P., Subedi, M., 2017. Pathophysiology, mechanisms and applications of mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Biomed. Pharmacother.* 91, 693–706. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.126
- Shin, J.C., Kim, D.H., Yu, S.J., Yang, H.E., Yoon, S.Y., 2013. Epidemiologic change of patients with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med* 37, 50–56. doi:10.5535/arm.2013.37.1.50
- Sibille, J., Pannasch, U., Rouach, N., 2014. Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J. Physiol.* 592, 87–102. doi:10.1113/jphysiol.2013.261735
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., Banik, N.L., 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* 87, 10–20. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.10.004
- Sofroniew, M. V, 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002

- Taghipour, Z., Karbalaie, K., Kiani, A., Niapour, A., Bahramian, H., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., 2012. Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stem Cells Promote Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. *Stem Cells Dev.* 21, 1794–1802. doi:10.1089/scd.2011.0408
- Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., Papadopoulos, M.C., 2008. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci.* 31, 37–43. doi:10.1016/j.tins.2007.11.003
- Tator, C.H., Fehlings, M.G., 1991. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* doi:10.3171/jns.1991.75.1.0015
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andrezza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Gonçalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* 162, 282–286. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.001
- Verfaillie, C., 2005. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 265, 55–61.
- Vidal, P.M., Lemmens, E., Dooley, D., Hendrix, S., 2013a. The role of “ anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 1–12. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.08.008
- Vidal, P.M., Lemmens, E., Geboes, L., Vanganswinkel, T., Nelissen, S., Hendrix, S., 2013b. Late blocking of peripheral TNF- α is ineffective after spinal cord injury in mice. *Immunobiology* 218, 281–284. doi:10.1016/j.imbio.2012.05.007
- Vos, P.E., Jacobs, B., Andriessen, T.M.J.C., Lamers, K.J.B., Borm, G.F., Beems, T., Edwards, M., Rosmalen, C.F., Vissers, J.L.M., 2010. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology* 75, 1786–93. doi:10.1212/WNL.0b013e3181fd62d2
- Wagers, A.J., Weissman, I.L., 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* doi:10.1016/S0092-8674(04)00208-9
- Weeks, J., Hart, R.P., 2004. SCI-Base: an open-source spinal cord injury animal experimentation database. *Lab Anim. (NY).* 33, 35–41.
- Weis, S.N., Pettenuzzo, L.F., Krolow, R., Valentim, L.M., Mota, C.S., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., 2012. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat

- brain mitochondria. *Mitochondrion* 12, 271–279. doi:10.1016/j.mito.2011.10.002
- Wislet-Gendebien, S., 2003. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 116, 3295–3302.
doi:10.1242/jcs.00639
- Xavier Acasigua, G., Bernardi, L., Braghirolli, D., Filho, M., Pranke, P., Medeiros Fossati, A., 2014. Nanofiber Scaffolds Support Bone Regeneration Associated with Pulp Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9, 330–337.
doi:10.2174/1574888X09666140228123911
- Xu, C., Klaw, M.C., Lemay, M. a., Baas, P.W., Tom, V.J., 2015. Pharmacologically inhibiting kinesin-5 activity with monastrol promotes axonal regeneration following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 263, 172–176. doi:10.1016/j.expneurol.2014.10.013
- Yalvaç, M.E., Yarat, A., Mercan, D., Rizvanov, A.A., Palotás, A., Şahin, F., 2013. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. *Brain. Behav. Immun.* 32, 122–130.
doi:10.1016/j.bbi.2013.03.007
- Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., Ueda, M., 2013. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke* 44, 551–554.
doi:10.1161/STROKEAHA.112.676759
- Yamamoto, S., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., Nakafuku, M., 2001. Proliferation of Parenchymal Neural Progenitors in Response to Injury in the Adult Rat Spinal Cord 127, 115–127. doi:10.1006/exnr.2001.7798
- Yamashita, Y.M., Mahowald, A.P., Perlin, J.R., Fuller, M.T., 2007. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 315, 518–521.
doi:10.1126/science.1134910
- Yan, P., Li, Q., Kim, G.-M., Xu, J., Hsu, C.Y., Xu, X.M., 2001. Cellular Localization of Tumor Necrosis Factor- α Following Acute Spinal Cord Injury in Adult Rats. *J. Neurotrauma* 18, 563–568. doi:10.1089/089771501300227369
- Yin, F., Guo, L., Meng, C.Y., Liu, Y.J., Lu, R.F., Li, P., Zhou, Y.B., 2014. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain Res.* 1561, 1–10. doi:10.1016/j.brainres.2014.02.047

- Zech, N.H., 2004. Adult stem cell manipulation and possible clinical perspectives. *J. REPRODUKTIONSMED. ENDOKRINOL.* 91–99. doi:10.1783/147118910791749425
- Zhao, H., Chai, Y., 2015. Stem Cells in Teeth and Craniofacial Bones. *J. Dent. Res.* 94, 1495–1501. doi:10.1177/0022034515603972
- Zhu, C., Wang, X., Qiu, L., Peeters-Scholte, C., Hagberg, H., Blomgren, K., 2004. Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J. Neurochem.* 90, 462–471. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02500.x
- Zuk, P.A., 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105

Figures and Legends

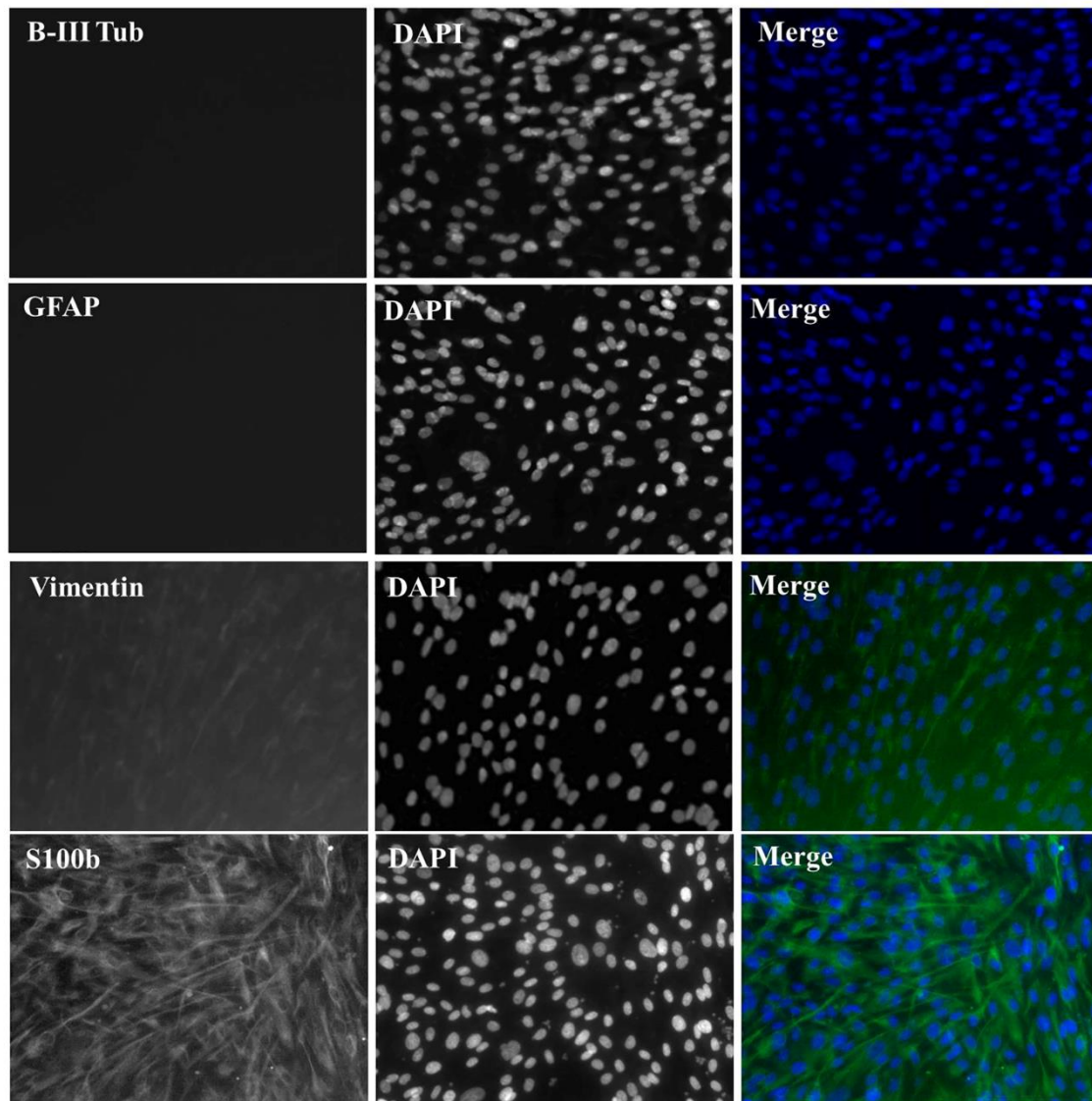


Figure 1. Representative immunostaining of β -III tubulin, GFAP, Vimentin and S100B to SHED in the *in vitro* phase (n = 3).

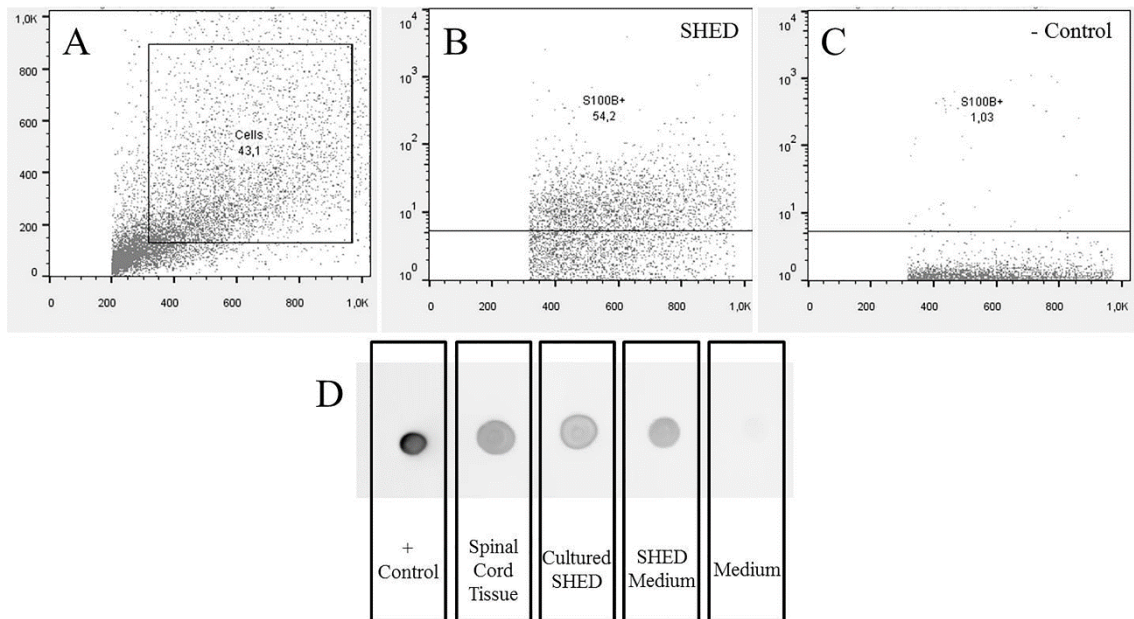


Figure 2. Flow cytometry and Dot blot of SHED in the *in vitro* phase labeled with S100B. Gate of cells (A); S100B+ cells in the SHED sample (B); and negative control (C). Dot blot showing positive control, spinal cord tissue sample labeled with S100B, SHED in the cultured phase, the medium of SHED and the medium only (D) (n = 3).

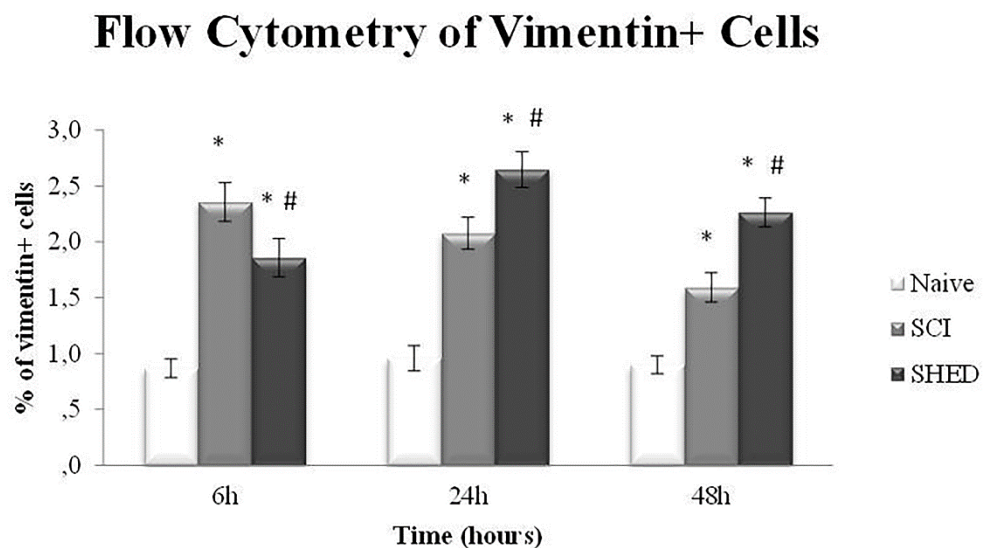


Figure 3. Flow cytometry of vimentin+ cells at six, twenty-four and forty-eight hours after spinal cord lesion; Naive, SCI and SHED experimental groups. Data expressed as mean \pm SE.

Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group, $p < 0.05$. #Difference from the SCI group, $p < 0.05$ ($n = 7 - 8$ per group).

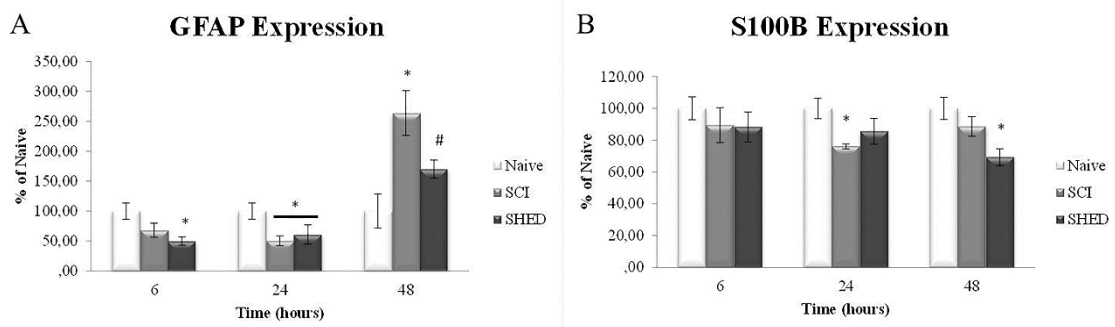


Figure 4. ELISA of GFAP (A) and S100B (B) expression in Naive, SCI and SHED groups, run six, twenty-four and forty-eight hours after spinal cord lesion. Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group, $p < 0.05$. #Difference from the SCI group, $p < 0.05$ ($n = 7 - 8$ per group).

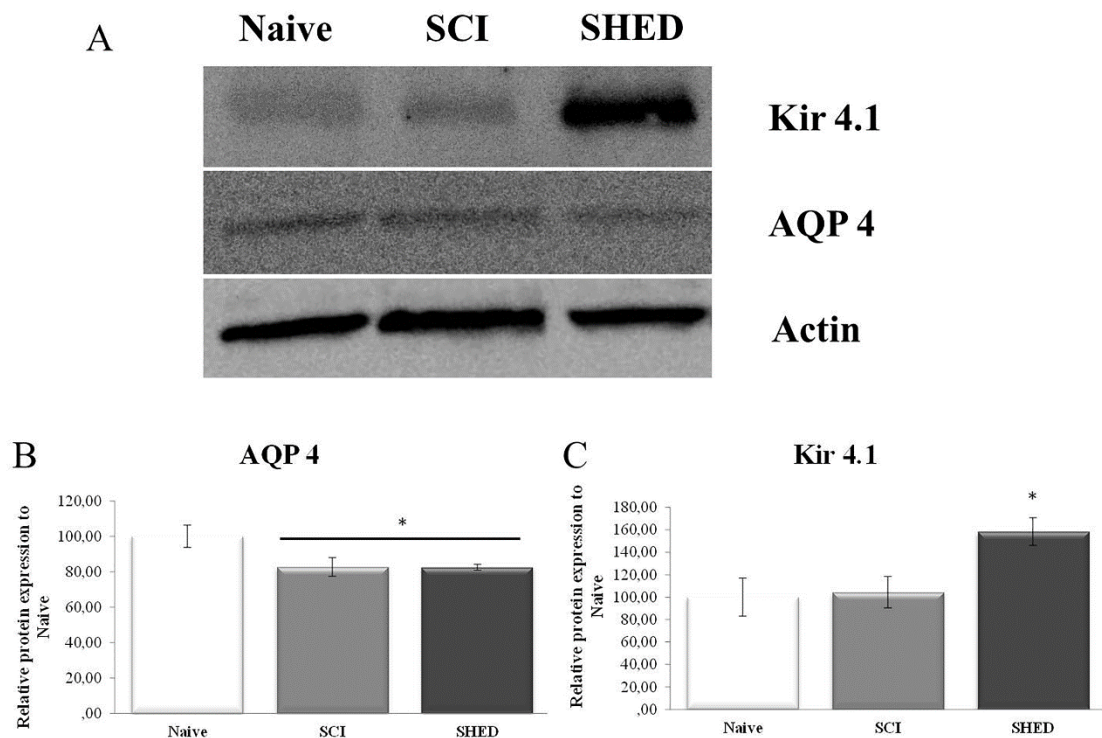


Figure 5. Western blot analysis of AQP 4 and Kir 4.1 run six hours after spinal cord injury; Naive, SCI and SHED experimental groups. Representative images of AQP 4 and Kir 4.1 (A).

Quantification of AQP 4 (B) and of Kir 4.1 (C). Data expressed as mean \pm SE. *Difference from the Naive group, $p < 0.05$ ($n = 7 - 8$ per group).

4. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados confirmam a hipótese de trabalho, em que o transplante das células-tronco derivadas do dente decíduo humano é capaz de promover a recuperação funcional, reduzir o volume de lesão e preservar neurônios motores na medula espinal de ratos submetidos à lesão medular por contusão. Análises quantitativas dos neurônios, astrócitos, macrófago/microglia e células T foram realizadas no período agudo e subagudo para entender a influência do transplante das SHED na manutenção, proliferação ou migração dessas células após a lesão medular. O transplante das SHED foi capaz de reduzir a perda de neurônios no período agudo após a lesão, mas não foi capaz de reduzir a perda de astrócitos e de microglia. Na fase subaguda, ocorre um aumento do número de astrócitos e de células T no parênquima da medula espinal, sendo que o transplante das SHED foi capaz de inibir a entrada de células T e reduzir o aumento expressivo das células astrocitárias. Seis horas após a lesão o número de neurônios em processo de apoptose reduziu no grupo que recebeu o transplante de SHED. Sugere-se a partir desses resultados que o transplante de SHED reduz a morte neuronal por inibir ou reduzir as vias de ativação da morte celular, confirmados posteriormente pela redução da expressão de TNF- α e a manutenção da expressão da BCL-XL.

Em relação à presença de células precursoras na medula espinal ao longo dos períodos agudo e subagudo após a lesão medula, verificou-se um aumento de células vimentina + na medula espinal dos animais tratado com as SHED, em comparação com os demais grupos em 24 horas e 48 horas, sugerindo maior plasticidade tecidual da medula espinal dos animais que receberam SHED. Em apoio a esta sugestão, verificou-se que o transplante foi capaz de inibir a superexpressão de GFAP 48 horas após a lesão, reduzindo, portanto, a hipertrofia astrocitária que contribui para a formação da cicatriz glial. Os efeitos do transplante por meio dos agentes produzidos pelas SHED e que podem estar sendo liberados e interagindo com o tecido são múltiplos; por meio da análise do fenótipo dessa células, *in vitro*, identificou-se que são capazes de expressar vimentina, uma proteína presente em células precursoras, e S100B. A S100B também foi encontrada no meio de cultura das SHED, indicando a liberação dessa proteína pelas SHED e um possível efeito parácrino que pode estar atuando após o transplante na medula espinal.

4.1 Déficits funcionais e volume da lesão

É esperado que após a lesão medular os animais apresentassem déficits funcionais quando avaliados por meio da escala BBB dois dias após a lesão e que, por se tratar de uma lesão por contusão, os animais lesados apresentem algum grau de recuperação espontânea parcial (Basso et al., 1995; Rodrigues et al., 2012; Sakai et al., 2012). A recuperação funcional promovida pelo transplante das SHED, já descrita na literatura (de Almeida et al., 2011; Nicola et al., 2016; Taghipour et al., 2012), foi confirmada neste trabalho, indicando a efetividade do transplante. Os animais que receberam o transplante apresentaram maior pontuação na escala BBB a partir da primeira semana em comparação com os animais que não receberam o tratamento; essa diferença permaneceu até a sexta semana após a contusão. O efeito benéfico precoce, tendo em vista a diferença na melhora funcional na primeira semana após o transplante das SHED, sugere um efeito neuroprotetor por parte das SHED sobre a medula espinal (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012), efeito que é reforçado, em teoria, pela preservação tecidual.

Uma vez que os déficits funcionais tendem a ser proporcionais à gravidade da lesão, ou seja, a perda de tecido causa comprometimento funcional (Basso et al., 1996), a preservação tecidual na medula dos animais que receberam o transplante de célula-tronco, verificada pelo menor volume da lesão seis semanas após, justifica a melhora dos déficits funcionais provocados pelo trauma medular. Além de preservar maior quantidade de tecido no local de lesão, o grupo SHED apresentou um maior número de neurônios motores no corno anterior da medula espinal, abaixo do nível da lesão, justificando a melhora da capacidade de se locomover. Ainda, houve forte correlação positiva entre a quantificação dos neurônios motores no corno anterior da medula espinal e os escores obtidos no último dia de avaliação funcional (BBB), sugerindo que a capacidade de locomoção dos membros posteriores depende da presença dessas células abaixo do local da lesão.

4.2 Morte neuronal e neuroproteção

A presença de motoneurônios abaixo da lesão no grupo SHED sugere a preservação dessas células, eventual proliferação ou diferenciação das SHED em neurônios. Considerando a neuroproteção como possível mecanismo (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012), avaliou-se a presença de neurônios ao longo dos períodos agudo e subagudo na

medula espinal após a lesão medular. A partir dessa avaliação foi possível observar o ponto crítico na linha de tempo aonde ocorre a maior perda de células neuronais na medula espinal. De acordo com evidências prévias (Casella et al., 2006), os neurônios morrem de modo progressivo após a lesão medular, estabilizando quarenta e oito horas após a lesão. O transplante de SHED foi capaz de reduzir a morte neuronal, estabilizando a perda já às vinte quatro horas após a lesão, ou seja, a redução do número de neurônios cessa, nos animais que recebem o tratamento, vinte quatro horas antes do esperado. O número basal dos neurônios encontrados na medula dos animais controle Naive estão de acordo com achados prévios (Burish et al., 2010).

A apoptose é um importante processo de morte celular programada ativado após a lesão medular (Crowe et al., 1997; Emery et al., 1998; Grossman et al., 2001; Liu et al., 1997; Lou et al., 1998; Ríos et al., 2015). Com o objetivo de avaliar a morte específica de neurônios na medula espinal, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo com dupla marcação para neurônios (MAP-2) e apoptose (caspase 3 clivada) seis horas após a lesão. A caspase 3 é uma enzima conhecida por iniciar o processo de apoptose (Elmore, 2007) e muito utilizada para verificar a apoptose após a lesão medular, sendo o aumento da expressão ou presença da caspase 3 clivada relacionada com a morte celular (Emery et al., 1998; Ríos et al., 2015). Seis horas após a lesão há um aumento na presença de caspase 3 clivada nos neurônios da medula espinal dos animais que sofrem a lesão medular; porém, quando tratados com o transplante de SHED, há uma redução na sua expressão, ou seja, reduz-se o número de células neuronais em processo de apoptose. Este é um dos achados originais desta Tese, demonstrando a redução da morte neuronal precoce promovido pelo transplante das SHED e sugerindo uma relação com a sobrevivência dos motoneurônios visualizados seis semanas após a lesão por meio da técnica histológica.

As vias de ativação da apoptose são complexas e envolvem uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia. Este trabalho avançou no estudo das duas principais vias da morte por apoptose: a via extrínseca, ativada, por exemplo, pelo receptor de morte celular TRADD (da sigla em inglês: *TNF receptor-associated death domain*) que está posicionado na membrana celular por meio da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); e a via intrínseca ou mitocondrial, que depende da integridade da membrana dessa organela (Elmore, 2007). A expressão do TNF- α no tecido após a lesão medular se mostrou aumentada seis, quarenta e oito e setenta e duas horas após a contusão; isso provavelmente ativou o receptor de morte, posicionado na membrana celular, que iniciou a ativação das capases e o aumento da expressão

da caspase 3 clivada (Elmore, 2007; Qiu et al., 2001). O grupo SHED demonstrou um aumento nos níveis de TNF- α apenas em seis horas, sendo menor do que o apresentado pelo grupo lesão, ou seja, foi capaz de reduzir a superexpressão dessa citocina no tecido.

Analisando a via intrínseca, mitocondrial, a lesão medular reduz a expressão da proteína BCL-XL, proteína constitutiva dessa organela (Elmore, 2007; Qiu et al., 2001). Portanto, pode estar relacionado com a perda da função, aumento da permeabilidade ou até mesmo o rompimento da membrana mitocondrial, o que favorece a liberação de enzimas pró apoptóticas como a citocromo c oxidase (Holohan et al., 2008), que quando em contato com o citosol, ativa a via das caspases (Elmore, 2007). O transplante de SHED manteve os níveis basais da expressão de BCL-XL, sugerindo a manutenção da permeabilidade e integridade da membrana mitocondrial, e provavelmente, impedindo a morte por apoptose (Green and Reed, 1998; Holohan et al., 2008; Sawatzky et al., 2006). Em conjunto, a inibição da superexpressão da citocina TNF- α e a manutenção dos níveis de BCL-XL, provavelmente contribuíram para reduzir a morte neuronal por apoptose seis horas após a contusão. No entanto, outros mecanismos podem estar atuando para que ocorra a morte celular e que estão sujeitos à modulação das SHED.

Eventos citotóxicos que promovem o influxo de cálcio através dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e as citocinas pró-inflamatórias podem induzir a apoptose por meio da ativação da enzima neuronal oxido nítrico sintase (nNOS) (Anwar et al., 2016; Blomgren et al., 2007; Holohan et al., 2008) que, uma vez ativada, aumenta os níveis de óxido nítrico que pode causar danos irreversíveis à membrana mitocondrial (Blomgren et al., 2007). Em relação a essa via, estudamos apenas a expressão de nNOS e EAAT3, transportador de aminoácidos excitatórios neuronal, responsável pela remoção do glutamato do espaço extracelular. O tratamento com o transplante de SHED reduziu a superexpressão da enzima nNOS na medula espinal, sugerindo o favorecimento da homeostase das concentrações do oxido nítrico no parênquima. De modo a reforçar a ideia em que o aumento da disponibilidade do oxido nítrico, representado pelo aumento da expressão da enzima nNOS, pode promover a morte por apoptose, demonstrou-se uma correlação positiva entre a expressão de nNOS e apoptose neuronal, assim como o aumento nos níveis de TNF- α se correlaciona com a apoptose neuronal. Além desses dois fatores, o aumento no transportador de aminoácidos excitatórios 3 (EAAT3) nos animais lesionados pode ser interpretado como um aumento na necessidade de captação de glutamato do meio extracelular. O grupo que recebe o transplante de SHED aumenta a expressão desse transportador, mas o aumento é menor quando comparado com o grupo lesão;

ou seja, o transplante de SHED foi capaz de reduzir a superexpressão do EAAT3. Esses resultados são apenas indicativos de outros mecanismos em que as SHED podem estar atuando, contudo, novos estudos são necessários para o completo esclarecimento.

Para entender um pouco melhor a morte dos neurônios é preciso saber como as demais células do sistema estão reagindo a lesão medular e ao tratamento com o transplante de células; para tal, a citometria de fluxo também foi realizada para a quantificação de astrócitos, macrófagos/microglia e células T presentes na medula espinal dos animais.

4.3 Sistema imune – macrófagos/microglia e células T

A resposta imune mediada por macrófagos/microglia desempenha um papel importante na lesão secundária, devido a liberação de citocinas e realização da fagocitose (David and Kroner, 2011). Os resultados aqui apresentados demonstram que há aumento progressivo da presença de macrófagos/microglia no parênquima da medula espinal dos animais que sofrem a lesão medular, um efeito que não é influenciado pelo transplante das SHED, ou seja, há um aumento progressivo da presença em ambos grupos lesionados, com ou sem tratamento (Dereli and Yaliman, 2010; Matsubara et al., 2015). Assim como os macrófagos, as células T, células do sistema imune periférico se infiltram no tecido após a lesão (Benjelloun et al., 1999), aumentam o processo inflamatório e contribuem para o processo de morte celular (Fathali et al., 2013). Esse aumento no número de células T no tecido foi visualizado apenas setenta e duas horas após a lesão no grupo não tratado. O transplante de SHED foi capaz de inibir a entrada das células T. Sugere-se, então, que as SHED possam estar inibindo a sinalização por meio de quimiocinas presentes nos vasos após o dano (Jones et al., 2005); porém, mais estudos são necessários para verificar essa hipótese.

Com a ocorrência do aumento progressivo de células do sistema imune na medula espinal, esperou-se um aumento na produção e liberação de citocinas pró inflamatórias, como o TNF- α . De modo especial, nos tempos de quarenta e oito e setenta e duas horas após a lesão, o aumento no número de macrófagos e TNF- α foi visualizado apenas no grupo lesão, enquanto que no grupo SHED houve apenas o aumento no número de macrófagos/microglia. De acordo com Matsubara e colegas (2015), as SHED não são capazes de interferir na entrada de macrófagos, mas têm a capacidade de modular seu fenótipo e função alternando de um estado pró-inflamatório (M1) para um estado anti-inflamatório (M2) (Matsubara et al., 2015).

4.4 Modulação do astrócito

Assim como os neurônios, os astrócitos morrem na fase aguda após a lesão medular (Casella et al., 2006) e ao contrário do esperado, o transplante de células-tronco derivadas do dente não interferiu na morte precoce dos astrócitos, que ocorreu nas primeiras vinte e quatro horas após a lesão. Já após setenta e duas horas da lesão há um aumento no número de astrócitos, interpretada como hiperplasia (Burda and Sofroniew, 2014), sendo que a proliferação e a hipertrofia dos astrócitos são respostas típicas à presença de lesão e estão associadas à formação da cicatriz glial (Ridet et al., 1997; Sofroniew, 2009). O grupo que recebe o tratamento com as SHED mantêm o número de astrócitos igual ao controle Naive setenta e duas horas. Essas alterações no número de astrócitos setenta e duas horas após a lesão medular provavelmente não interferiram na morte neuronal, já que essa ocorre de modo mais agudo, em seis e vinte quatro horas após a lesão.

Outro fator importante é que a superexpressão de GFAP causa o entrelaçamento dos processos astrocitários e contribui para a formação da cicatriz glial, constituindo uma barreira física à proliferação e regeneração de neuritos (Ahuja et al., 2017; Frisé et al., 1995; McKeon et al., 1991). Durante décadas a redução da cicatriz glial, por meio de enzimas que degradam substâncias produzidas pelo astrócito como o sulfato de condroitina ou até mesmo por meio da supressão gênica, tem sido perseguida para o tratamento da lesão medular (Xu et al., 2015). No entanto, a remoção completa dessa resposta aumenta a perda de neurônios e oligodendrócitos e, por consequência, há redução da função motora dos membros posteriores (Faulkner, 2004). Vinte e quatro horas após a lesão há uma redução na expressão da GFAP na medula espinal, quando verificado pelo método de ELISA, corroborando com a reduzida presença dessas células no parênquima, descritos nessa tese e na literatura prévia (Casella et al., 2006). O aumento na expressão de GFAP se deu quarenta e oito horas após a lesão. O grupo que recebeu o transplante de SHED foi capaz de manter os níveis normais da expressão de GFAP em quarenta e oito horas, restringindo a expressão de GFAP; resultado que também é visto em tempos posteriores à quarenta e oito horas, seis semanas após a lesão, por exemplo (Nicola et al., 2016; Sakai et al., 2012). Ou seja, o transplante de células derivadas do dente após a lesão medular é capaz de reduzir precocemente a formação da cicatriz glial no parênquima da medula.

Além da GFAP, os astrócitos produzem e secretam a S100B, proteína ligante de cálcio, que tem sido sugerida como um bom marcador para o dano em estruturas do encéfalo e também para as lesões na medula espinal (Lee et al., 2010; Vos et al., 2010). Os animais submetidos à

lesão medular apresentaram menor expressão da S100B na medula espinal vinte e quatro horas após a lesão, retornando aos níveis basais em quarenta e oito horas. Com a intervenção do transplante de células de polpa de dente humano, houve um retardo no decréscimo da expressão da S100B, estando reduzida apenas em quarenta e oito horas após a lesão. Essa redução que ocorreu nas primeiras vinte e quatro horas após a lesão no grupo lesão está de acordo com os resultados encontrados a partir da técnica da citometria de fluxo, onde foi evidenciado uma redução significativa de células astrocitárias nesse mesmo tempo, corroborando com a redução na expressão da S100B. A literatura descreve que o aumento na produção e liberação da S100B tem relação com a severidade da lesão, mas que isso só é esperado a partir de setenta e duas horas após o dano (Do Carmo Cunha et al., 2007); uma limitação do presente trabalho, que só avaliou a resposta dessa proteína até as quarenta e oito horas.

O astrócito exerce um papel importante na homeostasia local, realizando o controle hídrico através dos canais de água específicos dessa célula, como a aquaporina-4; a diminuição ou ausência dessa proteína é relacionada com o edema no local da lesão (Chen et al., 2016; Saadoun and Papadopoulos, 2010). Outra importante função astrocitária é a retirada do potássio extracelular através dos canais retificadores de potássio Kir 4.1, também específicos do astrócitos (Butt and Kalsi, 2006; Hibino et al., 2010). A expressão dessas duas proteínas foi avaliada seis horas após a lesão na medula espinal, e como esperado, houve uma redução na expressão de AQP4 no grupo que recebeu apenas lesão (Nesic et al., 2006). O transplante de SHED não foi capaz de prevenir essa redução da expressão da proteína AQP4, sugerindo a não influencia das SHED sobre a expressão de AQP4 e, portanto, na formação do edema. É natural que ocorra uma redução da expressão de Kir 4.1 sete dias após a lesão medular (Olsen et al., 2010), aqui, se verificou um aumento na expressão dessa enzima apenas para o grupo tratado com o transplante de SHED seis horas após a lesão. Esse resultado indica um possível efeito neuroprotetor, uma vez que, o aumento nos canais retificadores de potássio pode representar uma diminuição da concentração de potássio no meio extracelular, favorecendo a redução de excitabilidade neuronal (Butt and Kalsi, 2006).

4.5 Aumento do potencial das células progenitoras endógenas

Tendo o conhecimento da modulação astrocitária com redução da cicatriz glial, já documentada, espera-se que o tecido tenha aumentado a sua capacidade de plasticidade, o que inclui o aumento de células progenitoras. Tanto no sistema nervoso central quanto na medula

espinal são encontradas células no estágio inicial de diferenciação celular, normalmente na região periventricular e no canal central da medula espinal; essas células são denominadas células endimárias (Blades et al., 1998; Seki et al., 2007; Yamamoto et al., 2001). Na ocorrência de um evento deletério ao sistema, essas células endimárias são rapidamente substituídas por uma segunda população de células, com a mesma característica de uma célula progenitora, tronco (Seki et al., 2007); essas são consideradas um possível alvo terapêutico (Obermair et al., 2008; Yamamoto et al., 2001). Uma forma de identificar a presença dessas células progenitoras na medula espinal é por meio da presença da proteína vimentina, presente em células progenitoras neurais (Blades et al., 1998; Encinas et al., 2006). Há um aumento na expressão da proteína vimentina após a lesão medular, podendo significar um aumento no número de células progenitoras neurais na medula espinal ou a dediferenciação de células maduras, ou seja, o retorno à estágios mais precoces do desenvolvimento celular, o que tornaria o tecido mais “maleável” e susceptível à plasticidade neuronal (Blades et al., 1998). Seis horas após a lesão, por meio da citometria de fluxo, identificou-se maior número de células expressando vimentina no parênquima da medula espinal, permanecendo os níveis elevados até quarenta e oito horas após a lesão. O transplante de SHED acompanha o aumento na expressão da vimentina, porém esse aumento é significativamente maior do que o encontrado no grupo lesão a partir de vinte e quatro horas. Esse aumento no número de células expressando vimentina significa um aumento no número de células com características de células progenitoras, que por si só, já representa um evento de plasticidade tecidual.

4.6 Estudo do fenótipo das SHED na fase de cultura

Para melhor entender as modificações no comportamento tecidual e celular promovidos pelo transplante das células-tronco é preciso realizar estudos que elucidem o fenótipo dessas células candidatas ao transplante. As técnicas de imunofluorescência, de citometria de fluxo e Dot Blot foram realizadas na fase *in vitro* das SHED para verificar o perfil de expressão para marcadores de células progenitoras, neural e astrocitária. Matsubara e colaboradores (2015) demonstraram que nessa fase as SHED são capazes de expressar proteínas relacionadas com a neuroproteção e plasticidade axonal (Matsubara et al., 2015), bem como a nestina, proteína expressa por células progenitoras neurais (Sakai et al., 2012; Taghipour et al., 2012). Aqui, demonstrou-se que as SHED expressam vimentina, proteína de citoesqueleto de células precursoras neurais (Encinas et al., 2006), mas não expressam proteínas de astrócitos maduro

(GFAP) ou de neurônio maduro (β III-Tubulina). A expressão de proteínas de células maduras pelas SHED tem-se demonstrado controverso na literatura (Ellis et al., 2014; Sakai et al., 2012). A S100B, como já descrito nesta Tese, é uma proteína expressa por astrócitos e oligodendrócitos que pode ser liberada no meio extracelular e pode atuar como um fator trófico ou tóxico (Donato et al., 2013, 2009), foi encontrada nas SHED por meio da citometria de fluxo, imunofluorescência e Dot Blot; corroborando com os achados na literatura (Sakai et al., 2012). Pela primeira vez se identifica a S100B no meio de cultura das SHED e sugere-se que estas células-tronco possam estar liberando a S100B. Contudo, ainda não é possível afirmar se a liberação da proteína S100B por parte das SHED é um dos mecanismos responsáveis pela neuroproteção promovida pelo transplante de SHED após a lesão medular.

Resumindo, a presente Tese trouxe à luz a resposta a um dos porquês o transplante das células de dente decíduo humano promove a recuperação funcional e também abre terreno para novos questionamentos. Confirmou-se que o transplante das SHED promove a recuperação funcional e reduz a perda tecidual na medula espinal, e isso faz com que neurônios motores sobrevivam no corno anterior da medula espinal. Ficou claro que os efeitos do tratamento com SHED iniciam logo após o transplante, reduzindo a morte neuronal precoce; um efeito produzido pela menor entrada de células do sistema imune e menor resposta inflamatória, medida pela presença do TNF- α . Com a redução da hiperplasia e hipertrofia astrocitária e o aumento no número de células expressando vimentina, sugere-se maior plasticidade tecidual com potencial para a formação e regeneração de neuritos.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos por meio dos experimentos desenvolvidos nesta tese permitem concluir que o transplante de células-tronco derivadas do dente decíduo humano é capaz de promover a recuperação funcional, reduzir o volume da lesão e preservar o número de neurônios motores, verificados seis semanas após o transplante. O efeito neuroprotetor do transplante das SHED é decorrente da menor morte neuronal, no período agudo após a lesão. As SHED são capazes de inibir a entrada de células T, e de reduzir a hiperplasia astrocitária, que certamente contribuíram para a redução da citocina pró-inflamatória TNF- α e ao dano na mitocôndria, favorecendo a manutenção dos níveis normais de BCL-XL. Além desses marcadores, as SHED são capazes de interferir nos níveis do transportador de aminoácidos excitatórios (EAAT3) e da enzima neuronal óxido nítrico sintase (nNOS), indicando uma possível modificação nos níveis de glutamato no meio extracelular e na produção de óxido nítrico. A hiperplasia astrocitária foi minimizada na presença das SHED na medula espinal dos animais, assim como na expressão de Kir 4.1, o qual sofreu aumento, indicando uma possível aumento na captação de potássio pelos astrócitos na presença de SHED. Por fim, as SHED foram capazes de aumentar o número de células vimentina positivas na medula espinal lesada, ou seja, promoveu maior plasticidade tecidual. Essas alterações em células vimentina positivas, bem como em astrócitos, podem ser em decorrência da produção e liberação da proteína S100B, visualizado na fase *in vitro*, antes do transplante das SHED na medula lesada.

De modo resumido, os resultados estão apresentados na figura 7.

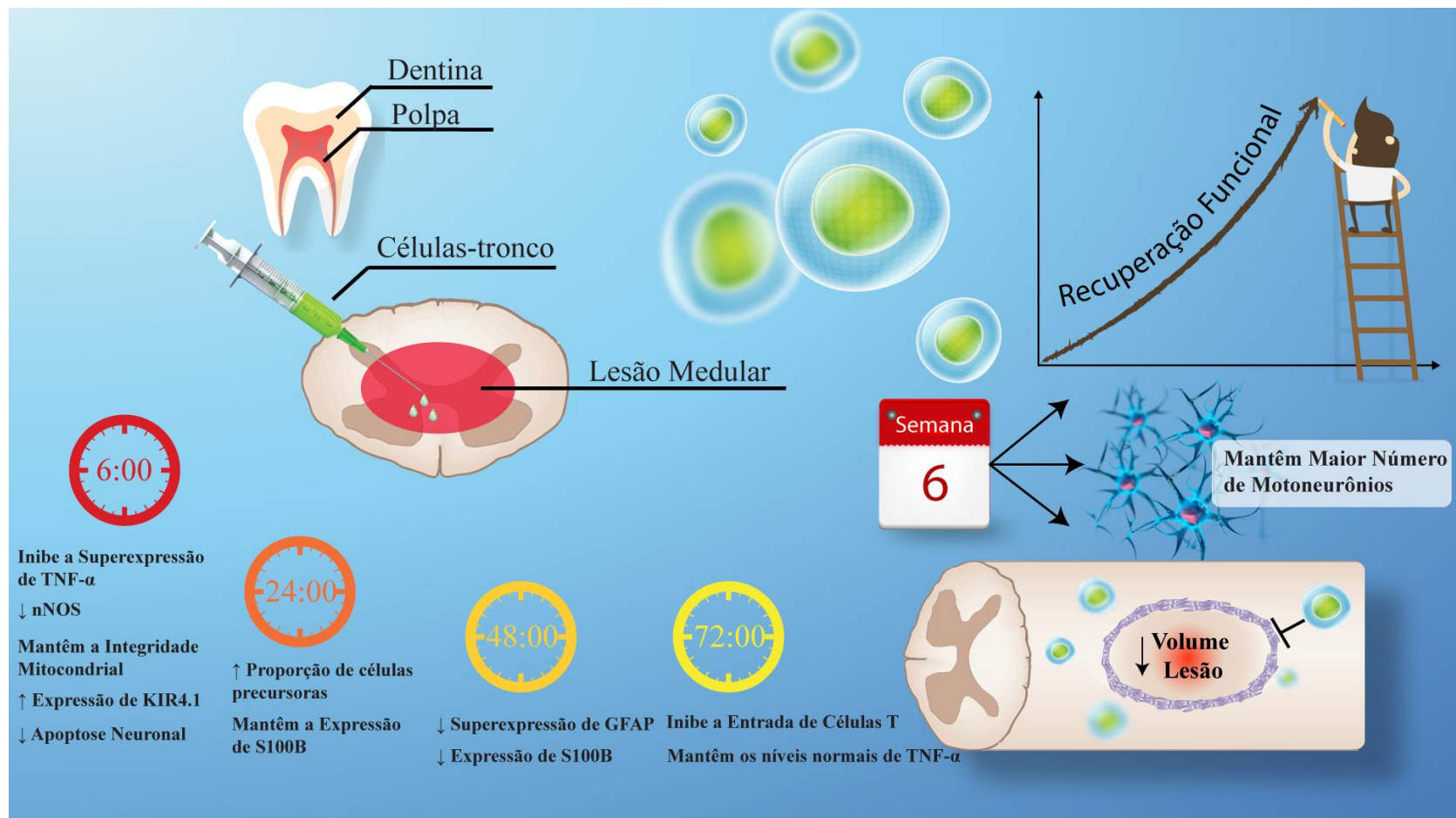


Figura 07. Infográfico dos principais resultados da presente Tese. As células tronco foram extraídas da polpa de dente decíduo humano (SHED), preparadas e implantadas 1 hora após a lesão na medula espinal de animais submetidos à lesão medular por contusão. Identificou-se que as SHED foram capazes de inibir a superexpressão de TNF- α , reduzir a expressão de nNOS, manter a integridade mitocondrial, aumentar a expressão de KIR 4.1 e de reduzir a apoptose neuronal na medula espinal, seis horas após a lesão. Em 24 horas, observou-se um aumento na proporção de células precursoras e a manutenção da expressão de S100B na medula espinal. Em 48 horas há a inibição da superexpressão de GFAP e redução na expressão de S100B. A entrada de células T na medula espinal é bloqueada na presença das SHED, bem como o aumento dos níveis de TNF- α em 72 horas após a lesão. Em seis semanas, observou-se redução no volume da lesão, aumento do número de neurônios motores no corno anterior da medula espinal e melhora na recuperação funcional.

6. PERSPECTIVAS

1 – Estudar os efeitos do estímulo ou inibição da produção da proteína S100B das células-tronco de dente decíduo humano antes do transplante como forma de tratamento da lesão medular;

2 - Verificar a influência do transplante das células-tronco de dente decíduo humano sobre as células endoteliais e moléculas de adesão na parede dos vasos após a lesão medular por contusão;

3 – Estudar a excitotoxicidade glutamatérgica após a lesão medular experimental em ratos submetidos ao transplante de células-tronco de dente decíduo humano.

4 – Verificar o número de oligodendrócitos e a entrada de células de Schwann na medula espinal após a lesão medular experimental em ratos submetidos ao transplante de células-tronco de dente decíduo humano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, M.F., Abdullah, S.F., Omar, N.S., Mahmood, Z., Noor, S.N.F.M., Kannan, T.P., Mokhtar, K.I., 2014. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. *Cell Biol. Int.* 38, 582–590. doi:10.1002/cbin.10229
- Academy, T., Cord, S., Professionals, I., Journal, T., Medicine, S.C., 2014. Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance. *J. Spinal Cord Med.* 37, 479–480. doi:10.1179/1079026814Z.000000000322
- Achilleos, A., Trainor, P. a, 2012. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res.* 22, 288–304. doi:10.1038/cr.2012.11
- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., Fehlings, M.G., 2017. Traumatic spinal cord injury. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17018. doi:10.1038/nrdp.2017.18
- Allaman, I., Bélanger, M., Magistretti, P.J., 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/j.tins.2010.12.001
- Anwar, M.A., Al Shehabi, T.S., Eid, A.H., 2016. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 98. doi:10.3389/fncel.2016.00098
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., Tetzlaff, W., 2017a. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 20, 637–647. doi:10.1038/nn.4541
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., Tetzlaff, W., 2017b. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 20, 637–647. doi:10.1038/nn.4541
- Balasingam, V., Yong, V.W., 1996. Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J. Neurosci.* 16, 2945–2955.
- Bartholdi, D., Schwab, M.E., 1997. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1422–38.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* 139, 244–256. doi:10.1006/exnr.1996.0098
- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12, 1–21.
- Beck, K.D., Nguyen, H.X., Galvan, M.D., Salazar, D.L., Woodruff, T.M., Anderson, A.J., 2010. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: Evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain* 133, 433–447. doi:10.1093/brain/awp322
- Benjelloun, N., Renolleau, S., Represa, a, Ben-Ari, Y., Charriaut-Marlangue, C., 1999. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal Rat. *Stroke.* 30, 1916-1923-1924. doi:10.1161/01.STR.30.9.1916
- Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Dalberto, T.P., Valentim, L., Bogo Chies, J.A., Medeiros Fossati, A.C., Pranke, P., 2011. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J. Endod.* 37, 973–979. doi:10.1016/j.joen.2011.04.010
- Bethea, J.R., 2000. Spinal cord injury-induced inflammation : a dual-edged sword. *Prog.*

Brain Res. Brain Res. 128, 33–42.

- Bethea, J.R., Nagashima, H., Acosta, M.C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A.E., Loor, K., Green, J., Dietrich, W.D., 1999. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord. *J. Neurotrauma* 16, 851–863.
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M.L., Enikolopov, G.N., Mintz, A., Delbono, O., 2013. Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2-glia. *Exp. Cell Res.* 319, 45–63. doi:10.1016/j.yexcr.2012.09.008
- Blades, D.A., Baldwin, S.A., Broderick, R., Scheff, S.W., 1998. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP- and vimentin-positive astrocytes after spinal cord injury contusion with the New York University spinal cord injury device. *J. Neurotrauma* 15, 1015–1026.
- Blomgren, K., Leist, M., Groc, L., 2007. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* 12, 993–1010. doi:10.1007/s10495-007-0754-4
- Bradbury, E.J., McMahon, S.B., 2006. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci* 7, 644–653. doi:10.1038/nrn1964
- Brewer, K.L., Bethea, J.R., Yeziarski, R.P., 1999. Neuroprotective Effects of Interleukin-10 Following Excitotoxic Spinal Cord Injury. *Exp. Neurol.* 159, 484–493. doi:10.1006/exnr.1999.7173
- Burda, J.E., Sofroniew, M. V., 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
- Burish, M.J., Peebles, J.K., Baldwin, M.K., Tavares, L., Kaas, J.H., Herculano-Houzel, S., 2010. Cellular scaling rules for primate spinal cords. *Brain. Behav. Evol.* 76, 45–59. doi:10.1159/000319019
- Butt, A.M., Kalsi, A., 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: A special role for Kir4.1 in glial functions. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 33–44. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00289.x
- Cacci, E., Claassen, J.H., Kokaia, Z., 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor-?? exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 80, 789–797. doi:10.1002/jnr.20531
- Casella, G.T.B., Bunge, M.B., Wood, P.M., 2006. Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp. Neurol.* 202, 8–20. doi:10.1016/j.expneurol.2006.05.028
- Cerqueira, S.R., Oliveira, J.M., Silva, N. a., Leite-Almeida, H., Ribeiro-Samy, S., Almeida, A., Mano, J.F., Sousa, N., Salgado, A.J., Reis, R.L., 2013. Microglia Response and In Vivo Therapeutic Potential of Methylprednisolone-Loaded Dendrimer Nanoparticles in Spinal Cord Injury. *Small* 9, 738–749. doi:10.1002/sml.201201888
- Chen, J.-Q., Zhang, C.-C., Jiang, S.-N., Lu, H., Wang, W., 2016. Effects of Aquaporin 4 Knockdown on Brain Edema of the Uninjured Side After Traumatic Brain Injury in Rats. *Med. Sci. Monit.* 22, 4809–4819. doi:10.12659/MSM.898190
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., Beattie, M.S., 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3, 73–76.
- David, S., Kroner, A., 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal

- cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 388–399. doi:10.1038/nrn3053
- de Almeida, F.M., Marques, S.A., Ramalho, B.D.S., Rodrigues, R.F., Cadilhe, D.V., Furtado, D., Kerkis, I., Pereira, L.V., Rehen, S.K., Martinez, A.M.B., 2011. Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 28, 1939–49. doi:10.1089/neu.2010.1317
- De Berdt, P., Vanacker, J., Ucakar, B., Elens, L., Diogenes, A., Leprince, J.G., Deumens, R., des Rieux, A., 2015. Dental Apical Papilla as Therapy for Spinal Cord Injury. *J. Dent. Res.* 94, 1575–81. doi:10.1177/0022034515604612
- Dereli, E.E., Yaliman, A., 2010. Comparison of the effects of a physiotherapist-supervised exercise programme and a self-supervised exercise programme on quality of life in patients with Parkinson's disease. *Clin. Rehabil.* 24, 352–362. doi:10.1177/0269215509358933
- Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., Noël, D., 2007. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells* 25, 2025–2032. doi:10.1634/stemcells.2006-0548
- Do Carmo Cunha, J., De Freitas Azevedo Levy, B., De Luca, B.A., De Andrade, M.S.R., Gomide, V.C., Chadi, G., 2007. Responses of reactive astrocytes containing S100 β protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: Implications for wound repair and neuroregeneration. *Wound Repair Regen.* 15, 134–146. doi:10.1111/j.1524-475X.2006.00194.x
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- Donato, R., Cannon, B., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., J. Weber, D., L. Geczy, C., 2013. Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57. doi:10.2174/156652413804486214
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 1008–1022. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009
- Dusart, I., Schwab, M.E., 1994. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 6, 712–724.
- Ellis, K.M., Carroll, D.C.O., Lewis, M.D., Rychkov, G.Y., Koblar, S.A., 2014. Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 1–13. doi:10.1186/scrt419
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Emery, E., Aldana, P., Bunge, M.B., Puckett, W., Srinivasan, A., Keane, R.W., Bethea, J., Levi, a D., 1998. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 89, 911–920. doi:10.3171/jns.1998.89.6.0911
- Encinas, J.M., Vaahtokari, A., Enikolopov, G., 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8233–8. doi:10.1073/pnas.0601992103

- Fathali, N., Ostrowski, R.P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., Zhang, J.H., 2013. Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Transl. Stroke Res.* 4, 208–219. doi:10.1007/s12975-012-0239-9
- Faulkner, J.R., 2004. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 24, 2143–2155. doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004
- Finetti, F., Basile, A., Capasso, D., Di Gaetano, S., Di Stasi, R., Pascale, M., Turco, C.M., Ziche, M., Morbidelli, L., D'Andrea, L.D., 2012. Functional and pharmacological characterization of a VEGF mimetic peptide on reparative angiogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 84, 303–311. doi:10.1016/j.bcp.2012.04.011
- Frisén, J., Johansson, C.B., Török, C., Risling, M., Lendahl, U., 1995. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* 131, 453–464. doi:10.1083/jcb.131.2.453
- Giusto, E., Donegà, M., Cossetti, C., Pluchino, S., 2014. Neuro-immune interactions of neural stem cell transplants: from animal disease models to human trials. *Exp Neurol* 260, 19–32. doi:10.1016/j.expneurol.2013.03.009
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. [Review] [59 refs]. *Science* (80-). 281, 1309–1312.
- Grimpe, B., 2004. A Novel DNA Enzyme Reduces Glycosaminoglycan Chains in the Glial Scar and Allows Microtransplanted Dorsal Root Ganglia Axons to Regenerate beyond Lesions in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 24, 1393–1397. doi:10.1523/JNEUROSCI.4986-03.2004
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, a, DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S., 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81, 531–535. doi:10.1177/154405910208100806
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., Shi, S., 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630. doi:10.1073/pnas.240309797
- Grossman, S.D., Rosenberg, L.J., Wrathall, J.R., 2001. Temporal–Spatial Pattern of Acute Neuronal and Glial Loss after Spinal Cord Contusion. *Exp. Neurol.* 168, 273–282. doi:10.1006/exnr.2001.7628
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Petenuzzo, L., de Lima, B.O., Fernandes, C.G., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2013. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. *Neurotoxicology* 34, 175–188. doi:10.1016/j.neuro.2012.10.015
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I. a N., 2010. Inwardly Rectifying Potassium Channels : Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366. doi:10.1152/physrev.00021.2009.
- Holohan, C., Szegezdi, E., Ritter, T., O'Brien, T., Samali, A., 2008. Cytokine-induced ??-cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL: Apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 591–606. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00191.x
- Jia, X., Kowalski, R.G., Sciubba, D.M., Geocadin, R.G., 2013. Critical Care of Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Intensive Care Med.* 28, 12–23. doi:10.1177/0885066611403270
- Jones, T.B., Hart, R.P., Popovich, P.G., 2005. Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 6576–83.

doi:10.1523/JNEUROSCI.0305-05.2005

- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K., 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 24, 1294–1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
- Kim, G.M., Xu, J., Song, S.K., Yan, P., Ku, G., Xu, X.M., Hsu, C.Y., 2001. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 21, 6617–25.
- Kim, Y.-H., Ha, K.-Y., Kim, S.-I., Wrathall, J., Shields, C., Roskams, A., 2017. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clin. Orthop. Surg.* 9, 1. doi:10.4055/cios.2017.9.1.1
- Klusman, I., Schwab, M.E., 1997. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res.* 762, 173–184. doi:10.1016/S0006-8993(97)00381-8
- Knoblach, S.M., Faden, a I., 1998. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 153, 143–151. doi:10.1006/exnr.1998.6877
- Kojima, A., Tator, C.H., 2002. Intrathecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes ependymal proliferation and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J.Neurotrauma* 19, 223–238.
- KWON, B., 2004. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury*1. *Spine J.* 4, 451–464. doi:10.1016/j.spinee.2003.07.007
- Lavine, S.D., Hofman, F.M., Zlokovic, B. V, 1998. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 52–58. doi:10.1097/00004647-199801000-00005
- Lee, B.B., Cripps, R. a, Fitzharris, M., Wing, P.C., 2014. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord* 52, 110–6. doi:10.1038/sc.2012.158
- Lee, J., Thumbikat, P., 2015. Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surg.* 1–10. doi:10.1016/j.mpsur.2015.04.003
- Lee, S.J., Kim, C.W., Lee, K.J., Choe, J.W., Kim, S.E., Oh, J.H., Park, Y.S., 2010. Elevated serum S100B levels in acute spinal fracture without head injury. *Emerg. Med. J.* 27, 209–212. doi:10.1136/emj.2008.063743
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., Gon??alves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.021
- Liu, X.Z., Xu, X.M., Hu, R., Du, C., Zhang, S.X., McDonald, J.W., Dong, H.X., Wu, Y.J., Fan, G.S., Jacquin, M.F., Hsu, C.Y., Choi, D.W., 1997. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5395–5406.
- Loane, D.J., Byrnes, K.R., 2010. Role of Microglia in Neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7, 366–377. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.002
- Lou, J., Lenke, L.G., Ludwig, F.J., O'Brien, M.F., 1998. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal cord Off. J. Int. Med. Soc. Paraplegia* 36, 683–690.

- Luisi, S., Barbachan, J., Chies, J., Filho, M., 2007. Behavior of Human Dental Pulp Cells Exposed to Transforming Growth Factor-Beta1 and Acidic Fibroblast Growth Factor in Culture. *J. Endod.* 33, 833–835. doi:10.1016/j.joen.2007.04.002
- Maltman, D.J., Hardy, S.A., Przyborski, S.A., 2011. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem. Int.* doi:10.1016/j.neuint.2011.06.008
- Matsubara, K., Matsushita, Y., Sakai, K., Kano, F., Kondo, M., Noda, M., Hashimoto, N., Imagama, S., Ishiguro, N., Suzumura, A., Ueda, M., Furukawa, K., Yamamoto, A., 2015. Secreted Ectodomain of Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promote Recovery after Rat Spinal Cord Injury by Altering Macrophage Polarity. *J. Neurosci.* 35, 2452–2464. doi:10.1523/JNEUROSCI.4088-14.2015
- McDonald, J.W., Becker, D., Holekamp, T.F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., Lu, J., Platik, M.M., Qu, Y., Stewart, T., Vadivelu, S., 2004. Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation. *J. Neurotrauma* 21, 383–393. doi:10.1089/089771504323004539 [doi]
- McDonald, J.W., Howard, M.J., 2002. Repairing the damaged spinal cord: A summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination, in: *Progress in Brain Research*. pp. 299–309.
- McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., Silver, J., 1991. Reduction of Neurite Outgrowth in a Model of Glial Scarring Following CNS Injury Is Correlated With the Expression of Inhibitory Molecules on Reactive Astrocytes. *J. Neurosci.* 11, 3398–3411.
- Menezes, K., de Menezes, J.R.L., Nascimento, M.A., Santos, R.D.S., Coelho-Sampaio, T., 2010. Poly laminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. *FASEB J.* 24, 4513–4522. doi:10.1096/fj.10-157628
- Mestriner, R.G., Pagnussat, A.S., Boisserand, L.S.B., Valentim, L., Netto, C.A., 2011. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp. Neurol.* 227, 53–61.
- Mita, T., Furukawa-Hibi, Y., Takeuchi, H., Hattori, H., Yamada, K., Hibi, H., Ueda, M., Yamamoto, A., 2015. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Behav. Brain Res.* 293, 189–197. doi:10.1016/j.bbr.2015.07.043
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S., 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807–5812. doi:10.1073/pnas.0937635100
- Moore, K.W., O’Garra, A., Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R., 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165–190.
- MOTHE, A., TATOR, C., 2005. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience* 131, 177–187. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.10.011
- Mothe, A.J., Tam, R.Y., Zahir, T., Tator, C.H., Shoichet, M.S., 2013. Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials* 34, 3775–3783. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.002
- Nagelhus, E. a., Mathiisen, T.M., Ottersen, O.P., 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1.

- Neuroscience 129, 905–913. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.053
- Nesic, O., Guest, J.D., Zivadinovic, D., Narayana, P. a., Herrera, J.J., Grill, R.J., Mokkalapati, V.U.L., Gelman, B.B., Lee, J., 2010. Aquaporins in spinal cord injury: The janus face of aquaporin 4. *Neuroscience* 168, 1019–1035. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.037
- Nesic, O., Lee, J., Ye, Z., Unabia, G.C., Rafati, D., Hulsebosch, C.E., Perez-Polo, J.R., 2006. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. *Neuroscience* 143, 779–792. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.079
- Nicaise, C., Mitrecic, D., Pochet, R., 2011. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 179–188. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01124.x
- Nichols, C.G., Lopatin, a N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 171–191. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.171
- Nicola, F. do C., Marques, M.R., Odorcyk, F., Arcego, D.M., Petenuzzo, L., Aristimunha, D., Vizuete, A., Sanches, E.F., Pereira, D.P., Maurmann, N., Dalmaz, C., Pranke, P., Netto, C.A., 2017. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res.* 1663, 95–105. doi:10.1016/j.brainres.2017.03.015
- Nicola, F.C., Rodrigues, L.P., Crestani, T., Quintiliano, K., Sanches, E.F., Willborn, S., Aristimunha, D., Boisserand, L., Pranke, P., Netto, C.A., 2016. Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 49, e5319. doi:10.1590/1414-431X20165319
- Ninan, I., 2014. Synaptic regulation of affective behaviors; Role of BDNF. *Neuropharmacology.* doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.011
- Obermair, F., Schröter, A., Thallmair, M., 2008. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury. *Physiology (Bethesda).* 23, 296–304. doi:10.1152/physiol.00017.2008
- Oliveira, J.F., Sardinha, V.M., Guerra-Gomes, S., Araque, A., Sousa, N., 2015. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci.* 38, 535–549. doi:10.1016/j.tins.2015.07.006
- Olsen, M.L., Campbell, S.C., McFerrin, M.B., Floyd, C.L., Sontheimer, H., 2010. Spinal cord injury causes a wide-spread, persistent loss of Kir4.1 and glutamate transporter 1: Benefit of 17??-oestradiol treatment. *Brain* 133, 1013–1025. doi:10.1093/brain/awq049
- Oyinbo, C.A., 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).*
- Park, D.Y., Mayle, R.E., Smith, R.L., Corcoran-Schwartz, I., Kharazi, A.I., Cheng, I., 2013. Combined Transplantation of Human Neuronal and Mesenchymal Stem Cells following Spinal Cord Injury. *Glob. Spine J.* 3, 1–6. doi:10.1055/s-0033-1337118
- Parr, A.M., Kulbatski, I., Zahir, T., Wang, X., Yue, C., Keating, A., Tator, C.H., 2008. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience* 155, 760–770.
- Pineau, I., Sun, L., Bastien, D., Lacroix, S., 2010. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory

- monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain. Behav. Immun.* 24, 540–553. doi:10.1016/j.bbi.2009.11.007
- Popovich, P.G., Wei, P., Stokes, B.T., 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.* 377, 443–464. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970120)377:3<443::AID-CNE10>3.0.CO;2-S [pii]
- Qiu, J., Nestic, O., Ye, Z., Rea, H., Westlund, K.N., Xu, G.Y., McAdoo, D., Hulsebosch, C.E., Perez-Polo, J.R., 2001. Bcl-xL expression after contusion to the rat spinal cord. *J. Neurotrauma* 18, 1267–1278. doi:10.1089/089771501317095304
- Ragni, E., Montemurro, T., Montelatici, E., Lavazza, C., Viganò, M., Rebullà, P., Giordano, R., Lazzari, L., 2013. Differential microRNA signature of human mesenchymal stem cells from different sources reveals an “environmental-niche memory” for bone marrow stem cells. *Exp. Cell Res.* 319, 1562–1574. doi:10.1016/j.yexcr.2013.04.002
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., Deloulme, J.-C., 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165–177. doi:10.1002/glia.20445
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577. doi:10.1016/S0166-2236(97)01139-9
- Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Santander, I., Barón-Flores, V., Caram-Salas, N., Diaz-Ruiz, A., 2015. Anti-Apoptotic Effects of Dapsone After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem. Res.* doi:10.1007/s11064-015-1588-z
- Rodrigues, L.P., Iglesias, D., Nicola, F.C., Steffens, D., Valentim, L., Witczak, A., Zanatta, G., Achaval, M., Pranke, P., Netto, C.A., 2012. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 49–57. doi:10.1590/S0100-879X2011007500162
- Rowland, J.W., Hawryluk, G.W.J., Kwon, B., Fehlings, M.G., 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus* 25, E2. doi:10.3171/FOC.2008.25.11.E2
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 168, 1036–1046. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.019
- Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., Hibi, H., Kadomatsu, K., Ishiguro, N., Ueda, M., 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J. Clin. Invest.* 122, 80–90. doi:10.1172/JCI59251
- Sawatzky, D. a, Willoughby, D. a, Colville-Nash, P.R., Rossi, A.G., 2006. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am. J. Pathol.* 168, 33–41. doi:10.2353/ajpath.2006.050058
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Cohen, I.R., 1999. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/S0166-2236(99)01405-8
- Seki, T., Namba, T., Mochizuki, H., Onodera, M., 2007. Clustering, migration, and neurite

- formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 502, 275–290. doi:10.1002/cne
- Shanti, R.M., Li, W.-J., Nesti, L.J., Wang, X., Tuan, R.S., 2007. Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 65, 1640–7. doi:10.1016/j.joms.2007.04.008
- Shende, P., Subedi, M., 2017. Pathophysiology, mechanisms and applications of mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Biomed. Pharmacother.* 91, 693–706. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.126
- Shin, J.C., Kim, D.H., Yu, S.J., Yang, H.E., Yoon, S.Y., 2013. Epidemiologic change of patients with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med* 37, 50–56. doi:10.5535/arm.2013.37.1.50
- Sibille, J., Pannasch, U., Rouach, N., 2014. Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J. Physiol.* 592, 87–102. doi:10.1113/jphysiol.2013.261735
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., Banik, N.L., 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* 87, 10–20. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.10.004
- Sofroniew, M. V, 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002
- Taghipour, Z., Karbalaie, K., Kiani, A., Niapour, A., Bahramian, H., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., 2012. Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stem Cells Promote Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. *Stem Cells Dev.* 21, 1794–1802. doi:10.1089/scd.2011.0408
- Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., Papadopoulos, M.C., 2008. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci.* 31, 37–43. doi:10.1016/j.tins.2007.11.003
- Tator, C.H., Fehlings, M.G., 1991. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* doi:10.3171/jns.1991.75.1.0015
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andrezza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Gonçalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* 162, 282–286. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.001
- Verfaillie, C., 2005. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 265, 55–61.
- Vidal, P.M., Lemmens, E., Dooley, D., Hendrix, S., 2013a. The role of “ anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 1–12. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.08.008
- Vidal, P.M., Lemmens, E., Geboes, L., Vanganswinkel, T., Nelissen, S., Hendrix, S., 2013b. Late blocking of peripheral TNF- α is ineffective after spinal cord injury in mice. *Immunobiology* 218, 281–284. doi:10.1016/j.imbio.2012.05.007
- Vos, P.E., Jacobs, B., Andriessen, T.M.J.C., Lamers, K.J.B., Borm, G.F., Beems, T., Edwards, M., Rosmalen, C.F., Vissers, J.L.M., 2010. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology* 75, 1786–93. doi:10.1212/WNL.0b013e3181fd62d2

- Wagers, A.J., Weissman, I.L., 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. doi:10.1016/S0092-8674(04)00208-9
- Weeks, J., Hart, R.P., 2004. SCI-Base: an open-source spinal cord injury animal experimentation database. *Lab Anim. (NY)*. 33, 35–41.
- Weis, S.N., Pettenuzzo, L.F., Krolow, R., Valentim, L.M., Mota, C.S., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., 2012. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 12, 271–279. doi:10.1016/j.mito.2011.10.002
- Wislet-Gendebien, S., 2003. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 116, 3295–3302. doi:10.1242/jcs.00639
- Xavier Acasigua, G., Bernardi, L., Braghirolli, D., Filho, M., Pranke, P., Medeiros Fossati, A., 2014. Nanofiber Scaffolds Support Bone Regeneration Associated with Pulp Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9, 330–337. doi:10.2174/1574888X09666140228123911
- Xu, C., Klaw, M.C., Lemay, M. a., Baas, P.W., Tom, V.J., 2015. Pharmacologically inhibiting kinesin-5 activity with monastrol promotes axonal regeneration following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 263, 172–176. doi:10.1016/j.expneurol.2014.10.013
- Yalvaç, M.E., Yarat, A., Mercan, D., Rizvanov, A.A., Palotás, A., Şahin, F., 2013. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. *Brain. Behav. Immun.* 32, 122–130. doi:10.1016/j.bbi.2013.03.007
- Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., Ueda, M., 2013. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke* 44, 551–554. doi:10.1161/STROKEAHA.112.676759
- Yamamoto, S., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., Nakafuku, M., 2001. Proliferation of Parenchymal Neural Progenitors in Response to Injury in the Adult Rat Spinal Cord 127, 115–127. doi:10.1006/exnr.2001.7798
- Yamashita, Y.M., Mahowald, A.P., Perlin, J.R., Fuller, M.T., 2007. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 315, 518–521. doi:10.1126/science.1134910
- Yan, P., Li, Q., Kim, G.-M., Xu, J., Hsu, C.Y., Xu, X.M., 2001. Cellular Localization of Tumor Necrosis Factor- α Following Acute Spinal Cord Injury in Adult Rats. *J. Neurotrauma* 18, 563–568. doi:10.1089/089771501300227369
- Yin, F., Guo, L., Meng, C.Y., Liu, Y.J., Lu, R.F., Li, P., Zhou, Y.B., 2014. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain Res.* 1561, 1–10. doi:10.1016/j.brainres.2014.02.047
- Zech, N.H., 2004. Adult stem cell manipulation and possible clinical perspectives. *J. REPRODUKTIONS MED. ENDOKRINOL.* 91–99. doi:10.1783/147118910791749425
- Zhao, H., Chai, Y., 2015. Stem Cells in Teeth and Craniofacial Bones. *J. Dent. Res.* 94, 1495–1501. doi:10.1177/0022034515603972
- Zhu, C., Wang, X., Qiu, L., Peeters-Scholte, C., Hagberg, H., Blomgren, K., 2004. Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J. Neurochem.* 90, 462–471.

doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02500.x

Zuk, P.A., 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105

8. ANEXOS

8.1 Carta de aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 26116

Título: Efeito do Transplante de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Dente Decíduo Humano Sobre a Neuroproteção, Inflamação e Recuperação Funcional de Ratos Wistar Submetidos à Lesão Medular

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLOS ALEXANDRE NETTO - coordenador desde 01/03/2014
PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE - pesquisador desde 01/03/2014
EDUARDO FARIAS SANCHES - pesquisador desde 01/03/2014
Fabrício do Couto Nicola - pesquisador desde 01/03/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 14/07/2014 - Sala 308 - Prédio da Faculdade de Educação - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 184 ratos machos Wistar adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 31 de Julho de 2014

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética