

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES CANINAS NA
ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

ALISSON VINÍCIUS GIMENES OLBERA

BOTUCATU-SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES CANINAS NA
ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

ALISSON VINÍCIUS GIMENES OLBERA

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins
Amorim

O43p

Olbera, Alisson Vinícius Gimenes

Potencial terapêutico de células estromais
mesenquimais multipotentes caninas na
encefalomielite autoimune experimental / Alisson
Vinícius Gimenes Olbera. -- Botucatu, 2024
73 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Rogério Martins Amorim

1. Terapia celular. 2. Imunologia. 3.
Meningoencefalite. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da
Unesp.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Impacto potencial desta pesquisa

Título da Dissertação - Potencial terapêutico de células estromais mesenquimais multipotentes caninas na encefalomyelite autoimune experimental

Impacto científico esperado: Aplicação de uma nova modalidade terapêutica para a doença conhecida como Meningoencefalomyelitis of Unknown Origin (MUO), que afeta cães, impactando de forma importante a qualidade de vida.

Impacto social: O desenvolvimento de uma nova modalidade terapêutica para MUO pode melhorar a qualidade de vida dos cães afetados. Isso, por sua vez, reduz o impacto emocional e financeiro sobre os tutores, que muitas vezes possuem um forte vínculo afetivo com seus animais.

Impacto econômico: Ao aprimorar as estratégias terapêuticas, esta pesquisa pode ajudar a reduzir os custos de tratamento a longo prazo para os tutores, oferecendo uma alternativa mais eficiente em comparação com tratamentos prolongados e ineficazes.

Potential impact of this research

Dissertation Title - Therapeutic Potential of Multipotent Canine Mesenchymal Stromal Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Expected Scientific Impact: Application of a new therapeutic modality for the disease known as Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin (MUO), which affects dogs and significantly impacts their quality of life.

Social Impact: The development of a new therapeutic modality for MUO could improve the quality of life for affected dogs. This, in turn, reduces the emotional and financial burden on pet owners, who often have a strong emotional bond with their animals.

Economic Impact: By improving therapeutic strategies, this research could help reduce long-term treatment costs for owners, offering a more cost-effective alternative compared to prolonged and ineffective treatments.

Nome do Autor: Alisson Vinícius Gímenes Olbera

Título: POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES CANINAS NA ENCEFALOMIELE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária FMVZ –
UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Membro

Departamento de Biologia Estrutural e
Funcional IB – UNICAMP - Campinas

Prof. Dr. Matheus Bertanha

Membro

Departamento de Cirurgia e Ortopedia
FMB – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 19 de setembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço meus pais, Almir e Elaine, por seu apoio incondicional, amor e dedicação ao longo desta jornada acadêmica. Suas palavras de encorajamento e suporte emocional e financeiro foram fundamentais para que eu pudesse ter a oportunidade de alcançar este marco em minha vida.

Agradeço também à minha querida irmã, Amanda, pelo constante apoio, incentivo e amor incondicional ao longo de minha trajetória, além de abrir as portas de sua casa para minha estada durante os dias de experimento.

À minha amada namorada, Júlia, agradeço por sua compreensão, paciência e incentivo constantes. Sua presença foi um pilar de força nos momentos difíceis e uma fonte de alegria nos momentos de celebração. Sou imensamente grato por ter você ao meu lado, inspirando-me e compartilhando comigo cada passo desta trajetória tão significativa.

Agradeço de coração aos meus amigos Thiago e Vinícius pela presença constante, pelo companheirismo e pelas palavras de incentivo ao longo desta jornada. Suas amizades tornaram os desafios mais leves e os momentos de conquista ainda mais especiais.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Rogério Martins Amorim, pela orientação competente, pelas oportunidades de aprendizado e pela confiança depositada em mim. Seu apoio e expertise foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço sinceramente à equipe do laboratório do Professor Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pela colaboração e pelo ambiente de trabalho inspirador, em especial ao Santiago e Sarah, que me auxiliaram em todas as etapas do experimento. Suas orientações, discussões e contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelo apoio técnico, científico e humano, que enriqueceu minha experiência acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos vocês, meu sincero agradecimento por fazerem parte desta conquista e por serem fontes de inspiração em minha jornada acadêmica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação da quantidade absoluta e em porcentagem dos animais avaliados no CatWalk XT® em cada momento experimental	32
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental.....	22
Figura 2 -	Escore clínico 3 na EAE.....	23
Figura 3 -	Interface do sistema CatWalk XT®.....	25
Figura 4 -	cAT-MSCs na microscopia óptica.....	28
Figura 5 -	Imagens da viabilidade celular.....	29
Figura 6 -	Gráfico representando a variação média de peso dos grupos.....	30
Figura 7 -	Gráfico representando o início e evolução dos escores clínicos dos camundongos.....	31
Figura 8 -	Gráficos com os valores analisados pelo CatWalk XT®.....	33
Figura 9 -	Imagens e gráficos representativos da imunofluorescência....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

BDNF – Fator neurotróficos derivado do cérebro

BOS – *Base of support*

cAT-MSC – Células estromais mesenquimais de tecido adiposo canino

CIS - Síndrome Clinicamente Isolada

CD – *Cluster of differentiation*

COX – Ciclo-oxigenase

EAE – Encefalomielite autoimune experimental

ECB – Esclerose concêntrica de Baló

EM – Esclerose múltipla

EMB - Esclerose Múltipla Benigna

EMDA - Encefalomielite disseminada aguda

EMPP - Esclerose Múltipla Primária Progressiva

EMPS - Esclerose Múltipla Progressiva com Surto

EMRR - Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente

EMSP - Esclerose Múltipla Secundária Progressiva

EV – Vesículas extracelulares

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

HLA – Antígeno leucocitário humano

ICV - Intracerebroventricular

IDO - Indoleamina 2,3 deoxigenase

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS - Óxido nítrico induzível

IV - Intravenoso

MHC-II – Complexo maior de histocompatibilidade tipo II

MSC – Células estromais mesenquimais

MUO – Meningoencefalomielite de origem desconhecida

NGF - Fator de crescimento nervoso

NT-3 – Neurotrofina 3

ON – Óxido nítrico

PGE2 – Prostaglandina E2

PMSC – Células estromais mesenquimais de origem placentária

SC - Subcutâneo

SNC – Sistema nervoso central

TGF- β 1 – Fator de transformação do crescimento β 1

TNF – Fator de necrose tumoral

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs).....	12
2.2. Mecanismos de ação das MSCs na regeneração nervosa.....	13
2.3. Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).....	14
2.4. Similaridades entre esclerose múltipla em humanos e meningoencefalomielite de origem desconhecida em cães.	15
2.5. Terapia com células estromais mesenquimais multipotentes nos modelos animais de encefalomielite autoimune experimental	17
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivos gerais.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1. Comitê de ética animal	20
5.2. Delineamento experimental.	20
5.3. Expansão e avaliação da viabilidade das populações de AT-MSCs caninas.....	23
5.4. Transplante das AT-MSCs caninas.	24
5.5. Avaliação de marcha através do CatWalk XT®.....	24
5.6. Processamento do material biológico e análise de dados.	26
5.6.1. Processamento tecidual.....	26
5.6.2. Imunofluorescência e quantificação	26
5.6.3. Análise estatística.	28
6. RESULTADOS	28
6.1. Expansão e Viabilidade celular.....	28
6.2. Peso diário	30

6.3. Escore clínico	30	xi
6.4. Avaliação da marcha.....	32	
6.5. Imunofluorescência da medula espinhal.....	34	
7. DISCUSSÃO.....	36	
8. CONCLUSÕES.....	41	
9. BIBLIOGRAFIA.....	41	
10. ARTIGO CIENTÍFICO.....	49	

OLBERA, A.V.G. **Potencial terapêutico de células estromais mesenquimais multipotentes caninas na encefalomielite autoimune experimental.** Botucatu, 2024. 73p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

RESUMO

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um modelo pré-clínico para estudos e testes terapêuticos de doenças neuroinflamatórias, refletindo condições como a esclerose múltipla em humanos (EM) e a meningoencefalomielite de origem desconhecida (MUO) em cães. A EM e a MUO são condições autoimunes que afetam o sistema nervoso central (SNC), causando neuroinflamação, desmielinização e neurodegeneração. O tratamento desses pacientes geralmente envolve o uso de imunomoduladores e imunossupressores, visando reduzir os sintomas. As células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) têm despertado interesse crescente na pesquisa de doenças neuroimunes devido às suas propriedades imunomoduladoras e regenerativas. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia terapêutica das MSCs derivadas de tecido adiposo canino (cAT-MSCs), no modelo experimental de EAE em camundongos divididos em grupo não imunizado (n=2), EAE (n=6) e EAE+cAT-MSC (n=6) tratados no 7º dia pós-indução (DPI 7) com uma única dose intravenosa de 3×10^5 cAT-MSCs. Foram realizadas análises diárias de peso, escore clínico e de marcha até o DPI 29 e imunofluorescência da medula espinhal com marcadores GFAP, Iba1 e Sinaptofisina. O grupo EAE+cAT-MSCs apresentou retardo no início dos sinais clínicos, menor variação de marcha em membros pélvicos e uma cobertura sináptica maior que o grupo EAE ($p < 0,05$). Não houve diferença na variação de peso, na população glial, e na variação na análise de marcha em membros torácicos entre os grupos EAE e EAE+cAT-MSCs. Nossos resultados demonstram que a terapia com cAT-MSCs no DPI 7 retarda o início da doença clínica, e apresenta efeitos relacionados à manutenção da cobertura sináptica dos motoneurônios.

Palavras-chave: Terapia celular; imunologia; meningoencefalite

OLBERA, A.V.G. **Therapeutic Potential of Multipotent Canine Mesenchymal Stromal Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis**. Botucatu, 2024. 73p. Dissertation (Master's) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University.

ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a preclinical model used for the study and therapeutic testing of neuroinflammatory diseases, mirroring conditions like multiple sclerosis (MS) in humans and meningoencephalomyelitis of unknown origin (MUO) in dogs. Both MS and MUO are autoimmune conditions affecting the central nervous system (CNS), leading to neuroinflammation, demyelination, and neurodegeneration. Treatment for these patients typically involves the use of immunomodulators and immunosuppressants to alleviate symptoms. Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) have garnered increasing interest in the research of neuroimmune diseases due to their immunomodulatory and regenerative properties. The goal of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of canine adipose tissue-derived MSCs (cAT-MSCs) in the EAE experimental model in mice. The study involved three groups: a non-immunized group (n=2), an EAE group (n=6), and an EAE+cAT-MSC group (n=6), which were treated on the 7th day post-induction (DPI 7) with a single intravenous dose of 3×10^5 cAT-MSCs. Daily assessments of weight, clinical score, and gait were performed until DPI 29, along with spinal cord immunofluorescence analysis using markers GFAP, Iba1, and synaptophysin. The EAE+cAT-MSC group exhibited a delay in the onset of clinical signs, less gait variation in pelvic limbs, and greater synaptic coverage compared to the EAE group ($p < 0.05$). There was no difference in weight variation, glial population, or gait variation in thoracic limbs between the EAE and EAE+cAT-MSC groups. Our results demonstrate that therapy with cAT-MSCs on DPI 7 delays the onset of clinical disease and presents effects related to the maintenance of synaptic coverage of motor neurons.

Keywords: Cell therapy; immunology; meningoencephalitis

1. INTRODUÇÃO

As lesões inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) são particularmente incapacitantes, tanto para a espécie humana como para os animais domésticos (FRIESE et al, 2014). Dentre as enfermidades neuroimunes mais comuns nestas espécies, destacam-se a esclerose múltipla (EM) em seres humanos e as meningoencefalomielites de origem desconhecida (MUO) em cães (COATES & JEFFERY, 2014; FRIESE et al, 2014). Como modelo animal para a EM, a encefalomielite experimental autoimune (EAE) tem contribuído para o entendimento da fisiopatologia das doenças neuroimunes, principalmente no contexto da medicina translacional para desenvolvimento de novos fármacos (STROMNES & GOVERMAN, 2004).

Devido à limitada capacidade regenerativa do SNC, o potencial terapêutico das células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) tem sido estudado em várias condições neurológicas, como degenerativas e inflamatórias crônicas, assim como de dano neuronal agudo (KASSIS et al, 2013; de Freitas et al, 2022).

Embora ainda existam lacunas na compreensão dos mecanismos de ação das MSCs, sabe-se que a terapia com MSCs pode desempenhar um papel importante no controle das enfermidades neuroimunes, devido às suas atividades tróficas e sua capacidade em estimular a angiogênese, reduzir a inflamação, recrutar células progenitoras residentes e minimizar a fibrose podendo, assim, regenerar ou fornecer suporte para a sobrevivência das células existentes parcialmente danificadas (PERONI & BORJESSON, 2011; KASSIS et al, 2013). Essas células apresentam importante capacidade de diferenciação celular, regeneração, imunomodulação e neuroproteção (KASSIS et al, 2013; de Freitas et al, 2022). Além de desempenharem papel direto, a secreção de substâncias e fatores bioativos pelas MSCs, como as vesículas extracelulares (EVs) incluindo os exossomos, apresentam grande importância terapêutica (CLARK et al, 2019, HU et al, 2022).

Diferentes distúrbios neurológicos em seres humanos têm chamado

a atenção para o uso da terapia celular, de forma que muitos estudos em modelos animais e pré-clínicos têm sido conduzidos (em ratos, camundongos, coelhos, cães e em humanos), tais como para a doença de Parkinson, acidente vascular encefálico, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e para lesões da medula espinhal, demonstrando efeitos benéficos (COHEN, 2013; KASSIS et al, 2013; CLARK et al, 2019).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES (MSCs)

As MSCs são células progenitoras, isoladas de diversos tecidos adultos ou fetais com habilidades proliferativas, de diferenciação e terapêuticas (ZUK et al, 2001; VIDAL et al, 2007). As MSCs derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs) provêm de uma fonte acessível e são encontradas em diversas espécies (CREMONESI et al, 2011).

Critérios mínimos foram definidos para a caracterização e identificação das MSCs humanas *in vitro*: aderência ao plástico, potencial diferenciação para as linhagens mesodermas osteogênica, condrogênica e adipogênica, e expressão de marcadores mesenquimais (DOMINICI et al, 2006). Diversos trabalhos têm revelado um perfil de expressão de antígenos de superfície celular CD semelhante entre as AT-MSCs caninas e humanas, conforme descrito pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (KISIEL et al, 2012; SCREVEN et al, 2014). Entre eles, a expressão dos marcadores CD29, CD44, CD90 e a ausência de expressão de CD34, CD45, CD146 e MHC-II (KISIEL et al, 2012; SCREVEN et al, 2014).

A produção de fatores imunomoduladores solúveis secretados por meio dos exossomos pelas MSCs *in vitro*, como: fator de transformação do crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); fator de crescimento de hepatócitos (HGF); prostaglandina E2 (PGE2); indoleamina 2,3 deoxigenase (IDO); óxido nítrico

(ON); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e interleucina 6 (IL-6) foi demonstrada em diversas espécies animais (CARRADE & BORJESSON, 2013). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm reportado os efeitos de TGF- β , HGF, PGE2, IDO e IL-10 na supressão da proliferação e regulação de linfócitos T pelas MSCs humanas (ATOUI & CHIU, 2012). Kol et al. (2016) evidenciaram que, assim como as MSCs humanas e murinas, as MSCs caninas também possuem capacidade de inibir a polarização dos linfócitos Treg 17 (Th17) *in vitro*. Por outro lado, as MSCs humanas podem modular a resposta imune pela inibição da proliferação e diferenciação dos linfócitos B e das células natural killer (NK) (SPAGGIARI et al, 2008). A supressão da atividade citotóxica das células NK foi relacionada a diminuição da produção de IL-1 e IL-15 e produção de PGE2, IDO, TGF- β pelas MSCs (SPAGGIARI et al, 2008; JACOBS et al, 2013). Spaggiari et al. (2009) observaram que através da PGE2, as MSCs humanas interferem na diferenciação dos monócitos para células dendríticas, alterando a sua função e maturação e, conseqüentemente, prejudicando a ativação dos linfócitos T19. Ainda, as MSCs podem apresentar habilidade de migração, integração e sobrevivência em tecidos lesados (LIECHTY et al, 2000; ZHANG et al, 2005).

2.2. MECANISMOS DE AÇÃO DAS MSCs NA REGENERAÇÃO NERVOSA

Existem evidências de que as MSCs transplantadas no SNC migram para a área lesada, como áreas de hipóxia, apoptóticas, inflamadas, degeneradas e em certas condições podem se diferenciar em células neurais, melhorando a função neurológica, embora a diferenciação das MSCs em células da linhagem neural não seja o fator principal na recuperação funcional após lesão do sistema nervoso central ou periférico (PARR et al, 2007; MALTMAN et al, 2011; PAUL & ANISIMOV, 2013).

Em linhas gerais os mecanismos terapêuticos das MSCs estão relacionados com sua capacidade parácrina, neuro/axonioprotetiva, manipulação genética, contato célula-célula, angiogênese e modulação da apoptose (ZHANG et al, 2005; ATOUI & CHIU, 2012; SANCHEZ et al,

2017). Estudos sugerem que os fatores neurotróficos produzidos pelas MSCs podem gerar efeitos tróficos, aumentar a sobrevivência neuronal e a remielinização endógena (BAI et al, 2009; SANCHEZ et al, 2017).

No contexto das enfermidades do SNC, principalmente as neuroimunes, diversos estudos investigaram as propriedades terapêuticas das MSCs, devido aos seus efeitos imunomodulatórios relacionados com a secreção de HGF, TGF- β 1, PGE2, IDO, NO, VEGF, IL-6, anti-inflamatórios e de neuroproteção (CARRADE & BORJESSON, 2013; RAVANIDIS et al, 2015; LI et al, 2022). A secreção BDNF, NGF e neurotrofina 3 (NT-3) são importantes efeitos terapêuticos das MSCs que promovem neurogênese e conexões sinápticas (RACCHETTI & MELDOLESI, 2021).

Estudos indicam que as células Treg desempenham um papel importante não apenas na imunomodulação, mas também na promoção da diferenciação de oligodendrócitos e na (re)mielinização. Essa descoberta é significativa, pois as MSCs atuam estimulando as células Treg. (MELIEF et al, 2013; DOMBROWSKI et al, 2017).

2.3. ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE (EAE)

A encefalomyelite experimental autoimune (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) é induzida pela imunização de camundongos suscetíveis a proteínas associadas à mielina em um ambiente inflamatório (STROMNES & GOVERMAN, 2004). A EAE é um dos modelos animais mais estudados para as doenças neuroimunes humanas, como a Esclerose Múltipla (EM) (THOMÉ et al, 2014; THOMÉ et al, 2016; BERNARDES & OLIVEIRA, 2017). A partir dos estudos com EAE, evidenciou-se que linfócitos T CD4⁺ com fenótipos Th1 e Th17 (secretoras de IFN- γ e IL-17, respectivamente) periféricamente ativados são dirigidos contra autoantígenos no SNC em indivíduos suscetíveis, sendo os genes HLA de classe I e II os principais fatores de risco genético (FRIESE et al, 2014). Linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, células do sistema imune inato e micróglia

estão importantemente implicados na imunopatogênese da EM/EAE (RACCHETTI & MELDOLESI, 2021). Por outro lado, a inflamação crônica, resultante da produção de espécies reativas de oxigênio, leva a uma cascata de mecanismos degenerativos e falha dos processos neuroprotetivos/regenerativos acarretando em degeneração retrógrada ou Walleriana e apoptose neuronal (FRIESE et al, 2014; RACCHETTI & MELDOLESI, 2021).

2.4. SIMILARIDADES ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA EM HUMANOS E MENINGOENCEFALOMIELITE DE ORIGEM DESCONHECIDA EM CÃES

A EM humana é uma doença autoimune, crônica e multifocal do SNC, sendo a principal causa não-traumática de incapacidade em adultos jovens (FRIESE et al, 2014). Existem várias formas clínicas de EM, cada uma com características diferentes em termos de progressão e sintomas (CREE et al, 2016). A Síndrome Clinicamente Isolada (CIS) é um episódio único de disfunção neurológica com sintomas sugestivos de EM, mas que ainda não atende aos critérios diagnósticos completos, podendo evoluir para formas definitivas da doença dependendo das lesões observadas em ressonância magnética (CREE et al, 2016). A Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente (EMRR) é a forma mais comum, caracterizada por surtos de sintomas neurológicos seguidos de períodos de recuperação parcial ou completa, sem progressão contínua entre os surtos (CREE et al, 2016). Na Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP), os pacientes inicialmente apresentam o padrão de EMRR, mas ao longo do tempo desenvolvem uma progressão contínua dos sintomas com menos ou nenhum surto definido (CREE et al, 2016). A Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP) caracteriza-se pela progressão gradual da doença desde o início, sem surtos claros (CREE et al, 2016). A Esclerose Múltipla Progressiva com Surtos (EMPS) combina características da EMPP, com uma progressão contínua dos sintomas, intercalada com surtos de exacerbação (CREE et al, 2016). A Esclerose Múltipla Benigna (EMB) é caracterizada por sintomas leves e surtos infrequentes, com recuperação quase completa entre eles, resultando

em pouca ou nenhuma deficiência a longo prazo (CREE et al, 2016). Por fim, o curso fulminante é uma forma rara e agressiva que progride rapidamente, levando a incapacidades severas em um curto período de tempo (CREE et al, 2016).

A meningoencefalomielite de origem desconhecida (MUO, do inglês *Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin*) é um grupo de doenças autoimunes que afetam o SNC de cães, e possui três subtipos: Meningoencefalomielite granulomatosa (MEG), Meningoencefalite necrosante (MEN) e Leucoencefalite necrosante (LEN) (COATES & JEFFERY, 2014). Os cães afetados manifestam sinais clínicos relacionados à localização das lesões inflamatórias, como por exemplo, crises epiléticas, ataxia, redução do estado de consciência e cegueira (COATES & JEFFERY, 2014). A associação genética do MHC-II encontrada em alguns cães com MUOs está presente na EM (GREER et al, 2010). Sugere-se que a EM seja mediada por linfócitos Th1 e Th17, gerando desmielinização e lesão axonal (FRIESE et al, 2014). Cães com MUO apresentam características histopatológicas, clínicas e radiológicas semelhantes à EM, e além disso, as variantes agudas fulminantes ou não-prototípicas da esclerose múltipla, como a variante de Marburg, a esclerose concêntrica de Baló (ECB), e a encefalomielite disseminada aguda (EMDA) têm sido associadas a meningoencefalite necrosante dos cães (GREER et al, 2010). As formas focal e disseminada da MEG, consistentes com uma reação de hiperssensibilidade tardia, são também relacionadas com a EM (GREER et al, 2010).

A MUO é altamente debilitante, progressiva e apresenta prognóstico desfavorável (COATES & JEFFERY, 2014). Estudos recentes constataram que mesmo com o tratamento imunossupressor, 33% dos cães com MUO vieram a óbito em 3 dias (13/39) e 26% (30/116) em 7 dias após o diagnóstico (COATES & JEFFERY, 2014; LONG et al, 2017). Segundo a meta-análise de Granger et al. (2023), cães com MUO tratados com corticosteróides associados à citarabina apresentaram boa resposta, com sobrevida entre 8-464 dias em comparação a 3-63 dias em cães que receberam apenas corticosteróides. Conforme mencionado anteriormente, os fármacos

imunossupressores favorecem temporariamente o prognóstico, resultam na remissão parcial dos sinais clínicos e geralmente ocasionam efeitos adversos graves (GRANGER et al, 2023). Os corticosteroides podem causar ulcerações gastrointestinais e hepatotoxicidade, e outros fármacos imunossupressores, como a ciclosporina, a citarabina e a azatioprina podem gerar hepato e mielotoxicidade (COATES & JEFFERY, 2014).

A terapia celular com MSCs dispõe de um grande potencial para o tratamento de doenças imunomediadas e inflamatórias do SNC (GLENN, 2014). A capacidade de *homing* em tecidos inflamados, associada às propriedades imunomoduladoras/anti-inflamatórias e regenerativas, as torna uma alternativa promissora para o tratamento das meningoencefalomielites não-infecciosas (ATOUI & CHIU, 2012). Por conseguinte, tem existido um interesse crescente na terapia celular pela comunidade científica e indústrias de biotecnologia, no entanto, estudos com rigor científico *in vitro* e *in vivo* devem ser instituídos para direcionar o uso racional das MSCs e garantir a sua eficácia e segurança no âmbito clínico (GLENN, 2014).

A partir dos mecanismos imunológicos anteriormente mencionados, a terapia com MSCs objetiva aumentar a eficácia terapêutica nas doenças neuroimunes, dentre elas a EAE em camundongos, a MUO em cães e a EM em humanos, visando a recuperação clínica, neurorradiológica, dos parâmetros inflamatórios do líquido cefalorraquidiano (LCR) e do tecido nervoso, com a expectativa de favorecer o prognóstico e de evitar os efeitos adversos decorrentes dos fármacos imunossupressores (GLENN, 2014; LEONE et al, 2023).

2.5. TERAPIA COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES NOS MODELOS ANIMAIS DE ENCEFALOMIELE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE

Vários mecanismos podem estar envolvidos com os efeitos terapêuticos do transplante de MSCs nos modelos de EAE. Um dos mecanismos propostos é a imunomodulação periférica (FISHER-SHOVAL et al, 2012). Após o transplante IV de MSCs na EAE remitente-recorrente e/ou

crônica-progressiva, observou-se recuperação clínica, diminuição de infiltrados de células inflamatórias e da perda axonal no SNC (ZHANG et al, 2005; BAI et al, 2009). Esses efeitos são suportados pela supressão *in vitro* da atividade de linfócitos T pelas MSCs, associada à diminuição da produção de TNF- α e TNF- β , redução das citocinas pró-inflamatórias IL-17, INF- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α e incremento das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-5 *in vitro*, e supressão *in vivo* da infiltração de linfócitos B no SNC e da produção de anticorpos patogênicos contra mielina (ZHANG et al, 2005).

Anderson et al. (2017) demonstraram *in vitro* e *in vivo* o efeito imunossupressor das MSCs derivadas de tecido adiposo (AT-MSCs) murinas e humanas na EAE crônica em camundongos C57BL/6J. A atividade de linfócitos T e células dendríticas foi suprimida pela via do óxido nítrico induzível (iNOS) e da ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1,2) *in vitro* e houve a inibição da gravidade e progressão da EAE, evidenciada pela diminuição da função das células dendríticas e linfócitos T *in vivo* (GLENN, 2014).

O transplante intracerebroventricular (ICV) de células-tronco mesenquimais derivadas de placenta (PMSCs) xenogênicas (placentárias humanas) inibiu a progressão da EAE crônica e aumentou significativamente a sobrevivência dos camundongos, havendo redução da expressão *in vitro* da proteína anti-inflamatória TSG-6 em resposta ao TNF- α , IL-1- β , e ao meio condicionado com astrócitos ativados (FISHER-SHOVAL et al, 2012).

Adicionalmente, estudos sugerem que as MSCs podem contribuir com a neuroregeneração/remielinização nos modelos de doenças neuroimunes (FISHER-SHOVAL et al, 2012; CLARK et al, 2019; SANTOS et al, 2024). Zhang et al. (2005) notaram redução da desmielinização, aumento de BDNF e proliferação de oligodendrócitos em camundongos transplantados com MSCs derivadas de medula óssea humana na EAE crônica.

No contexto dos estudos sobre a EM, o modelo murino de EAE foi fundamental para ampliar os conhecimentos sobre a fisiopatologia e alternativas terapêuticas para a EM, incluindo o efeito benéfico das MSCs por meio da supressão de células T efectoras (ZAPPIA et al, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

A EM é uma doença autoimune crônica que afeta SNC, causando desmielinização e degeneração do SNC. Em modelos experimentais, como a EAE em roedores, a doença pode ser induzida, possibilitando o estudo de novas terapias. As MSCs têm se mostrado promissoras como estratégia terapêutica, devido à sua capacidade de regenerar tecidos, modular a resposta imune e promover a remielinização. Em medicina veterinária, as MUOs em cães são um grupo de doenças inflamatórias que compartilham semelhanças patológicas com a EM em humanos, ambas caracterizadas por processos autoimunes do SNC. A falta de terapias eficazes e o prognóstico reservado para as MUOs torna urgente o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas imunomoduladoras.

Neste cenário, o estudo das MSCs de cães em modelos murinos de EAE é uma estratégia para explorar seu potencial terapêutico em doenças neuroinflamatórias, permitindo avaliar a segurança, eficácia e compreender melhor os mecanismos da resposta terapêutica. Além disso, o modelo oferece um ambiente controlado para monitorar a progressão da doença e os efeitos das MSCs ao longo do tempo.

Nossa hipótese é que o tratamento dos camundongos induzidos à EAE com cAT-MSCs promove efeitos imunomoduladores e neuroprotetores, refletindo na evolução clínica e no ambiente neuroinflamatório do SNC.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma modalidade terapêutica imunomoduladora e neurorregenerativa para as MUO em cães, a partir da avaliação do potencial terapêutico das cAT-MSCs na EAE em camundongos como modelo animal para enfermidades neuroimunes.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a indução da EAE no modelo murino, a fim de obter evolução homogênea da doença nos animais;
- Avaliar os efeitos terapêuticos das cAT-MSCs no modelo murino de EAE, por meio de avaliação clínica e pesagens diárias e análises de marcha;
- Avaliar a neuroinflamação, população glial e cobertura sináptica por meio da análise por imunofluorescência dos cornos ventrais da intumescência lombar com os marcadores GFAP, Iba1 e Sinaptofisina;
- Correlacionar os achados da imunofluorescência com parâmetros clínicos e de marcha da EAE.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

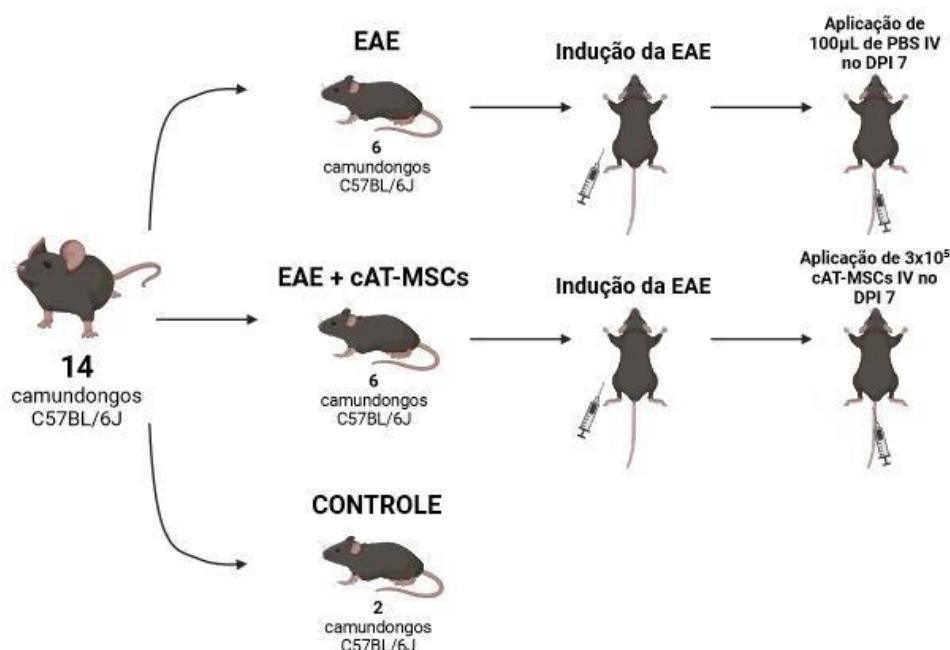
Todas as etapas deste estudo foram conduzidas de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal e foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil, de acordo com o protocolo número 6026-1/2022.

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 14 camundongos C57BL/6J (modelos da EAE crônica- progressiva), livres de patógenos, com 9 semanas de idade, fêmeas, foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Pesquisa Biológica na Escola de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP). Os camundongos foram alocados em gaiolas (três animais em cada gaiola, identificados com marcações na cauda), com alimento, água *ad libitum*, em ambiente com fotoperíodo controlado (ciclo de 12h/12h, escuro/claro), temperatura de 21°C e uma umidade relativa do ar de 50%, no biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa (LRN/UNICAMP,

Campinas, SP, Brasil).

Os animais foram divididos em 3 grupos: Controle, EAE e EAE+cAT-MSC, em que a doença foi induzida apenas nos grupos EAE e EAE+cAT-MSC. A doença foi induzida de maneira ativa nos camundongos de acordo com um protocolo previamente descrito (STROMES & GOVERMAN, 2004; THOMÉ et al, 2016). Os animais foram imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 (Genscript, Piscataway Township, New Jersey, EUA) emulsionado em adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por via subcutânea (SC) em ambos os flancos. Nos momentos 0 e 48h após a imunização, foram aplicados por via intraperitoneal 200ng de toxina pertussis para potencializar a progressão da doença (Ptx; Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) (STROMES & GOVERMAN, 2004; THOMÉ et al, 2016). No sétimo dia pós- indução (DPI 7), os camundongos do grupo EAE foram tratados pela via intravenosa (veia caudal) com 100µL de PBS, e o grupo EAE+cAT-MSC com 3×10^5 cAT-MSCs (**Figura 1**). A partir do DPI 8, os animais destes grupos foram submetidos à análise de marcha pelo CatWalk XT, até o DPI 29, e eutanasiados no dia seguinte (DPI 30) para coleta da região de interesse medular e posterior análise por imunofluorescência. Os animais do grupo controle foram eutanasiados e suas medulas utilizadas para imunofluorescência comparativa com os outros grupos.



Created in BioRender.com 

Figura 1. Delineamento experimental demonstrando a seleção dos grupos, indução da EAE e posterior tratamento com cAT-MSC (criado no BioRender.com).

Os camundongos foram pesados e examinados diariamente para a identificação dos sinais clínicos neurológicos da doença. Os sinais foram graduados de acordo com Stomes & Goverman (2004), com a seguinte escala:

- Grau 0,5: Flacidez da ponta da cauda;
- Grau 1: Flacidez da cauda;
- Grau 2: Dificuldade na marcha e paresia de membros pélvicos;
- Grau 2,5: Monoplegia de um dos membros pélvicos;
- Grau 3: Paraplegia (**Figura 2**);
- Grau 3,5: Paraplegia e paresia dos membros torácicos;
- Grau 4: Tetraplegia;

- Grau 5: Moribundo/Morte.



Figura 2. Camundongo C57BL/6J classificado com escore clínico 3 da EAE, de acordo com Stromes & Goverman (2004), apresentando paraplegia. (arquivo pessoal)

5.3. EXPANSÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS POPULAÇÕES DE AT-MSCS CANINAS

Foram selecionadas células previamente isoladas e caracterizadas do banco de células-tronco do Núcleo Translacional de Medicina Regenerativa (NUTRAMERE) da FMVZ/UNESP - Botucatu, em passagem P4. As cAT-MSCs foram descongeladas, colocadas em garrafas de T75 e expandidas durante cinco dias, previamente à aplicação no modelo experimental em estufa a 37°C em atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% CO₂. O meio de cultivo utilizado foi de 90% de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Waltham, Massachussets, EUA) 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e foi trocado após as primeiras 48 horas. As células foram tripsinizadas (trypsin, 0,25%, Invitrogen, São Paulo, Brasil) quando atingiram 80-90% de confluência e posteriormente contadas em câmara de Neubauer

e ressuspensas em PBS estéril para aplicação endovenosa no modelo experimental. A viabilidade celular foi avaliada em cultivo de cinco dias (mesmo período de expansão) sobre lamínula em placas de 12 poços, por meio do LIVE/DEAD® *Cell Viability Assay* (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA), e quantificado com o software ImageJ (versão 1.54i, National Institutes of Health, EUA).

5.4. TRANSPLANTE DE AT-MSCS CANINAS

O transplante celular ou aplicação de PBS foi realizado no DPI 7, antes do desenvolvimento dos sinais clínicos, pela via intravenosa nos camundongos com EAE. Logo após preparo e antissepsia da região da cauda, 3×10^5 cAT- MSCs ressuspensas em 100µl de PBS e 100µl de PBS puro foram injetados lentamente via endovenosa nos grupos EAE+cAT-MSC e EAE, respectivamente. As injeções na veia da cauda foram realizadas usando seringas de 1mL conectadas a um sistema hipodérmico padrão de agulhas.

5.5. AVALIAÇÃO DA MARCHA PELO CATWALK XT®

Foram avaliados três parâmetros separadamente e depois agrupados entre membros torácicos e pélvicos: *max contact* (%), *max intensity* (%) e *base of support* (BOS) (cm). Além disso, o parâmetro *step sequence regularity index* (%) foi calculado com base nas passadas com os quatro membros. dos animais foram adquiridos a partir do sistema CatWalk XT® (Noldus Inc., Holanda), e a classificação foi realizada com o auxílio do software CT System versão XT 10.6 (Noldus Inc., Holanda) a partir de um ponto de tempo basal (antes da indução) e diariamente a partir do dia seguinte às aplicações, até o DPI 29. Foram registradas três corridas por animal diariamente. O sistema CatWalk XT® é uma plataforma de análise de marcha automatizada e computadorizada, frequentemente utilizada em estudos pré-clínicos para avaliar a locomoção em animais, como ratos e camundongos. Consiste em uma passarela transparente e iluminada, onde

os animais caminham livremente enquanto são gravados por uma câmera de alta velocidade posicionada abaixo da passarela (GARRICK et al, 2021). Durante o movimento, as pegadas dos animais são registradas pela câmera, com o auxílio de luz infravermelha para melhorar a visibilidade das pegadas (GARRICK et al, 2021). O software CatWalk XT[®] (**Figura 3**) é então utilizado para analisar os dados coletados, permitindo a quantificação de uma variedade de parâmetros da marcha, como duração e intensidade das pegadas, comprimento e largura da passada, contato da pata com a superfície, entre outros (BERNARDES & OLIVEIRA, 2017; GARRICK et al, 2021). Essa análise é automatizada, reduzindo a necessidade de intervenção manual e aumentando a precisão e eficiência da avaliação (GARRICK et al, 2021). O CatWalk XT[®] é aplicado para estudar distúrbios neurológicos, lesões na medula espinhal, doenças musculares, efeitos de drogas e terapias de reabilitação, entre outros (GARRICK et al, 2021).

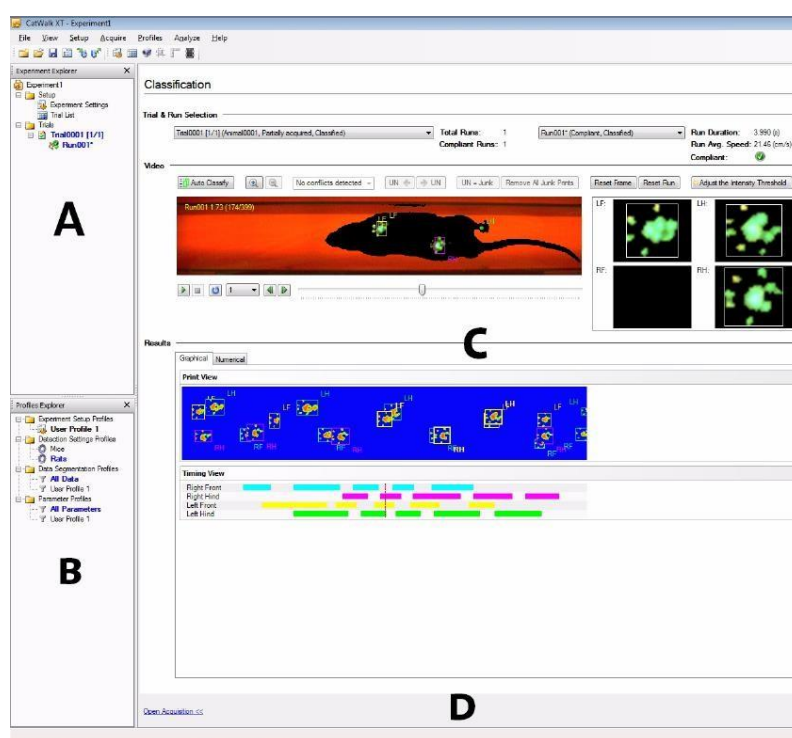


Figura 3. Interface do sistema CatWalk XT[®]. **A:** Explorador de experimentos, **B:** Explorador de perfis, **C:** Área de trabalho, **D:** Barra de navegação. (NOLDUS, 2013).

5.6. PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE DE DADOS

5.6.1. Processamento tecidual

No DPI 30, todos os animais foram anestesiados por uma mistura de xilazina (Anasedan, Ceva, Paulínia, Brasil) e cetamina (Dopalen, Ceva, Paulínia, Brasil) nas doses de 80mg/kg e 400mg/kg respectivamente, e foram submetidos à toracotomia, seguida de perfusão transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,38), seguido por solução tampão de paraformaldeído a 4%. Para investigar a eficácia das cAT-MSCs na EAE murina, a intumescência lombar (segmentos L4-L6) foi selecionada, devido a progressão das lesões da medula espinhal associadas ao modelo e o processamento tecidual foi realizado conforme descrito anteriormente (SILVA et al, 2014). Após a eutanásia e dissecação das regiões medulares de interesse dos camundongos, estas foram preparadas para o congelamento com solução de sacarose 30%, posteriormente incluídas em meio de criopreservação (Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura, Japão) e congeladas em n-hexano líquido, numa temperatura variando de -30 e -40°C durante 5 minutos. O material contendo o fragmento medular foi estocado em -20°C até o momento da criotomia. Seções de 12µm foram realizadas com o auxílio de um criostato (Leica CM1860, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) foram realizados e depositados em lâminas de microscopia gelatinizadas previamente com uma solução de gelatina purificada e sulfato de cromo e potássio dodecahidratado. Quatro seções foram colocadas por lâmina gelatinizada. As lâminas foram mantidas a -20°C até o uso para os protocolos de imunofluorescência (SILVA et al, 2014).

5.6.2. Imunofluorescência e quantificação

O protocolo de imunofluorescência e quantificação foi realizado de acordo com descrição anterior (SILVA et al, 2014). As lâminas foram

aclimatadas à temperatura ambiente por 15 minutos e depois lavadas em tampão fosfato (PB) (3 vezes de 5 minutos cada). Após incubação por 45 minutos com solução de bloqueio contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA), as lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C com uma solução contendo 1% de BSA, 0,2% de Triton e o anticorpo primário diluído. Anti-Iba1 (molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1; Rabbit, Wako, 1:750) foi usada para avaliar a reação microglial, bem como a infiltração de macrófagos derivados de monócitos no microambiente da medula espinhal. Anti-GFAP (proteína ácida glial fibrilar; Rabbit, Abcam AB7260, 1:1000) foi usada para avaliar a reação dos astrócitos e anti-sinaptofisina (Rabbit, Novusbio, 1:1,000) para avaliar a cobertura sináptica. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PB e incubadas por 45 minutos com o anticorpo secundário fluorescente (Alexa Fluor® 488, Goat anti-rabbit IgG, Abcam, ab150077, 1:500). Após, as lâminas foram lavadas novamente com PB e incubadas e montadas usando uma mistura 1:3 de glicerol e PB e reservadas a -20°C para posterior leitura. As lâminas imunomarcadas foram observadas em um microscópio de fluorescência Leica DM 5500B acoplado a uma câmera Leica DFC 345FX. Para fins de quantificação, foram selecionados os melhores cortes da medula em cada lâmina e imagens das regiões ventrais esquerda e direita, onde os motoneurônios somáticos estão localizados, na lâmina IX, segundo Rexed (1954). As regiões foram capturadas usando uma objetiva de 20X para as seções marcadas com anti-Iba1 e anti-GFAP, e objetiva de 40X para as seções marcadas com anti-sinaptofisina. Para a quantificação, a densidade integrada de pixels (IDP) foi realizada usando o software ImageJ (versão 1.54i, National Institutes of Health, EUA). Para Iba1 e GFAP, as medidas foram feitas em todas as fotos e para Sinaptofisina, a medida foi restrita a oito pontos equidistantes de dois neurônios por foto (círculos de 24 pixels). A média IDP foi calculada para cada animal e então a média das razões para cada grupo $\pm$ erro padrão foi estabelecida (SILVA et al, 2014).

5.6.3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism[®] 8.0.1 e os dados foram apresentados como média dos grupos $\pm$ erro padrão. As análises de peso diário, escore clínico e os parâmetros de marcha do CatWalk XT entre os grupos foram submetidos ao teste t. Os valores de IDP dos grupos Controle, EAE e EAE+cAT-MSc foram submetidos ao teste ANOVA One- Way, e correção de múltiplas comparações com *Two Stage Step-up* de Benjamini, Krieger e Yekutieli, e em todos os casos, as diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando os valores de *p* foram menores que 0,05.

6. RESULTADOS

6.1. EXPANSÃO E VIABILIDADE CELULAR

As cAT-MSCs apresentaram morfologia fibroblastoide, aderência ao plástico e proliferação, atingindo 80-90% de confluência em 5 dias de cultura (**Figura 4**). Após realização do ensaio LIVE/DEAD[®] com as cAT-MSCs e posterior análise pelo software ImageJ, a viabilidade celular encontrada foi em média 97% (**Figura 5**).

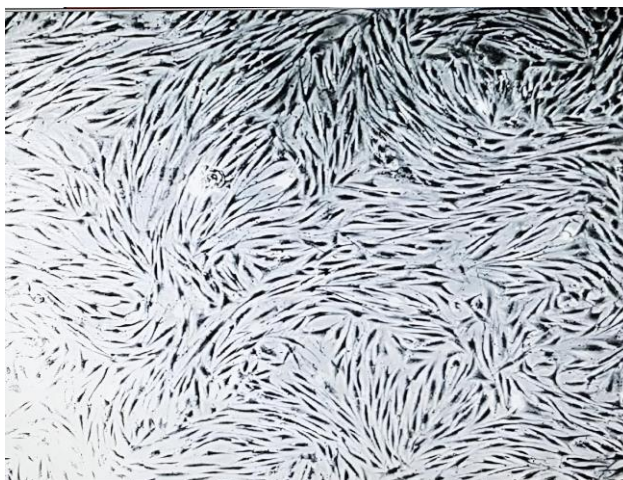


Figura 4. Aparência microscópica das cAT-MSCs após 5 dias de cultura. Aumento de 10x. (arquivo pessoal)

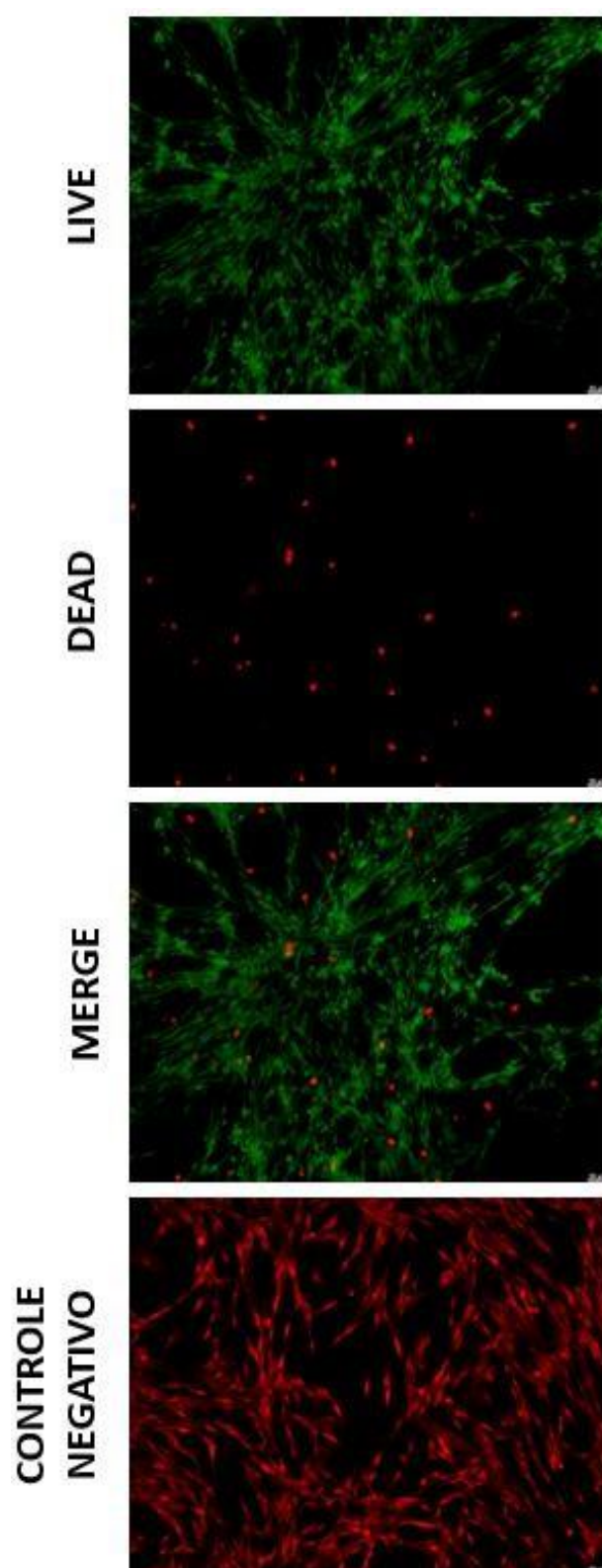


Figura 5. Quantificação da viabilidade celular com o ensaio LIVE/DEAD®. (arquivo pessoal).

6.2. PESO DIÁRIO

A **Figura 6** mostra a variação diária dos grupos com relação ao valor de peso basal, e embora o Grupo Controle aparente sofrer uma variação mais drástica ao longo da progressão da doença, principalmente durante o pico da EAE (4-5 dias após início dos primeiros sinais), não houve diferenças estatísticas entre os grupos. É possível observar uma redução significativa dos pesos de ambos os grupos coincidindo com a piora clínica e evolução do quadro de EAE, e a recuperação gradual ao longo dos dias do experimento.

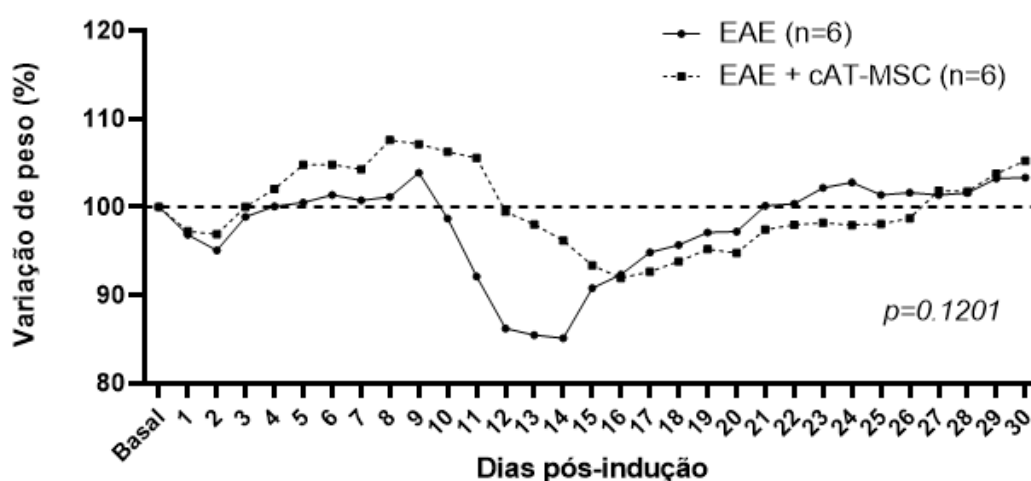


Figura 6. Gráfico representando a variação média de peso com relação ao basal, ao longo da progressão da EAE. Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos.

6.3. ESCORE CLÍNICO

Os valores diários da evolução clínica da EAE estão representados na **Figura 7**. Foi observado um retardo no início dos sinais clínicos no grupo tratado com as cAT-MSCs, porém ambos os grupos atingiram escores semelhantes da EAE, e não houve diferença estatística entre a média de escore clínico entre os grupos. O tempo médio de início dos sinais em cada um dos grupos também foi avaliado,

e o grupo EAE+cAT-MSC apresentou início mais tardio que o grupo controle (**A**, na **Figura 7**).

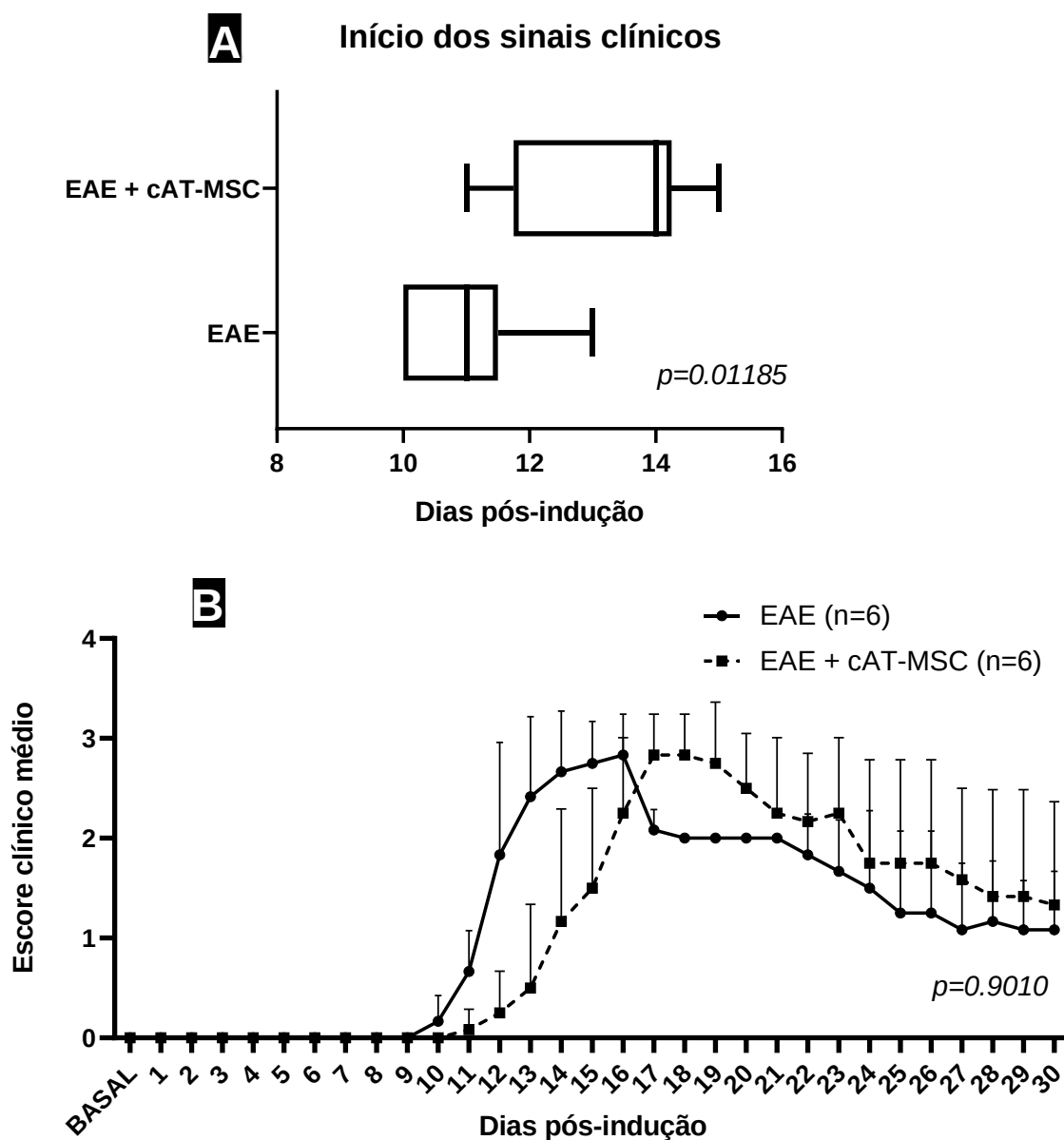


Figura 7. Gráfico representando o início e evolução dos escores clínicos dos camundongos conforme progressão da EAE. **A:** Representação da média de início dos sinais em cada grupo, com o grupo EAE+cAT-MSC estatisticamente iniciando mais tardiamente a EAE clínica. **B:** Evolução diária dos sinais ao longo do experimento, note o desvio para direita do grupo EAE+cAT-MSC, devido início tardio da sintomatologia da EAE, mas com morfologia do gráfico semelhante ao grupo controle. A média

de escore clínico entre os grupos não diferiu estatisticamente ao longo do experimento.

6.4. AVALIAÇÃO DA MARCHA

Os animais atravessaram uma passarela iluminada com piso de vidro para a coleta dos dados. No entanto, com a progressão da EAE, alguns animais não conseguiram atravessar a passarela em alguns dos pontos do experimento. Portanto, o número de animais analisados em cada momento é descrito na **Tabela 1**. Os valores e gráficos comparativos entre os grupos estão organizados na **Figura 8**. Tanto a comparação entre *max contact* e de *max intensity* dos membros torácicos entre os grupos não apresentaram diferença estatística, porém, as mesmas avaliações dos membros pélvicos, que são os mais afetados ao longo do curso da EAE, apresentaram valores maiores no grupo de camundongos controle, e após avaliação estatística, houve diferença entre os grupos observados. A comparação entre o espaçamento entre membros (BOS) não apresentou diferença estatística entre os grupos avaliados.

Tabela 1. Tabela representando a quantidade absoluta e em porcentagem dos animais avaliados no CatWalk XT[®] em cada momento experimental.

DPI	EAE	EAE+cAT-MS
Basal	6 (100%)	6 (100%)
8	6 (100%)	6 (100%)
9	6 (100%)	6 (100%)
10	6 (100%)	6 (100%)
11	6 (100%)	6 (100%)
12	6 (100%)	6 (100%)
13	6 (100%)	6 (100%)
14	3 (50%)	6 (100%)
15	6 (100%)	6 (100%)
16	4 (67%)	6 (100%)
17	6 (100%)	6 (100%)
18	6 (100%)	4 (67%)
19	6 (100%)	6 (100%)
20	6 (100%)	3 (50%)
21	6 (100%)	3 (50%)
22	6 (100%)	4 (67%)
23	6 (100%)	3 (50%)
24	6 (100%)	3 (50%)
25	6 (100%)	6 (100%)
26	6 (100%)	6 (100%)
27	6 (100%)	6 (100%)
28	6 (100%)	6 (100%)
29	6 (100%)	6 (100%)

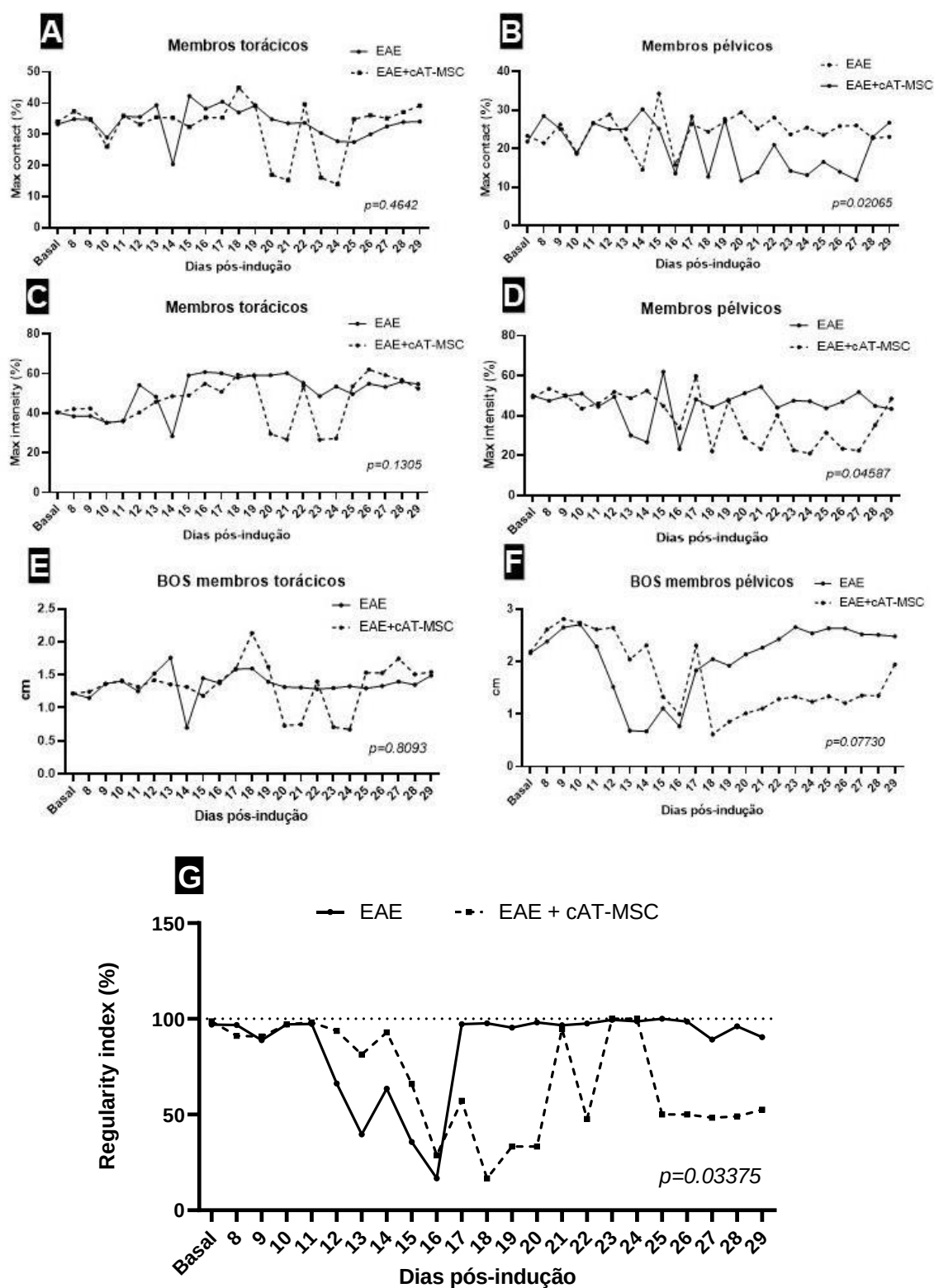


Figura 8. Valores analisados pelo CatWalk XT agrupados separadamente em membros torácicos e pélvicos para os parâmetros *max contact*, *max intensity* e *base of support* (BOS), enquanto que *step sequence regularity index* foi calculada a partir da análise entre os quatro

membros. **A, C e E:** A comparação entre *max contact* (%), *max intensity* (%) e *base of support* (cm) de membros torácicos dos grupos não apresentou diferença estatística, e é possível observar um aumento destes parâmetros conforme a doença atinge seu pico máximo de escore clínico. **B, D e F:** A comparação entre *max contact* (%) e *max intensity* (%) de membros pélvicos dos grupos diferiu estatisticamente, com o grupo EAE apresentando uma média maior ao longo do curso da doença, porém a comparação entre o valor de *base of support* (cm) não apresentou diferença entre os grupos. **G:** A comparação *regularity index* (%) apresentou diferença entre os grupos, com o grupo EAE apresentando valores superiores.

6.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA DA MEDULA ESPINHAL

A **Figura 9** mostra as imagens capturadas pelo microscópio de fluorescência dos três marcadores utilizados: GFAP, Iba1 e Sinaptofisina. A população e reatividade astrocitária e microglial dos grupos EAE e EAE+cAT- MSC apresentaram diferença estatística e um aumento considerável em relação ao grupo sem doença (controle), porém os valores de densidade integrada de pixels não variaram estatisticamente entre o Grupo EAE e EAE+cAT-MSC. A avaliação da cobertura sináptica do motoneurônio pelo marcador anti- Sinaptofisina demonstrou diferença estatística apenas entre o grupo controle e EAE, indicando redução das sinapses dos motoneurônios em camundongos com EAE não tratados, enquanto que os que receberam cAT-MSCs não diferiram do grupo controle e apresentaram diferença quando comparados ao grupo EAE, com uma cobertura sináptica mais próxima do normal.

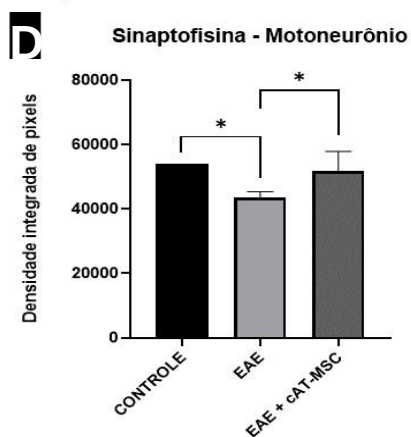
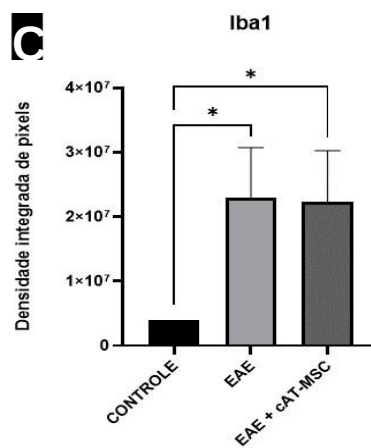
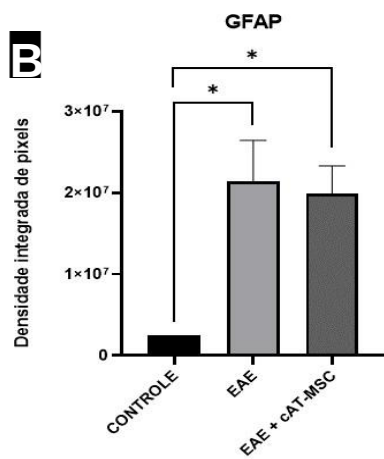
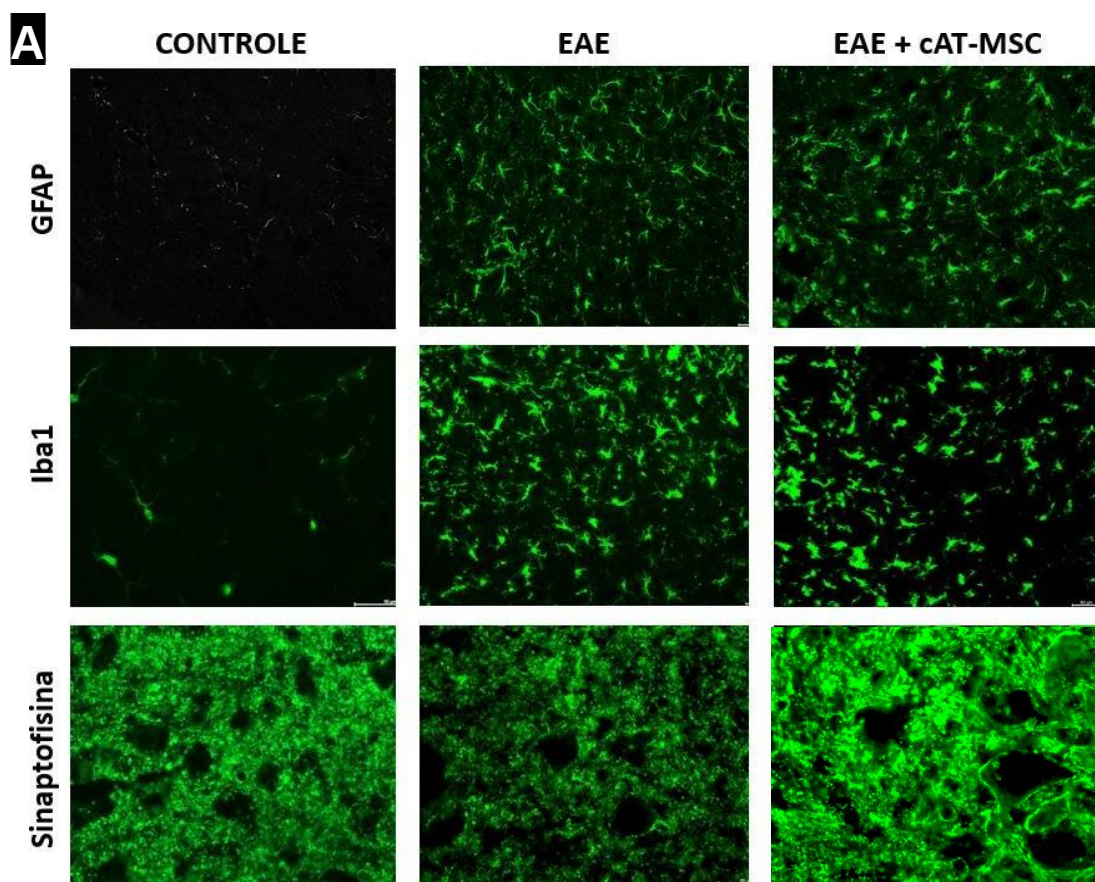


Figura 9. Reatividade glial e cobertura sináptica no corno ventral da intumescência lombar comparativa entre camundongos controle, EAE e EAE+cAT-MSC. **A:** Imagens representativas da imunofluorescência com os marcadores identificados GFAP, Iba1 e Sinaptofisina. **B:** Gráfico comparativo da quantificação da IDP de astrócitos marcados com anti-GFAP, em que se nota diferença estatística entre os grupos com EAE e controle, porém não houve diferença entre os grupos EAE e EAE+cAT-MSC. **C:** Gráfico comparativo da quantificação da IDP da população microglial marcada com anti-Iba1, em que só houve diferença estatística entre os grupos com EAE e o controle. **D:** Gráfico comparativo da quantificação da IDP da cobertura sináptica dos motoneurônios marcados com anti-Sinaptofisina. O grupo EAE+cAT-MSC não diferiu do grupo controle, porém apresentou diferença estatística entre o grupo EAE, enquanto que o grupo EAE apresentou diferença quando comparado ao grupo controle, com uma cobertura sináptica estatisticamente menor. $*p \leq 0,05$.

7. DISCUSSÃO

O modelo EAE, a EM em humanos e as MUOs em cães estão inter-relacionadas como condições que envolvem o SNC e compartilham características inflamatórias e autoimunes. Usar a EAE como modelo permite explorar os mecanismos imunopatológicos subjacentes às MUOs e avaliar potenciais terapias imunomoduladoras e neuroprotetoras, como o uso de MSCs. As MUOs apresentam prognóstico reservado e temos poucas opções terapêuticas eficazes disponíveis atualmente, criando uma demanda para pesquisa com potenciais métodos terapêuticos com modelos experimentais que mimetizam um ambiente neuroinflamatório.

No presente estudo, utilizando-se das metodologias descritas, as cAT- MSCs utilizadas apresentaram ótima viabilidade e características de proliferação e morfológicas satisfatórias. O tratamento com cAT-MSCs no sétimo dia pós- indução foi possível observar retardo no início dos sinais

clínicos no grupo EAE+cAT-MSc, porém não demonstrou diferença na evolução clínica quando comparado ao grupo EAE. O tratamento no dia pós-indução 7 (DPI 7) é considerado profilático, pois nenhum camundongo deve apresentar sinais clínicos nessa etapa da indução (CONSTANTINESCU et al, 2011; RANGACHARI & KUCHROO, 2013). O tratamento

As variações de peso não apresentaram diferença estatística entre os grupos, porém, pode-se observar uma atenuação na perda de peso nos dias de início da doença, com menor perda no grupo EAE+cAT-MSc, sugerindo que a terapia celular pode auxiliar de maneira preventiva na perda de peso no início da EAE. Os linfócitos T CD4⁺ são ativados por antígenos da mielina (MOG) apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas (GLENN, 2014). Estes linfócitos T se diferenciam em subpopulações específicas, incluindo linfócitos Th1 e Th17, que desempenham papéis importantes na patogênese da doença. As MSCs têm a capacidade de modular a resposta imunológica, promovendo um ambiente anti-inflamatório, além de inibir a ativação de linfócitos T e a produção de citocinas pró- inflamatórias, como IL-17 e IFN- γ , que desempenham um papel crucial na patogênese do EAE (STROMNES & GOVERMAN, 2004). O HGF produzido pelas MSCs foi demonstrado modulando funções de recuperação motora em um modelo de EAE (BAI et al, 2012).

A falta de atenuação clínica da EAE no grupo EAE+cAT-MSCs pode ter sido influenciada por diversos fatores, entre eles a dose de células utilizadas e o fato de ter sido uma única aplicação, a sobrevivência das MSCs após a administração, que pode variar dependendo da via de administração, o tipo de células utilizadas (autólogas, alogênicas e xenogênicas), as condições do ambiente do hospedeiro e a resposta imunológica (BAI et al, 2012). Outro fator pra se levar em consideração, seria a capacidade das cAT-MSCs em modular o ambiente inflamatório agudo, mas talvez não o suficiente para reverter o processo de hiperssensibilidade tardia e autoimunidade características do modelo, sendo observado posteriormente o desenvolvimento da doença de maneira semelhante ao grupo controle (BAI et al, 2012, GLENN, 2014).

As análises *max contact* e *max intensity* realizadas pelo CatWalk XT são calculadas da superfície da pata em contato com o vidro e a intensidade da pisada, respectivamente, e ambas são relacionadas com a duração destes eventos, resultando em um valor percentual (BERNARDES & OLIVEIRA, 2017; GARRICK et al, 2021). Valores aumentados destas duas análises podem representar paresia e déficits neurológicos, em que o animal mantém as patas na superfície com área, intensidade e por tempo aumentados (GARRICK et al, 2021). Não houve diferença entre os grupos quando apenas os membros torácicos foram avaliados, provavelmente devido à progressão da EAE nesse experimento não ter alcançado escores clínicos muito altos, que correspondem a alterações motoras graves dos membros torácicos (STROMNES & GOVERMAN, 2004; GARRICK et al, 2021). Quando comparados os membros pélvicos, que são os principais afetados devido a neuroinflamação na intumescência lombar, o Grupo EAE apresentou resultados estatisticamente superiores, indicando níveis de paresia maiores e mais duradouros ao longo da evolução da doença.

O BOS foi calculado em relação à distância entre membros, representado em centímetros (cm). Os membros torácicos e pélvicos foram comparados entre os grupos, e não apresentaram diferença estatística, todavia, na análise do gráfico se nota uma persistência de membros pélvicos mais afastados no grupo EAE, correlacionando-se com os dados de marcha encontrados nas análises previamente realizadas, sugerindo uma paresia em membros pélvicos mais duradoura quando comparados ao grupo EAE + cAT-MSc.

Outra análise envolvendo a marcha foi o *step sequence regularity index*, que avalia a coordenação de membros e o padrão de marcha em valores percentuais, entre 0 (sem padrão) e 100% (coordenado) (GARRICK et al, 2021). O grupo EAE + cAT-MSc apresentou resultados menores com relação ao grupo EAE, porém o valor amostral em vários pontos ao longo do experimento foi menor para o grupo EAE+cAT-MSc, devido a incapacidade de alguns camundongos em atravessar a plataforma nos respectivos dias. Esse valor está mais relacionado à função proprioceptiva, e se observa grave

ataxia em membros pélvicos durante a evolução da EAE, principalmente em escores clínicos acima de 2 (GARRICK et al, 2021).

A avaliação da população astrocitária foi realizada com o marcador anti- GFAP, e mostrou aumento considerável no corno ventral da medula espinhal nos grupos EAE e EAE+cAT-MSc quando relacionados ao controle. O grupo EAE- cAT-MSc também apresentou resultados maiores que o grupo controle, indicando astrogliose mais intensa. Os astrócitos são células gliais encontradas no SNC e desempenham várias funções essenciais para o seu funcionamento, além de modularem a inflamação, influenciar a integridade da barreira hematoencefálica, interagir com células imunes, participar da resposta de reparo tecidual e contribuir para a neuroinflamação crônica (FRIESE et al, 2014). Uma astrogliose quando analisada de maneira exclusiva pode estar igualmente relacionada com lesão ou reparação tecidual do SNC (FRIESE et al, 2014). As micróglias podem ser interpretadas de maneira similar no contexto da inflamação, podendo exercer o papel lesivo ou reparador (LI & ZHANG, 2016). Analisando a marcação com anti-Iba1, houve diferença estatística apenas entre os grupos experimentais e controle, sugerindo uma diferença funcional e não quantitativa da população microglial entre os grupos (LI & ZHANG, 2016). Estes argumentos podem ser reforçados quando se leva em consideração a análise da cobertura sináptica pelo marcador anti-Sinaptofisina, em que o grupo EAE-cAT- MSc diferiu do grupo EAE, mas não do controle, indicando uma preservação e neuroproteção da arquitetura sináptica dos motoneurônios.

Quando comparamos os dados adquiridos no experimento de maneira simultânea, podemos sugerir que embora a população glial do Grupo EAE+cAT- MSc se mantenha semelhante ao Grupo EAE, sua função pode diferir nos animais tratados com cAT-MSc na mesma janela terapêutica. A EAE no modelo murino C57BL/6J apresenta uma evolução crônica-progressiva, em que após o início dos sinais, um pico de piora clínica ocorre em 4-5 dias, e logo em seguida há uma atenuação dos sinais clínicos até um valor estável (STROMNES & GOVERNOR, 2004). Todos os animais do presente experimento foram eutanasiados no mesmo dia (DPI 30), porém, a

doença se iniciou primeiro no grupo EAE, e consequentemente, apresentaram uma média de escore clínico menor que do grupo EAE-cAT-MSc, que ainda estava no processo de regressão até a fase clínica mais estável do modelo, podendo ter influenciado os resultados das imunofluorescências.

A duração de células xenogênicas no modelo de EAE murina não é bem estabelecida, e apenas um transplante (dose única) durante o experimento de 30 dias pode não representar precisamente todo o potencial imunomodulador e neuroprotetor das cAT-MSCs. Portanto novos ensaios pré-clínicos com diferentes posologias de tratamento e ampliação dos parâmetros analisados, como diferentes áreas de SNC, análises funcionais motoras e sensitivas, avaliações das subpopulações de linfócitos T (CD4/CD8, Th1/Th2, Treg), expressão genica e proteica de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos, devem ser realizados para se obter mais dados sobre os efeitos terapêuticos das MSCs neste modelo experimental, proporcionando-nos maior conhecimento translacional sobre as doenças semelhantes de ocorrência natural, como a EM nos humanos e a MUO nos cães.

Uma abordagem terapêutica diferente, como por exemplo, tratamento no mesmo dia da indução da EAE, poderia apresentar resultados mais positivos, devido à ação das cAT-MSCs logo no início da sensibilização, podendo ter a supressão dos linfócitos como um potencial atenuador dos sinais clínicos e menor gliose na avaliação por imunofluorescência.

Contudo, a partir dos resultados obtidos neste estudo e na literatura, podemos afirmar que a terapia celular com MSCs representa uma alternativa promissora no tratamento e controle da EAE, EM e da MUO (ZEIRA et al, 2015; GRAMLICH et al, 2020; ISLAM et al, 2023), assim como em outras doenças neuroimunes (LEONE et al, 2023), abrindo caminho para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos, especialmente em cães acometidos por MUO.

8. CONCLUSÕES

O tratamento com cAT-MSCs, em dose única, em camundongos com EAE no sétimo dia pós-indução retarda o início da doença clínica e apresenta efeitos neuroprotetores, principalmente relacionados à manutenção da cobertura sináptica dos motoneurônios, e atenua as alterações de marcha em membros pélvicos ao longo do curso da doença.

9. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, P. et al. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Self-Reactive T Cell Responses and Dendritic Cell Function. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1–15, 2017.

ATOUI, R.; CHIU, R. C. J. Concise Review: Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Cellular Transplantation: Update, Controversies, and Unknowns. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 1, n. 3, p. 200–205, mar. 2012.

BAI, L. et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 862–870, 1 jun. 2012.

BAI, L. et al. Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Induce Th2- Polarized Immune Response and Promote Endogenous Repair in Animal Models of Multiple Sclerosis. **Glia**, v. 57, n. 11, p. 1192–1203, 15 ago. 2009.

BARBONI, B. et al. Placental Stem Cells from Domestic Animals. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 93–116, jan. 2018.

BERNARDES, D.; OLIVEIRA, A. L. R. Comprehensive catwalk gait analysis in a chronic model of multiple sclerosis subjected to treadmill exercise training. **BMC Neurology**, v. 17, 22 ago. 2017.

BIGAZZI, P. E. Animal models of multiple sclerosis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1, p. 3, out. 1995.

BROWN, C. et al. Neural stem cells derived from primitive mesenchymal stem cells reversed disease symptoms and promoted neurogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, 9 set. 2021.

CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. **Comparative Medicine**, 1 jun. 2013.

CLARK, K. C. et al. Canine and Equine Mesenchymal Stem Cells Grown in Serum Free Media Have Altered Immunophenotype. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 12, n. 2, p. 245–256, 5 dez. 2015.

CLARK, K. et al. Placental Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Myelin Regeneration in an Animal Model of Multiple Sclerosis. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1497, 23 nov. 2019.

COATES, J. R.; JEFFERY, N. D. Perspectives on Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 44, n. 6, p. 1157–1185, nov. 2014.

COHEN, J. A. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 333, n. 1-2, p. 43–49, 15 out. 2013.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, out. 2011.

CORREALE, J.; MARRODAN, M.; YSRRAELIT, M. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 14, 20 fev. 2019.

CREE, B. A. C. et al. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. **Annals of Neurology**, v. 80, n. 4, p. 499–510, 1 out. 2016.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1400–1415, maio 2011.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the Devil Is in the Details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136–153, 4 maio 2016.

DOMBROWSKI, Y. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 674–680, 1 maio 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

GERDONI, E. et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 3, p. 219–227, 1 mar. 2007.

FISHER-SHOVAL, Y. et al. Transplantation of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in the EAE Mouse Model of MS. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 48, n. 1, p. 176–184, 26 maio 2012.

FREITAS, G. et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Culture, Characterization and Differentiation. **BIO- PROTOCOL**, v. 10, n. 4, 2020.

FRIESE, M. A.; SCHATTLING, B.; FUGGER, L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 4, p. 225–238, 18 mar. 2014.

GARRICK, J. M. et al. Evaluating Gait and Locomotion in Rodents with the CatWalk. **Current protocols**, v. 1, n. 8, 1 ago. 2021.

GLENN, J. D. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 526, 2014.

GRAMLICH, O. W. et al. Systemic Mesenchymal Stem Cell Treatment Mitigates Structural and Functional Retinal Ganglion Cell Degeneration in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. **Translational Vision Science & Technology**, v. 9, n. 8, p. 16, 10 jul. 2020.

GREER, K. A. et al. Necrotizing meningoencephalitis of Pug Dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, abr. 2010.

HOFFMAN, A. M.; DOW, S. W. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. **STEM CELLS**, v. 34, n. 7, p. 1709–1729, 3 maio 2016.

HU, J.-C. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. **World**

Journal of Stem Cells, v. 14, n. 5, p. 318–329, 26 maio 2022.

ISLAM, M. A. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 19, p. 6311, 1 jan. 2023.

JACKSON, J. E. et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells: Preclinical Safety Evaluation for Fetal Myelomeningocele Repair. **Journal of Surgical Research**, v. 267, p. 660–668, nov. 2021.

JACOBS, S. A. et al. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 32–39, jan. 2013.

JEFFERY, N. D. et al. The Association of Specific Constituents of the Fecal Microbiota with Immune-Mediated Brain Disease in Dogs. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170589, 26 jan. 2017.

JEFFERY, N.; GRANGER, N. New insights into the treatment of meningoencephalomyelitis of unknown origin since 2009: A review of 671 cases. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 15 mar. 2023.

KANEKO, J. J.; CORNELIUS, C. E. **Clinical biochemistry of domestic animals. / Volume II**. New York: Academic Press, 1971.

KASSIS, I. et al. Mesenchymal stem cells (MSC) derived from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors. **Immunology Letters**, v. 154, n. 1, p. 70–76, 1 jul. 2013.

KESHTKAR, S.; AZARPIRA, N.; GHAHREMANI, M. H. Mesenchymal stem cell- derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, 9 mar. 2018.

KISIEL, A. H. et al. Isolation, characterization, and *in vitro* proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305– 1317, ago. 2012.

KOL, A. et al. Th17 Pathway As a Target for Multipotent Stromal Cell Therapy in Dogs: Implications for Translational Research. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148568–e0148568, 12 fev. 2016.

KUMAR, P. et al. Neuroprotective effect of placenta-derived mesenchymal

stromal cells: role of exosomes. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 5, p. 5836–5849, 12 fev. 2019.

LANKFORD, L. Early gestation chorionic villi-derived stromal cells for fetal tissue engineering. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 1, p. 195, 2015.

LANKFORD, L. et al. Manufacture and preparation of human placenta-derived mesenchymal stromal cells for local tissue delivery. **Cytotherapy** v. 19, n. 6, p. 680–688, 1 jun. 2017.

LEONE, M. et al. Phase I clinical trial of intracerebroventricular transplantation of allogeneic neural stem cells in people with progressive multiple sclerosis. **Cell Stem Cell**, 1 nov. 2023.

LI, T.; ZHANG, S. Microgliosis in the Injured Brain. **The Neuroscientist**, v. 22, n. 2, p. 165–170, 11 fev. 2015.

LIECHTY, K. W. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1282–1286, nov. 2000.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 1, p. 29–40, 4 jan. 2010.

LONG, C. et al. Isolation and characterization of canine placenta-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of neurological disorders in dogs. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 82–92, 17 jul. 2017.

LOWRIE, M.; SMITH, P. M.; GAROSI, L. Meningoencephalitis of unknown origin: investigation of prognostic factors and outcome using a standard treatment protocol. **Veterinary Record**, v. 172, n. 20, p. 527–527, 5 mar. 2013.

MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochemistry International**, jun. 2011.

MARTINO, G. et al. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 5, p. 247–255, 1 maio 2010.

MELIEF, S. M. et al. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 2, n. 6, p. 455–463,

21 maio 2013.

MUNOZ, J. R. et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 18171–18176, 13 dez. 2005.

NEMI CHAND JAIN. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia, Pa: Lea And Febiger, 1993.

NOE, D. et al. Effects of Canine and Murine Mesenchymal Stromal Cell Transplantation on Peripheral Nerve Regeneration. **International journal of stem cells**, v. 10, n. 1, p. 83–92, 30 maio 2017.

PARR, A. M.; TATOR, C. H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, n. 7, p. 609–619, 2 jul. 2007.

PAUL, G.; ANISIMOV, S. V. The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2246–2256, dez. 2013.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 351–362, ago. 2011.

RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Extracellular Vesicles of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Properties Discovered with Extraordinary Success. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 667, 10 jun. 2021.

RANGACHARI, M.; KUCHROO, V. K. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. **Journal of Autoimmunity**, v. 45, p. 31–39, set. 2013.

RAVANIDIS, S. et al. Neuroinflammatory signals enhance the immunomodulatory and neuroprotective properties of multipotent adult progenitor cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, 16 set. 2015.

REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 100, n. 2, p. 297–379, abr. 1954.

SANTOS, S. et al. Oligodendrocyte precursor cell-derived exosomes combined with cell therapy promote clinical recovery by immunomodulation and gliosis attenuation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 18, 23 jul. 2024.

SCREVEN, R. et al. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 161, n. 1-2, p. 21–31, 1 set. 2014.

SILVA, G. A. A. et al. Impact of pregabalin treatment on synaptic plasticity and glial reactivity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 6, p. 925–935, 2 set. 2014.

SMITH, P. M. et al. Comparison of Two Regimens for the Treatment of Meningoencephalomyelitis of Unknown Etiology. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 3, p. 520–526, maio 2009.

SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327–1333, 1 fev. 2008.

SPAGGIARI, G. M. et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6576–6583, 25 jun. 2009.

STROMNES, I. M.; GOVERMAN, J. M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1810–1819, nov. 2006.

THOMÉ, R. et al. Dendritic cells treated with chloroquine modulate experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology & Cell Biology**, v. 92, n. 2, p. 124–132, 12 nov. 2013.

THOMÉ, R. et al. Artesunate Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Leukocyte Migration to the Central Nervous System. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, n. 8, p. 707–714, 11 maio 2016.

VIDAL, M. A. et al. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. v. 36, n. 7, p. 613–622, 1 out. 2007.

VIDANE AS et al. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **DOAJ (DOAJ:**

Directory of Open Access Journals), 1 ago. 2014.

WANG, A. et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 4, n. 6, p. 659–669, 24 abr. 2015.

YU, B.; ZHANG, X.; LI, X. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4142–4157, 7 mar. 2014.

ZAPPIA, E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1755–1761, 1 set. 2005.

ZEIRA, O. et al. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, 29 set. 2015.

ZHANG, J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 1, p. 16–26, set. 2005.

ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, abr. 2001.

10. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Stem Cell Research & Therapy*

Therapeutic Potential of Multipotent Canine Mesenchymal Stromal Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

ABSTRACT

Background: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a preclinical model for studying and testing therapies for neuroinflammatory diseases, reflecting conditions such as multiple sclerosis in humans and unknown origin meningoencephalomyelitis in dogs. Both MS and MUO are autoimmune conditions that affect the central nervous system, leading to neuroinflammation, demyelination, and neurodegeneration. Treatment typically involves immunomodulators and immunosuppressants to reduce symptoms. Mesenchymal stem cells have increasingly attracted attention in neuroimmune disease research due to their immunomodulatory and regenerative properties. This study aimed to evaluate the therapeutic efficacy of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem-cells (cAT-MSCs) in the EAE model in mice.

Methods: Mice were divided into control (n=2), EAE (n=6), and EAE+cAT-MSC (n=6) groups. On day 7 post-induction (DPI 7), the EAE+cAT-MSCs group was treated with a single intravenous dose of 3×10^5 cAT-MSCs. Daily analyses included weight, clinical score, gait assessment, and spinal cord immunofluorescence with markers GFAP, Iba1, and Synaptophysin.

Results: The EAE+cAT-MSCs group showed delayed onset of clinical signs, less variation in gait analysis of the pelvic limbs, and greater synaptic coverage compared to the EAE group ($P < 0.05$). No differences were found in weight variation, glial population, or gait analysis of the thoracic limbs between the EAE and EAE+cAT-MSCs groups.

Conclusions: Our results demonstrate that therapy with cAT-MSCs on DPI 7 delays the onset of clinical disease and provides neuroprotective effects, primarily related to the maintenance of synaptic coverage of motor neurons.

Keywords: Cell therapy; immunology; meningoencephalomyelitis of unknown origin

BACKGROUND

Inflammatory lesions of the central nervous system (CNS) are particularly debilitating, affecting both humans and domestic animals [1]. Among the most common neuroimmune diseases in these species are multiple sclerosis (MS) in humans and meningoencephalomyelitis of unknown origin (MUO) in dogs [1,2]. As an animal model for MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) has contributed to understanding the pathophysiology of neuroimmune diseases, particularly in the context of translational medicine for the development of new drugs [3].

Due to the limited regenerative capacity of the CNS, the therapeutic potential of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) has been studied in various neurological conditions, including chronic degenerative and inflammatory diseases, as well as acute neuronal damage [4,5]. Although there are still gaps in understanding the mechanisms of action of MSCs, it is known that MSC therapy can play a crucial role in controlling neuroimmune diseases due to their trophic activities and ability to stimulate angiogenesis, reduce inflammation, recruit resident progenitor cells, and minimize fibrosis. This could help regenerate or support the survival of existing, partially damaged cells [4,6]. These cells exhibit significant capacities for cell differentiation, regeneration, immunomodulation, and neuroprotection [4,5]. In addition to their direct role, the secretion of bioactive substances and factors by MSCs, such as extracellular vesicles (EVs), including exosomes, is of great therapeutic importance [7,8]

Various neurological disorders in humans have drawn attention to the use of cellular therapy, leading to numerous studies in animal and preclinical models (including rats, mice, rabbits, dogs, and humans). These studies have shown beneficial effects for conditions such as Parkinson's disease, strokes, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, MS, and spinal cord injuries [4,7,9].

METHODS

Animal study

Fourteen pathogen-free female C57BL/6J mice (chronic-progressive EAE models), 9 weeks old, were used in the study. They were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research in Laboratory Animal Science

(CEMIB) at the University of Campinas (UNICAMP). The mice were housed in cages (three per cage, marked with tail identifiers) with food and water ad libitum, under controlled light cycles (12h/12h light/dark), at a temperature of 21°C and relative humidity of 50%, in the animal facility of the Nerve Regeneration Laboratory (LRN/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil).

The animals were divided into three groups: Control, EAE, and EAE+cAT-MSC. The disease was induced only in the EAE and EAE+cAT-MSC groups. The disease was actively induced in the mice following a previously described protocol [3,10]. Mice were immunized subcutaneously on both flanks with 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Genscript, Piscataway Township, New Jersey, USA) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). To enhance disease progression, 200 ng of pertussis toxin (Ptx; Sigma, St. Louis, Missouri, USA) was administered intraperitoneally at 0 and 48 hours post-immunization [3,10].

On the seventh day post-induction (DPI 7), the EAE group was treated intravenously (via tail vein) with 100 µL of PBS, while the EAE+cAT-MSC group received 3×10^5 cAT-MSCs. Starting from DPI 8, these groups underwent gait analysis using the CatWalk XT system until DPI 29. The mice were euthanized the following day (DPI 30), and their spinal cords were collected for immunofluorescence analysis. The spinal cords of the control group were also used for comparative immunofluorescence analysis with the other groups.

The mice were weighed and examined daily to identify clinical neurological signs of the disease. The signs were graded according to Stromnes & Goverman [3] using the following scale: Grade 0.5: Flaccidity of the tail tip; Grade 1: Flaccidity of the tail; Grade 2: Difficulty in gait and paresis of the hind limbs; Grade 2.5: Monoplegia of one hind limb; Grade 3: Paraplegia; Grade 3.5: Paraplegia and paresis of the forelimbs; Grade 4: Tetraplegia; Grade 5: Moribund/Death.

cAT-MSCs preparation

Pre-isolated and characterized cells from the Stem Cell Bank of the Translational Nucleus of Regenerative Medicine (NUTRAMERE) at FMVZ/UNESP - Botucatu, at passage P4, were selected. The cAT-MSCs were thawed, placed in T75 flasks, and expanded for five days prior to application in the experimental model, in an incubator at 37°C in a humid atmosphere with 95% air and 5% CO₂. The culture medium used consisted of 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

(Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), 10% fetal bovine serum (FBS), and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), and was changed after the first 48 hours. The cells were trypsinized (0.25% trypsin, Invitrogen, São Paulo, Brazil) when they reached 80-90% confluence, then counted using a Neubauer chamber and resuspended in sterile PBS for intravenous application in the experimental model. Cell viability was assessed after five days of culture (the same expansion period) on coverslips in 12-well plates, using the LIVE/DEAD® Cell Viability Assay (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA), and quantified with ImageJ software (version 1.54i, National Institutes of Health, USA).

EAE mice treatment

Cell transplantation or PBS application was performed on DPI 7, before the onset of clinical signs, via intravenous injection in the mice with EAE. Following preparation and antisepsis of the tail region, 3×10^5 cAT-MSCs resuspended in 100 μ L of PBS and 100 μ L of pure PBS were slowly injected intravenously into the EAE+cAT-MSC and EAE groups, respectively. The tail vein injections were carried out using 1 mL syringes connected to a standard hypodermic needle system [10].

Gait analysis

Three parameters were evaluated separately and then grouped between forelimbs and hindlimbs: max contact (%), max intensity (%), and base of support (BOS) (cm). Additionally, the step sequence regularity index (%) was calculated based on the movements of all four limbs. Data from the animals were obtained using the CatWalk XT® system (Noldus Inc., Netherlands), and classification was performed with the help of the CT System software version XT 10.6 (Noldus Inc., Netherlands) from a baseline point (before induction) and daily from the day after the injections until DPI 29. Three runs per animal were recorded daily.

The CatWalk XT® system is an automated and computerized gait analysis platform frequently used in preclinical studies to evaluate locomotion in animals such as rats and mice. It consists of a transparent and illuminated walkway where animals walk freely while being recorded by a high-speed camera positioned below the walkway [11]. During movement, the animals' footprints are captured by the camera, with the aid of infrared light to enhance the visibility of the footprints [11]. The CatWalk XT® software is then used to analyze the collected

data, allowing for the quantification of various gait parameters such as footprint duration and intensity, stride length and width, and paw contact with the surface, among others [11]. This analysis is automated, reducing the need for manual intervention and increasing the accuracy and efficiency of the assessment [11]. The CatWalk XT® is applied to study neurological disorders, spinal cord injuries, muscle diseases, drug effects, and rehabilitation therapies, among other applications [11].

Tissue processing

On DPI 30, all animals were anesthetized with a mixture of xylazine (Anasedan, Ceva, Paulínia, Brazil) and ketamine (Dopalen, Ceva, Paulínia, Brazil) at doses of 80 mg/kg and 400 mg/kg, respectively, and underwent thoracotomy followed by transcardiac perfusion with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.38), followed by 4% paraformaldehyde solution. To investigate the effectiveness of cAT-MSCs in the murine EAE model, the lumbar intumescence (L4-L6 segments) was selected due to the progression of spinal cord lesions associated with the model, and tissue processing was carried out as previously described [12]. After euthanasia and dissection of the spinal regions of interest, they were prepared for freezing with a 30% sucrose solution, subsequently embedded in cryopreservation medium (Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura, Japan), and frozen in liquid n-hexane at temperatures ranging from -30 to -40°C for 5 minutes. The tissue samples were stored at -20°C until cryostat sectioning. Sections of 12 µm were cut using a cryostat (Leica CM1860, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and mounted on pre-gelatinized microscope slides with a solution of purified gelatin and chromium and potassium sulfate dodecahydrate. Four sections were placed on each gelatinized slide. The slides were kept at -20°C until used for immunofluorescence protocols [12].

Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol and quantification were performed as previously described [12]. Slides were acclimated to room temperature for 15 minutes and then washed in phosphate buffer (PB) (3 times for 5 minutes each). After incubation for 45 minutes with a blocking solution containing 3% Bovine Serum Albumin (BSA), the slides were incubated overnight at 4°C with a solution containing 1% BSA, 0.2% Triton, and the diluted primary antibody. Anti-Iba1

(ionized calcium-binding adaptor molecule 1; Rabbit, Wako, 1:750) was used to assess microglial reaction and infiltration of monocyte-derived macrophages in the spinal cord microenvironment. Anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein; Rabbit, Abcam AB7260, 1:1000) was used to assess astrocyte reaction, and anti-synaptophysin (Rabbit, Novusbio, 1:1,000) was used to assess synaptic coverage. The slides were then washed with PB and incubated for 45 minutes with the fluorescent secondary antibody (Alexa Fluor® 488, Goat anti-rabbit IgG, Abcam, ab150077, 1:500). The slides were washed again with PB, mounted with a mixture of 1:3 glycerol and PB, and stored at -20°C for later reading. Immunostained slides were observed using a Leica DM 5500B fluorescence microscope equipped with a Leica DFC 345FX camera. For quantification purposes, the best spinal cord sections on each slide were selected, and images of the left and right ventral regions, where somatic motoneurons are located in lamina IX, according to Rexed [13], were captured. The regions were captured using a 20X objective for sections stained with anti-Iba1 and anti-GFAP, and a 40X objective for sections stained with anti-synaptophysin. For quantification, integrated density of pixels (IDP) was measured using ImageJ software (version 1.54i, National Institutes of Health, USA). For Iba1 and GFAP, measurements were made on all images, while for synaptophysin, measurements were restricted to eight equidistant points of two neurons per image (24-pixel circles). The mean IDP was calculated for each animal, and the mean ratios for each group $\pm$ standard error were then established [12].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® 8.0.1 software, and the data were presented as mean $\pm$ standard error of the mean. Daily weight, clinical score, and CatWalk XT gait parameters among the groups were subjected to Two-way ANOVA. The integrated density pixel (IDP) values for the Control, EAE, and EAE+cAT-MSC groups were analyzed using One-Way ANOVA, with multiple comparisons corrected by the Two-Stage Step-up procedure of Benjamini, Krieger, and Yekutieli. In all cases, differences between groups were considered significant when p-values were less than 0.05.

RESULTS

cAT-MSCs Viability

The cAT-MSCs exhibited fibroblast-like morphology, adherence to plastic, and proliferation, reaching 80-90% confluence within 5 days of culture (Figure 1). After performing the LIVE/DEAD® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) assay with the cAT-MSCs and subsequent analysis using ImageJ software, the average cellular viability was found to be 97% (Figure 2).



Fig. 1 Microscopic appearance of cAT-MSCs after 5 days of culture. (Magnification 50x).

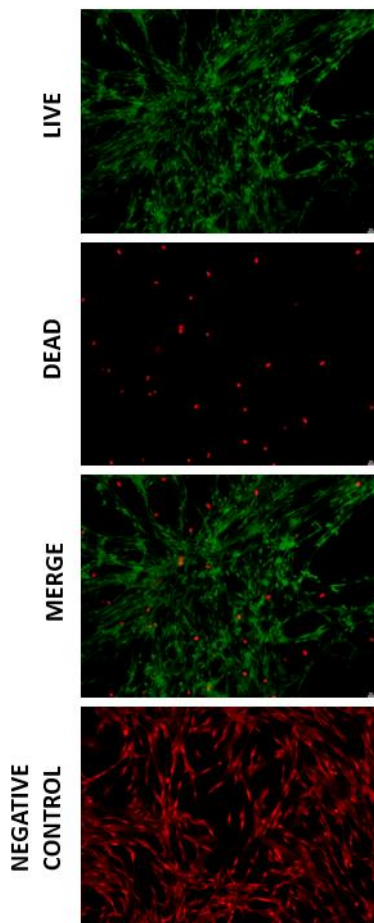
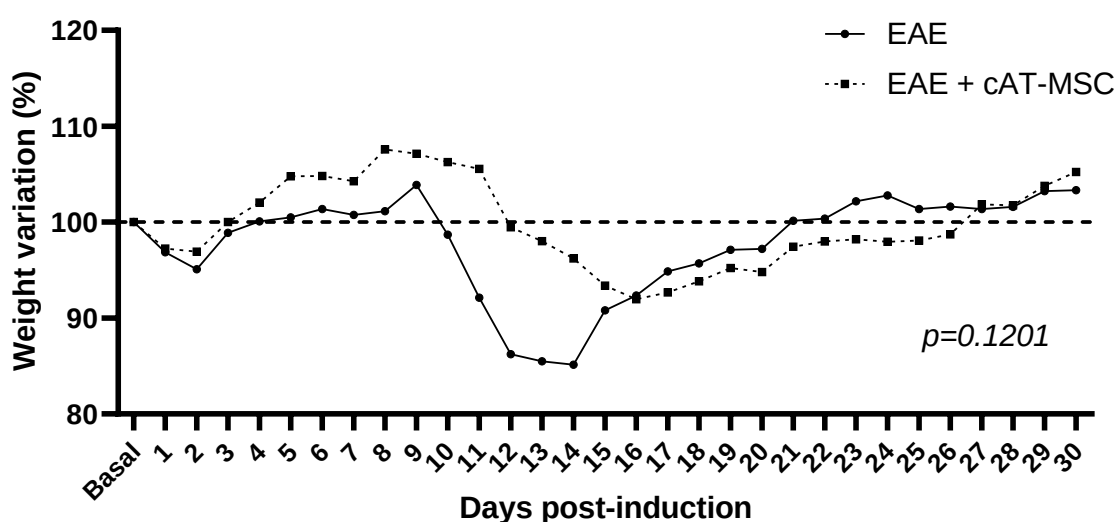


Fig. 2 Evaluation of cell viability with the LIVE/DEAD® assay (Magnification 40x).

Daily weight variation

Figure 3 shows the daily variation of the groups relative to the baseline weight value. Although the Control Group appears to experience a more drastic variation throughout the progression of the disease, especially during the peak of EAE (4-



5 days after the onset of the first signs), no statistical differences between the groups were observed. A significant reduction in the weights of both groups coincides with the clinical worsening and progression of EAE, followed by a gradual recovery over the course of the experiment.

Fig. 3 Representation of average weight variation relative to baseline throughout the progression of EAE. No statistical difference between the group means was observed.

Daily clinical score

Daily values of EAE clinical progression are shown in figure 4. A delay in the onset of clinical signs was observed in the group treated with cAT-MSCs; however, both groups reached similar EAE scores, and no statistical difference was found between the average clinical scores of the groups. The average time to onset of signs in each group was also assessed, with the EAE+cAT-MSC group showing a later onset compared to the control group (A, in figure 4).

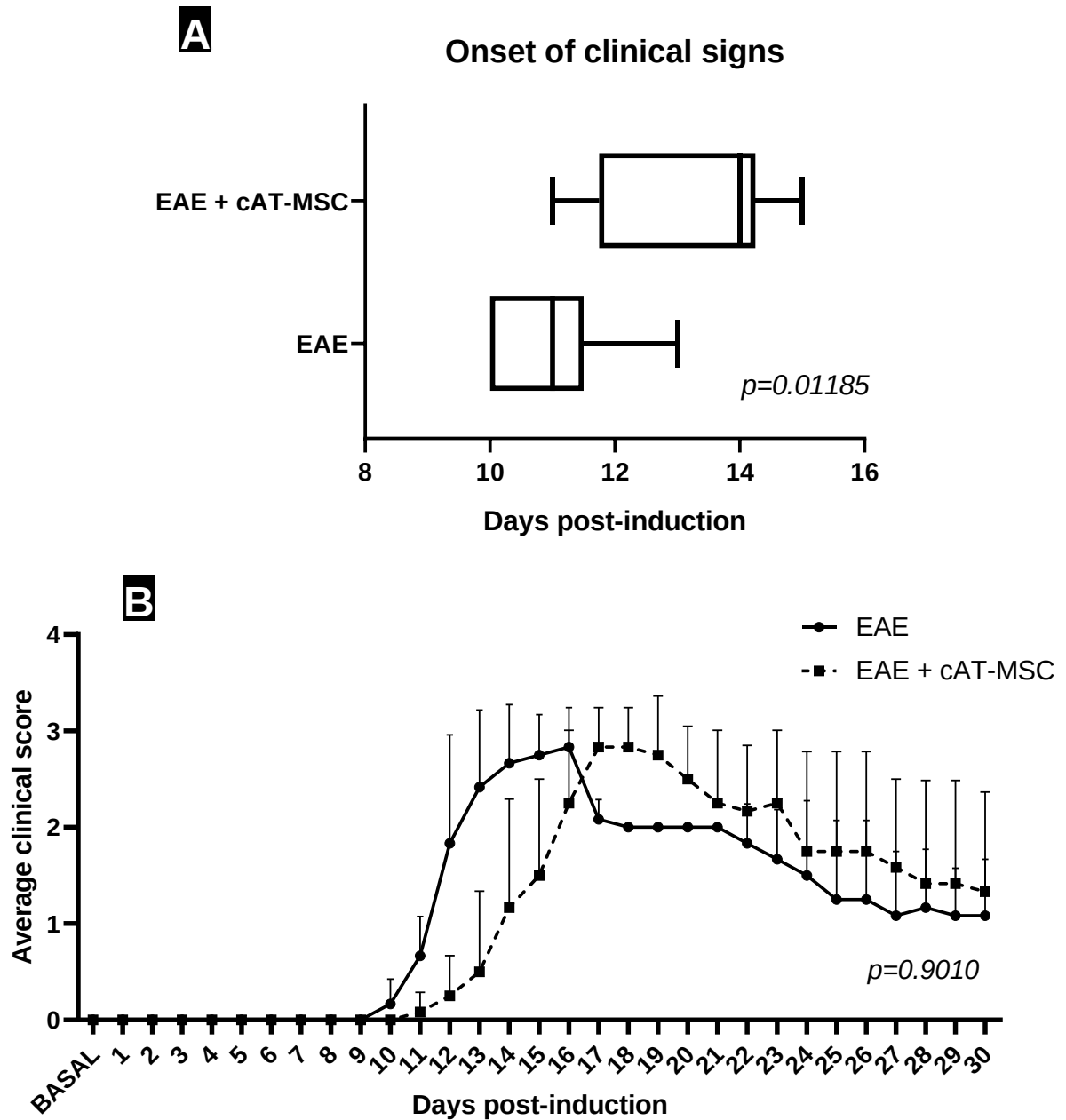


Fig. 4 Representation of the onset and progression of clinical scores in mice as EAE progresses. A: Representation of the average onset of clinical signs in each group, with the EAE+cAT-MSC group showing a statistically delayed onset of clinical EAE. B: Daily progression of symptoms throughout the experiment; note the rightward shift in the EAE+cAT-MSC group due to the delayed onset of EAE symptoms, but with a similar overall pattern to the control group. The average clinical score did not differ statistically between the groups throughout the experiment.

Gait analysis

The animals crossed a lit walkway with a glass floor for data collection. However, as EAE progressed, some animals were unable to cross the walkway at certain points in the experiment. Therefore, the number of animals analyzed at each time point is described in figure 5. The comparative values and graphs between the groups are organized in figure 6. Both the comparison of max contact and max intensity for the forelimbs between the groups did not show statistical differences. However, for the hindlimbs, which are more affected throughout the course of EAE, the control group had higher values, and statistical analysis revealed differences between the observed groups. The comparison of the base of support (BOS) did not show statistical differences between the evaluated groups.

DPI	EAE	EAE+cAT-MS
Basal	6 (100%)	6 (100%)
8	6 (100%)	6 (100%)
9	6 (100%)	6 (100%)
10	6 (100%)	6 (100%)
11	6 (100%)	6 (100%)
12	6 (100%)	6 (100%)
13	6 (100%)	6 (100%)
14	3 (50%)	6 (100%)
15	6 (100%)	6 (100%)
16	4 (67%)	6 (100%)
17	6 (100%)	6 (100%)
18	6 (100%)	4 (67%)
19	6 (100%)	6 (100%)
20	6 (100%)	3 (50%)
21	6 (100%)	3 (50%)
22	6 (100%)	4 (67%)
23	6 (100%)	3 (50%)
24	6 (100%)	3 (50%)
25	6 (100%)	6 (100%)
26	6 (100%)	6 (100%)
27	6 (100%)	6 (100%)
28	6 (100%)	6 (100%)
29	6 (100%)	6 (100%)

Fig. 5 Representation of the absolute number and percentage of animals assessed in the CatWalk XT® at each experimental time point.

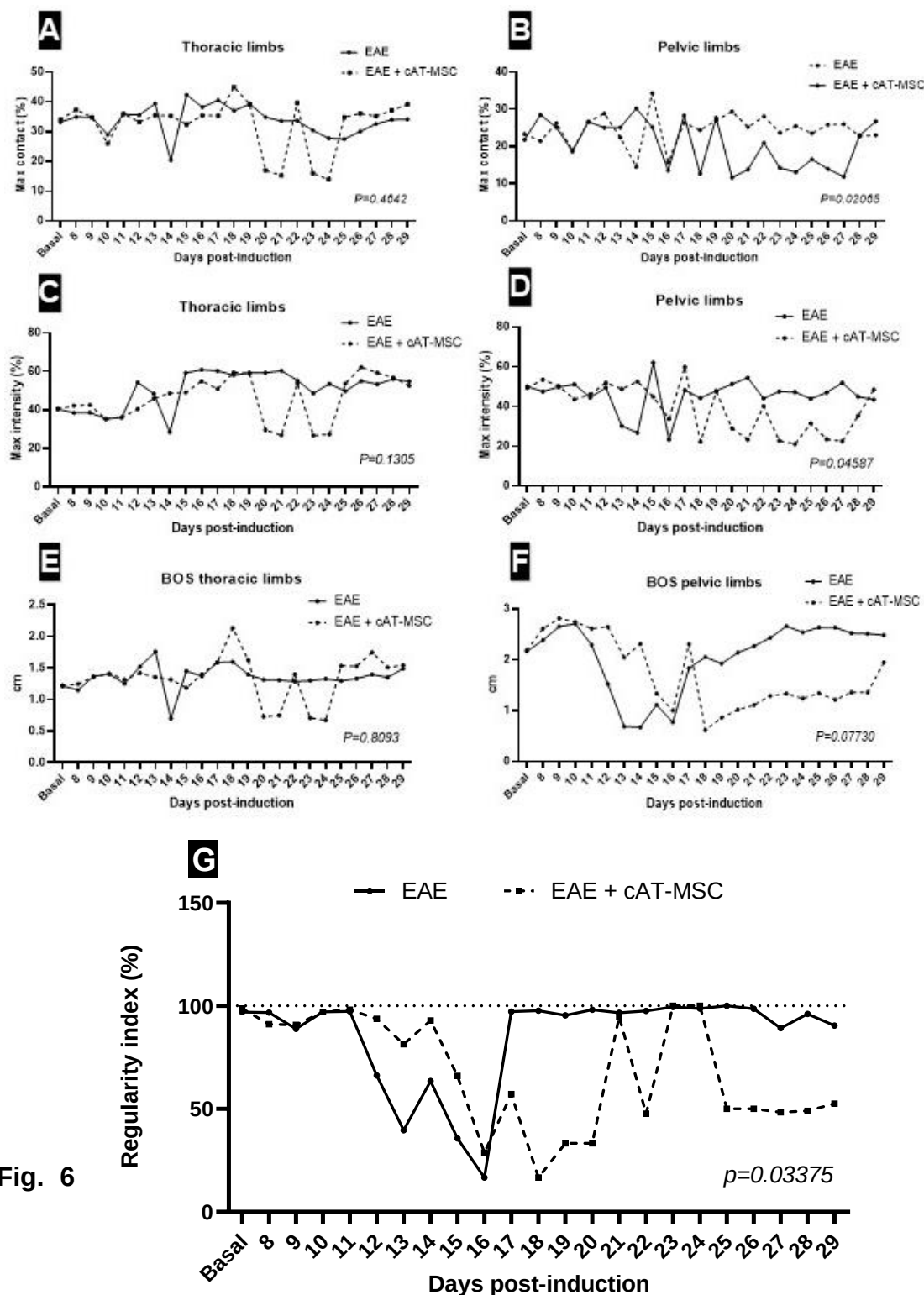


Fig. 6

Values analyzed by CatWalk XT® grouped separately for forelimbs and hindlimbs for the parameters max contact, max intensity, and base of support (BOS), while step sequence regularity index was calculated from the analysis of all four limbs.

A, C, and E: The comparison of max contact (%), max intensity (%), and base of support (cm) for forelimbs across groups did not show statistical differences, with

an increase in these parameters observed as the disease reaches its peak clinical score. **B, D, and F:** The comparison of max contact (%) and max intensity (%) for hindlimbs showed statistical differences, with the EAE group having higher averages throughout the disease course; however, the comparison of base of support (cm) did not show differences between groups. **G:** The comparison of regularity index (%) showed differences between groups, with the EAE group having higher values.

Spinal cord immunofluorescence

The astrocytic and microglial populations and reactivity in the EAE and EAE+cAT-
MSC groups showed statistical differences and a considerable increase compared to the disease-free control group. However, the integrated density values did not vary statistically between the EAE and EAE+cAT-MSC groups. The assessment of synaptic coverage of motoneurons using the anti-Synaptophysin marker demonstrated statistical differences only between the control group and the EAE group, indicating a reduction in motoneuron synapses in untreated EAE mice. In contrast, mice that received cAT-MSCs did not differ from the control group and showed differences compared to the EAE group, with synaptic coverage closer to normal (Figure 7).

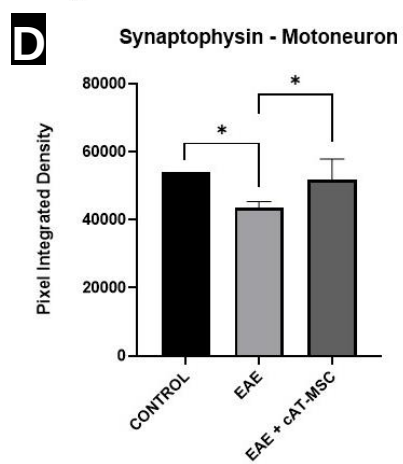
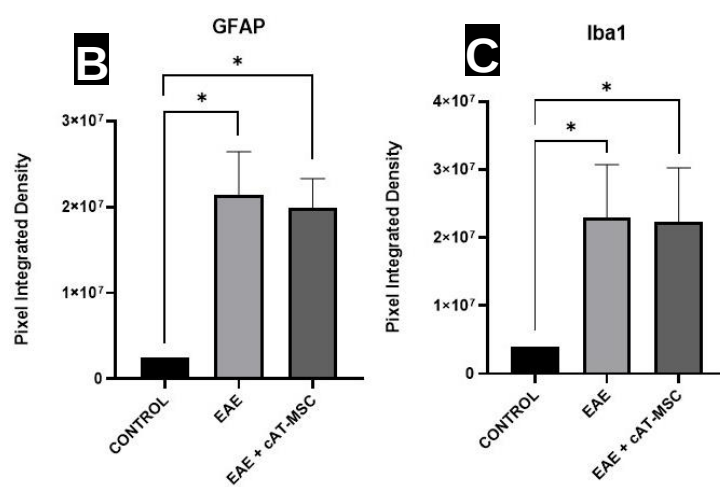
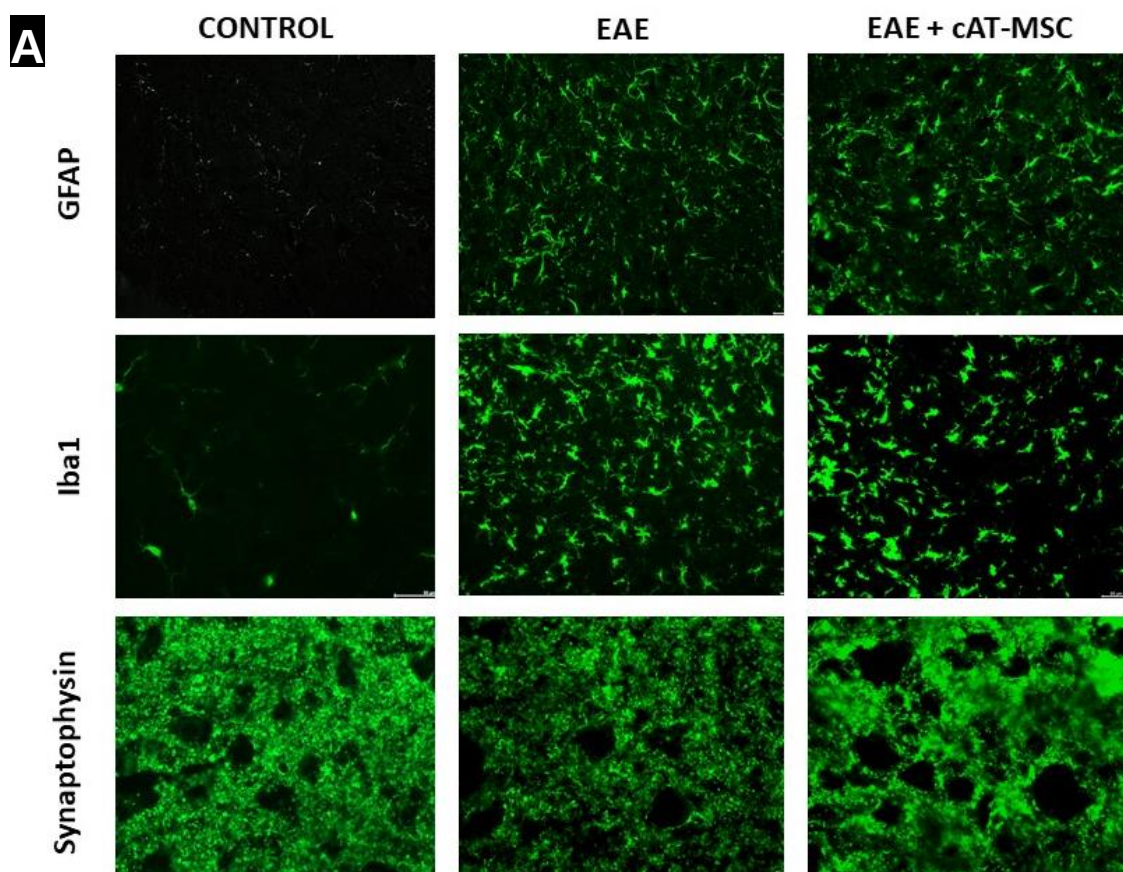


Fig. 7 Glial reactivity and synaptic coverage in the ventral horn of the lumbar enlargement, compared between control mice, EAE, and EAE+cAT-MSC. **A:** Representative images of immunofluorescence with the identified markers GFAP, Iba1, and Synaptophysin. **B:** Comparative graph of the quantification of integrated density pixels (IDP) of astrocytes marked with anti-GFAP, showing statistical differences between the EAE groups and the control, but no differences between the EAE and EAE+cAT-MSC groups. **C:** Comparative graph of the quantification of IDP of the microglial population marked with anti-Iba1, showing statistical differences only between the EAE groups and the control. **D:** Comparative graph of the quantification of IDP of synaptic coverage of motoneurons marked with anti-Synaptophysin. The EAE+cAT-MSC group did not differ from the control group but showed statistical differences compared to the EAE group, which had statistically lower synaptic coverage. $p \leq 0.05$.

DISCUSSION

The EAE model, MS in humans, and MUO in dogs are interrelated conditions that involve the CNS and share inflammatory and autoimmune characteristics. Using EAE as a model allows for exploring the immunopathological mechanisms underlying MUO and evaluating potential immunomodulatory and neuroprotective therapies, such as the use of MSCs. MUO has a poor prognosis, with few effective therapeutic options currently available, creating a demand for research on potential therapeutic methods using experimental models that mimic a neuroinflammatory environment.

In the present study, using the described methodologies, the cAT-MSCs demonstrated good viability, proliferation, and satisfactory morphological characteristics. Treatment with cAT-MSCs on the seventh day post-induction showed a delay in the onset of clinical signs in the EAE+cAT-MSC group. However, no difference was observed in clinical progression compared to the EAE group. The treatment on post-induction day 7 (DPI 7) is considered prophylactic since no mouse should exhibit clinical signs at this stage of induction [14,15].

Weight variations showed no statistical difference between groups, though there was an attenuation in weight loss at the onset of the disease, with less weight loss in the EAE+cAT-MSC group. This suggests that cellular therapy may help

prevent early weight loss in EAE. CD4⁺ T lymphocytes are activated by myelin antigens (MOG) presented by antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells [16]. These T lymphocytes differentiate into specific subpopulations, including Th1 and Th17 cells, which play crucial roles in the disease pathogenesis. MSCs can modulate the immune response by promoting an anti-inflammatory environment, inhibiting T cell activation, and reducing the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-17 and IFN- γ , which are key players in EAE pathogenesis [3]. HGF produced by MSCs has been shown to modulate motor recovery functions in an EAE model [17].

The lack of clinical attenuation of EAE in the EAE+cAT-MSC group may have been influenced by several factors, including the cell dose used, the single administration, MSC survival after administration (which can vary depending on the route), the type of cells (autologous, allogeneic, or xenogeneic), host environmental conditions, and the immune response [17]. Another factor to consider is the cAT-MSCs' capacity to modulate the acute inflammatory environment, but possibly not enough to reverse the late hypersensitivity and autoimmunity processes characteristic of the model, as the disease later progressed similarly to the control group [16,17].

The max contact and max intensity analyses performed by CatWalk XT were calculated from the paw surface in contact with the glass and the step intensity, respectively. Both are related to the duration of these events, resulting in a percentage value [11]. Increased values in these two analyses may represent paresis and neurological deficits, where the animal maintains its paws on the surface with increased area, intensity, and duration [11]. No differences were found between the groups when only the forelimbs were evaluated, probably due to the EAE progression in this experiment not reaching high clinical scores that correspond to severe motor changes in the forelimbs [3,11]. When comparing the hindlimbs, which are primarily affected by neuroinflammation in the lumbar intumescence, the EAE group showed statistically higher results, indicating greater and more prolonged paresis during disease progression.

The BOS (base of support) was calculated based on the distance between limbs, represented in centimeters. The forelimbs and hindlimbs were compared between the groups and showed no statistical difference. However, in the graph analysis, a persistent greater distance between hindlimbs was observed in the

control group, correlating with the gait data from previous analyses, suggesting more prolonged hindlimb paresis compared to the EAE+cAT-MSC group.

Another gait analysis, the step sequence regularity index, evaluates limb coordination and gait pattern in percentage values, ranging from 0 (no pattern) to 100% (coordinated) [11]. The EAE+cAT-MSC group showed lower results compared to the EAE group. However, in several points of the experiment, the EAE+cAT-MSC group had fewer sample points due to the inability of some mice to cross the platform on respective days. This value is more related to proprioceptive function, and severe hindlimb ataxia was observed during EAE progression, especially in clinical scores above 2 [11].

The astrocyte population was evaluated using the anti-GFAP marker, showing a significant increase in the ventral horn of the spinal cord in both EAE and EAE+cAT-MSC groups compared to the control. The EAE-cAT-MSC group also had higher results than the control, indicating more intense astrogliosis. Astrocytes are glial cells in the CNS that perform various essential functions, including modulating inflammation, influencing blood-brain barrier integrity, interacting with immune cells, participating in tissue repair responses, and contributing to chronic Neuroinflammation [1]. Astrogliosis, when analyzed exclusively, may be related to either CNS injury or repair [1]. Microglia can also be interpreted similarly in the context of inflammation, serving both harmful and reparative roles [18]. Anti-Iba1 staining showed a statistical difference only between the experimental and control groups, suggesting a functional, rather than quantitative, difference in the microglial population [18]. These findings are supported by the synaptic coverage analysis with the anti-Synaptophysin marker, where the EAE-cAT-MSC group differed from the EAE group but not the control, indicating preservation and neuroprotection of the motor neuron synaptic architecture.

Comparing the acquired data suggests that, although the glial population in the EAE+cAT-MSC group remained similar to that of the EAE group, its function may differ in the treated animals within the same therapeutic window. The C57BL/6J mouse EAE model exhibits a chronic-progressive course, with clinical signs peaking 4–5 days after onset, followed by clinical attenuation until reaching a stable value [3]. All animals in the present experiment were euthanized on the same day (DPI 30), but the disease began earlier in the EAE group, which may

have influenced the immunofluorescence results.

The survival duration of xenogeneic cells in the murine EAE model is not well established, and a single transplant (single dose) during a 30-day experiment may not fully represent the immunomodulatory and neuroprotective potential of cAT-MSCs. Therefore, further preclinical trials with different treatment regimens and expanded parameters, such as analyzing various CNS areas, motor and sensory function, T cell subpopulations (CD4/CD8, Th1/Th2, Treg), cytokine gene and protein expression, chemokines, and neurotrophic factors, should be conducted to provide more data on MSCs' therapeutic effects in this experimental model. This would enhance our translational understanding of similar naturally occurring diseases, such as MS in humans and MUO in dogs.

Based on this study's results and the literature, we can affirm that MSC cellular therapy represents a promising alternative for treating and controlling EAE, MS, and MUO [19-21], as well as other neuroimmune diseases [22], paving the way for the development of therapeutic protocols, especially for dogs affected by MUO.

CONCLUSIONS

A single-dose treatment with cAT-MSCs (canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells) in mice with EAE on the seventh day post-induction delays the onset of clinical disease and exhibits neuroprotective effects, primarily related to the preservation of synaptic coverage of motor neurons.

LIST OF ABBREVIATIONS

APC: Antigen-presenting cell

BOS: Base of support;

cAT-MSC: Canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells;

CD: Cluster of differentiation;

EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis;

EV: Extracellular vesicles;

MS: Multiple sclerosis;

PDI: Pixel Integrated Density;

IV: Intravenous;

IL: Interleukin

HGF: Hepatocyte growth factor

MSC: Mesenchymal stromal cells;

MUO: Meningoencephalomyelitis of unknown origin;

SC: Subcutaneous;

CNS: Central nervous system.

DECLARATIONS

Ethics approval

All stages of this study were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, under protocol number 6026-1/2022.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The authors confirm that all data underlying the findings are fully available.

Competing interests

The authors declare no competing interests related to this study.

Funding

The authors are grateful for funding received through CNPq and CAPES.

Authors' contributions

AVGO made substantial contributions to conception and design, acquisition, analysis and interpretation of data, and wrote the manuscript. ALRO made substantial contributions to acquisition, analysis and interpretation of data and was involved in drafting the manuscript, revising it critically for important intellectual content. RMA made substantial contributions to analysis and interpretation of data, and was involved in drafting the manuscript, revising it critically for important intellectual content.

Acknowledgements

The authors thank the Translational Nucleus of Regenerative Medicine (NUTRAMERE), School of Veterinary Medicine and Animal Science of Botucatu, São Paulo State University - FMVZ-UNESP Botucatu and the Nerve Regeneration Laboratory (Laboratório de Regeneração Nervosa) in the Department of Anatomy (Departamento de Anatomia), Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP.

REFERENCES

1. Friese MA, Schattling B, Fugger L. **Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis**. Nature Reviews Neurology [Internet]. 2014 Mar 18;10(4):225–38. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2014.37>

2. Coates JR, Jeffery ND. **Perspectives on Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin**. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2014 Nov;44(6):1157–85.
3. Stromnes IM, Goverman JM. **Active induction of experimental allergic encephalomyelitis**. Nature Protocols. 2006 Nov;1(4):1810–9.
4. Kassis I, Petrou P, Halimi M, Karussis D. **Mesenchymal stem cells (MSC) derived from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors**. Immunology Letters [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2020 Dec 13];154(1):70–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247813000813?via%3Dihub>
5. Freitas G, Souza A, Lopes H, Trevisan R, Oliveira F, Fernandes R, et al. **Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Culture, Characterization and Differentiation**. BIO-PROTOCOL. 2020;10(4).
6. Peroni JF, Borjesson DL. **Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells**. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. 2011 Aug;27(2):351–62.
7. Clark K, Zhang S, Barthe S, Kumar P, Pivetti C, Kreutzberg N, et al. **Placental Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Myelin Regeneration in an Animal Model of Multiple Sclerosis**. Cells. 2019 Nov 23;8(12):1497.
8. Hu JC, Zheng CX, Sui BD, Liu WJ, Jin Y. **Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration**. World Journal of Stem Cells. 2022 May 26;14(5):318–29.
9. Cohen JA. **Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis**. Journal of the Neurological Sciences [Internet]. 2013 Oct 15;333(1-2):43–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23294498/>
10. Thomé R, Carolina A, Alves T, Lumi L, Fernanda, Sartori A, et al. **Artesunate Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Leukocyte Migration to the Central Nervous System**. CNS Neuroscience & Therapeutics. 2016 May 11;22(8):707–14.
11. Garrick JM, Costa LG, Cole TB, Judit Marsillach. **Evaluating Gait and Locomotion in Rodents with the CatWalk**. Current protocols. 2021 Aug 1;1(8).
12. Silva GAA, Pradella F, Moraes A, Farias A, Santos LMB, Oliveira ALR. **Impact of pregabalin treatment on synaptic plasticity and glial reactivity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis**. Brain and Behavior. 2014 Sep 2;4(6):925–35.
13. Rexed B. **A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat**. The Journal of Comparative Neurology. 1954 Apr;100(2):297–379.
14. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. **Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)**. British Journal of Pharmacology [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 May 19];164(4):1079–106. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3229753/>

15. Rangachari M, Kuchroo VK. **Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology.** Journal of Autoimmunity. 2013 Sep;45:31–9.
16. Glenn JD. **Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy.** World Journal of Stem Cells. 2014;6(5):526.
17. Bai L, Lennon D, Eaton V, Maier K, Caplan A, Miller S, et al. **Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Induce Th2-Polarized Immune Response and Promote Endogenous Repair in Animal Models of Multiple Sclerosis.** Glia [Internet]. 2009 Aug 15;57(11):1192–203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706928/>
18. Li T, Zhang S. **Microgliosis in the Injured Brain.** The Neuroscientist. 2015 Feb 11;22(2):165–70.
19. Zeira O, Asiag N, Aralla M, Ghezzi E, Pettinari L, Martinelli L, et al. **Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings.** Journal of Neuroinflammation. 2015 Sep 29;12(1).
20. Gramlich OW, Brown AJ, Godwin CR, Chimenti MS, Boland LK, Ankrum JA, et al. **Systemic Mesenchymal Stem Cell Treatment Mitigates Structural and Functional Retinal Ganglion Cell Degeneration in a Mouse Model of Multiple Sclerosis.** Translational Vision Science & Technology. 2020 Jul 10;9(8):16.
21. Islam MA, Alam SS, Kundu S, Ahmed S, Sultana S, Patar A, et al. **Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis.** Journal of Clinical Medicine [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2023 Dec 3];12(19):6311. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/12/19/6311>
22. Leone M, Maurizio Gelati, Daniela Celeste Profico, Gobbi C, Emanuele Pravata, Massimiliano Copetti, et al. **Phase I clinical trial of intracerebroventricular transplantation of allogeneic neural stem cells in people with progressive multiple sclerosis.** Cell Stem Cell. 2023 Nov 1;