

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/11/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

HOMING DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES
CANINAS APÓS TRANSPLANTE PELA VIA EPIDURAL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO RAQUIMEDULAR AGUDA EM COELHOS

MARIANA CRISTINA RAMOS

Botucatu – SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

HOMING DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES
CANINAS APÓS TRANSPLANTE PELA VIA EPIDURAL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO RAQUIMEDULAR AGUDA EM COELHOS

MARIANA CRISTINA RAMOS

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

Orientador: Prof.Dr. Rogério Martins Amorim

Coorientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ramos, Mariana Cristina.

Homing de células estromais mesenquimais multipotentes caninas após transplante pela via epidural em modelo experimental de lesão raquimedular aguda em coelhos / Mariana Cristina Ramos. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Coorientador: Matheus Bertanha

Capes: 50501003

1. Células mesenquimais estromais. 2. Fluorescência. 3. Anestesia epidural. 4. Terapia celular. 5. Coelho.

Palavras-chave: Células mesenquimais estromais; Fluorescência; *Homing* celular; Transplante xenogênico; Via epidural.

Título: *HOMING* DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES CANINAS APÓS TRANSPLANTE PELA VIA EPIDURAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO RAQUIMEDULAR AGUDA EM COELHOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Médica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa.Dra. Ana Liz Garcia Alves

Membro da banca

Departamento de Cirurgia veterinária e reprodução animal

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof Dra Fabiane Barchiki

Membro da banca

PUCPR campus Curitiba

Data da defesa: 17/11/2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha avó Leonor, aos meus pais, Dorival e Maria e ao meu irmão Alexandre, que sempre me apoiaram, me incentivaram e são meu exemplo de caráter e dedicação.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao meu orientador, Professor Rogério Martins Amorim pelo apoio, direcionamento na realização do projeto e ensinamentos desde a época de graduação, passando pela residência até aqui. Seu entusiasmo em ensinar neurologia é uma verdadeira inspiração.

Ao Diego e a Giovana por terem me ajudado tanto. Desde a ajuda com a obtenção da primeira alíquota de célula tronco, ajuda nos experimentos e com a interpretação dos dados, deixo meu sincero agradecimento.

Aos também colegas de pós-graduação Felipe, Suellen, Dênis pelo apoio, conversas e troca de experiências.

Ao cirurgião veterinário Emerson Siqueira pela ajuda não só com as laminectomias mais rápidas e limpas que eu já vi, mas também pela amizade, e dedicação. Seu profissionalismo foi fundamental para que o projeto desse certo.

Ao médico veterinário Diego Generoso que abraçou nossa causa de fazer a melhor anestesia possível para os coelhos e possibilitou que todo o procedimento fosse o mais indolor e tranquilo possível aos animais.

Aos funcionários da unipex Bardella e Zé por me ajudar nas dependências da unipex, seja nos procedimentos cirúrgicos, nas perfusões ou na contenção dos animais.

A Vick e Paula por cuidarem da sala de cultura, por me ajudarem principalmente no início com a manipulação das culturas e também com o apoio necessário quando as coisas não iam como planejado.

Ao Leandro, pela dedicação aos cortes das matérias, pela microscopia confocal, pela ajuda no preparo do paraformaldeído, ente tantas outras coisas!

Ao meu co-orientador prof Matheus Bertanha pelo auxílio, por me fornecer os cateters de embolectomia, e alíquota de Qtracker e células de coelho quando eu precisei.

A Lenize e Ana Livia pela troca de experiências, ajuda com as células e com a companhia na sala de cultura.

A todos do laboratório de regeneração nervosa da UNICAMP, em especial ao professor Alexandre Rodrigues Leite de Oliveira e ao doutor André Bombeiro que me receberam tão bem e tanto me ajudaram com o imageador *in vivo*.

Aos colegas do departamento de Patologia veterinária, Dr. Carlos Eduardo, Alexandre e Mayara pela contribuição com a histologia e imunohistoquímicas.

Agradeço todos os residentes e pós graduandos pela amizade, risadas e companhia que coloriu os dias mais cinzas e me ajudaram nessa trajetória

Ao meu namorado Israel por sempre me incentivar e ter sido o meu porto seguro durante todo esse tempo.

A minha família, por serem os meus amores, exemplos de vida e por estarem sempre ao meu lado.

Um especial agradecimento aos 16 animais que contribuíram com a realização deste experimento, que os resultados do trabalho possam contribuir com a evolução da medicina e refletir na saúde de animais e humanos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Potential for differentiation of canine AdMSCs in adipogenic (A), osteogenic (B) and chondrogenic (C) lines, 20x magnification. Note the deposition of lipid droplets within the cell cytoplasm stained with Oil Red O. (A). Extracellular calcium deposition stained in Alizarin Red S (B). Formation of micromass stained by toluidine blue (C). AdMSCs at 20x magnification, 3rd passage. Note the fibroblastoid morphology and adherence to plastic (D) and Immunophenotypic analysis (E).....34

Figura 2 Histological evaluation of the ventral horn of the spinal cord (T10 segment) seven days after experimental injury (A, B and C). Note the frequent spheroids and vacuolation of white matter (A), discrete satellitosis and central chromatolysis (B). Note the frequent spheroid and vacuolization of white matter, central chromatolysis, extensive area of hemorrhagic necrosis (malacia) (asterisk), mainly in gray matter with moderate gitter cells (Square)(C), 100 μm scale.....35

Figura 3. Representation of spinal cord, brain, liver, kidneys, and lungs analyzed with an *in vivo* imager. On the left, negative control organs, in the middle, organs from rabbits 1 to rabbit 8. Organs that were equal to the negative control were considered negative and those with more fluorescence than their negative control were considered positive. The intensity scale graded from 8.7×10^7 to 1.2×10^8 photons/second/ mm^2 for spinal cord, from 1.0×10^8 to 1.5×10^8 photons/second/ mm^2 for brain, from 3.5×10^7 to 1.0×10^8 photons/second/ mm^2 for liver, from 2.0×10^7 to 1.0×10^8 photons/second/ mm^2

for spleen, from $1, 5 \times 10^7$ up to 4.5×10^7 photons / second / mm^2 for lungs, and from 1.3×10^7 up to 5.0×10^7 photons/second/ mm^2 for kidneys.....36

Figura 4. Ex-vivo fluorescence detection imaging of the spinal cord. Figures A and C show the setup of spinal cords from rabbits number one (R1) and two (R2) and the negative spinal cord controls (NC) before imaged. Figures B shows a negative fluorescence detection in the spinal cord of the rabbit R2, while Figure D shows a positive fluorescence detection in the spinal cord of the rabbit R1. The arrows indicate the site of experimental spinal cord injury (10th thoracic segment) and the asterisks indicate the end of the spinal cord (cauda equina), corresponding with the site of the canine AdMSCs transplantation by the epidural route.....37

Figura 5. Confocal microscopy images of the L7–S1 spinal cord segment (site of the transplant) and of the T10 spinal cord segment (site of experimental injury) (A). Note the presence of canine AdMSCs labelled with Qtracker 655® at the L7-S1 and T10 spinal cord segments (arrows, merged images DAPI + Qtracker). Quantitative analysis of the fluorescence intensity of canine AdMSCs labelled with Qtracker 655® at the L7-S1 and T10 spinal cord segments seven days after transplantation.....39

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Células mesenquimais estromais.....	3
2.2. Terapia com CTM.....	4
2.3. Vias de transplante no contexto das doenças do sistema nervoso..	5
2.4. Transplante celular xenogênico.....	7
2.5. <i>Homing</i> celular.....	8
2.6. <i>Homing</i> celular nos modelos de lesão raquimadular.....	11
3. HIPÓTESE.....	13
4.OBJETIVOS.....	13
4.1. Objetivos gerais.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	14
5.REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO II- Trabalho científico.....	24
Abstract.....	25
Introduction.....	26
Material and methods.....	27
Results.....	33
Discussion.....	39
Conclusion.....	43
References.....	44

RAMOS, M.C. ***Homing* de células estromais mesenquimais multipotentes caninas após transplante pela via epidural em modelo experimental de lesão raquimedular aguda em coelhos**. Botucatu, 2020. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As células estromais mesenquimais multipotentes (CTM) têm sido apresentadas pela comunidade científica como uma alternativa promissora no tratamento de doenças inflamatórias, traumáticas, vasculares e degenerativas do sistema nervoso central devido a suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e neuroregenerativas. Um dos fatores que podem afetar a eficácia da terapia celular é a via de transplante utilizada. O objetivo deste estudo foi avaliar o *homing* de CTMs derivadas do tecido adiposo caninas (AdCTMs) transplantadas pela via epidural em modelo experimental de lesão raquimedular aguda em coelhos. A lesão raquimedular foi induzida experimentalmente em 8 coelhos por compressão do segmento medular T10, imediatamente após os animais foram submetidos ao transplante de AdCTMs caninas marcadas com nanocristais Qtracker 655[®] pela via epidural entre os espaços L7-S1. Sete dias após o transplante, o *homing* das AdCTMs caninas foi avaliado na medula espinhal, encéfalo, fígado, rins, baço e pulmão por meio de detecção de fluorescência em imageador *in vivo*. Os segmentos medulares L7-S1 e local de lesão foram analisados em microscopia confocal para a presença de AdCTMs marcadas. Constatou-se a presença de AdCTMs caninas em local de lesão na medula espinhal e segmento L7-S1, houve marcação em encéfalo, pulmão, fígado e rins, não houve marcação em baço. A presença de AdCTMs na medula espinhal comprova a capacidade destas células passarem pela dura mater e atingirem o local de lesão. O transplante epidural é viável e minimamente invasivo, sendo um bom candidato para o uso em terapia celular no contexto de doenças neurológicas.

Palavras-Chave: rastreabilidade celular, células estromais mesenquimais, transplante xenogênico, via epidural, trauma medular.

RAMOS, M.C. Canine multipotent **mesenchymal stromal cells homing after epidural transplant in experimental model of acute spinal cord injury in rabbits**. Botucatu, 2020. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) have been presented by the scientific community as a promising alternative in the treatment of inflammatory, traumatic, vascular and degenerative diseases of the central nervous system due to their anti-inflammatory, immunomodulatory and neuroregenerative properties. One of the aspects that can affect the effectiveness of the stem cell therapy is the transplantation route used. The aim of this study was to evaluate the homing of canine adipose derived MSCs (AdMSCs) transplanted via epidural injection in an experimental model of acute spinal cord injury in rabbits. New Zealand rabbits (n=8) were subjected to the spinal cord injury induced by compression of the 10th thoracic segment. Immediately after the surgical procedure, the animals were submitted to the transplantation of marked AdMSCs with quantum dots Qtracker 655[®] through epidural injection between the L7-S1 spaces. Seven days after the transplant, the brain, spinal cord, lungs, kidney, spleen and liver were collected and evaluated by fluorescence imaging. The spinal cord segments L7-S1 and thoracic injury site were evaluated by confocal microscopy to identify the presence of marked canine AdMSCs. Results shows that AdMSCs migrate to thoracic spinal cord segment, lungs, brain, liver and kidneys, no fluorescence was observed in spleen. The presence of canine AdMSCs in spinal cord indicates the capacity of these cells to overcome the dura mater and reach the injury site. The epidural delivery is feasible and minimally invasive and might be a good candidate for cell transplantation in the context of neurological diseases.

Keywords: stem cell tracking, xenotransplant, epidural transplantation, spinal cord injury, mesenchymal stromal cells.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As células estromais mesenquimais multipotentes (*Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* -CTMs) têm atraído a atenção da comunidade científica devido a sua capacidade imunomoduladora e regenerativa, que as torna promissoras no tratamento de doenças inflamatórias, imunológicas, degenerativas, neurológicas, cardiovasculares, entre outras. Seu uso em lesões raquimedulares tem se mostrado benéfico por promover um efeito anti-inflamatório e reparador tecidual que pode levar a recuperação funcional motora e sensitiva em pacientes humanos e não humanos (DENG, 2006; BERNARDO; FIBBE, 2013; HOFFMAN;DOW, 2016).

A migração de células para o local da lesão é chamado de “*Homing*” e é um fator importante para a eficácia da terapia celular, uma vez que a sua ação é bastante ligada à capacidade das células em produzir fatores que atuam de maneira parácrina ou justácrina às células alvo, desta maneira, acredita-se que quanto mais próximo as CTMs estiverem do tecido lesado, melhores serão os resultados esperados (SOHNI;VERFAILLIE, 2013; HOFFMAN; DOW, 2016).

O uso de CTMs tem sido amplamente estudado no contexto das lesões raquimedulares e apresenta-se como uma alternativa terapêutica promissor. A via intratecal foi empregada em vários estudos envolvendo lesões inflamatórias do sistema nervoso central e lesões raquimedulares (SATAKE, 2004; BAKSHI et al., 2006; PAUL et al., 2009; YANG, 2018), demonstrando ter bons resultados relacionados à migração das células para o local lesionado e eficácia terapêutica (SATAKE, 2004; BAKSHI et al., 2006).

A via epidural foi pouco explorada até o momento, porém esta via tem grande potencial para ser usada em terapias celulares por ser pouco invasiva e pela dura mater ser suprida por arteríolas e vênulas meningeas que podem favorecer o *homing* das células transplantadas (LEE, et al., 2017). A busca

constante por técnicas pouco invasivas e eficazes para transplantes celulares estimula a experimentação de vias pouco exploradas. Recentemente a via intranasal foi avaliada no contexto de doenças cerebrais, indicando que as CTMs derivadas da geleia de Wharton do cordão umbilical humano migraram para o encéfalo de camundongos (GALEANO et al., 2018).

Buscar vias alternativas para transplantes celulares é importante, visto que outras vias utilizadas atualmente podem ocasionar maiores lesões para o paciente, como no caso de aplicações intralesionais, perilesionais, intratecais ou intraventriculares. A via intravenosa é muito utilizada em terapia celular, porém é sabido que as células podem ser aprisionadas em outros órgãos e não migrarem em quantidades suficientes para promoverem a regeneração do SNC (LEIBACHER ; HENSCHLER, 2016). O acesso epidural é muito utilizado para a administração de drogas anestésicas em casos de cirurgia abdominal, se mostrando eficiente para a distribuição destes medicamentos. É fácil de ser acessado e menos invasivo por não adentrar o espaço subaracnóide, limitando ainda mais o risco de lesão da medula espinhal.

Pensando em terapia celular no contexto clínico, a via epidural poderia ser uma alternativa ao transplante intratecal ou intravenoso caso seja comprovada que as células transplantadas pela via epidural sejam capazes de atravessar a dura mater e migrar para o local da lesão raquimedular.

O estudo das diferentes vias de transplante de CTM em lesões do sistema nervoso central é fundamental para o desenvolvimento de protocolos seguros e eficazes, antes desta biotecnologia ser aplicada na rotina clínica médico veterinária. Nosso grupo de pesquisa tem estudado a viabilidade, a segurança e a eficácia do transplante intratecal de CTM autóloga e alogênicas em equinos e caninos (MAIA et al., 2015; BARBERINI et al., 2018). Neste contexto, o estudo do *homing* das AdCTMs caninas após o transplante intratecal em modelo experimental de lesão raquimedular aguda em coelhos visa obter dados que suportem o desenvolvimento futuro de protocolos de terapia celular para o tratamento de enfermidades do sistema nervoso central em cães.

References

1. BARBASH, I.M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M.S.; ETZION, S.; TESSONE, A.; MILLER, L.; GUETTA, E.; ZIPORI, D.; KEDES, L.H.; et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, v. 108, p. 863–868, 2003.

2. CONSTANTIN, G.; MARCONI S.; ROSSI, B.; ANGIARI, S.; CALDERAN, L.; ANGHILERI, E.; GINI, B.; BACH, S. D.; LO, M. M.; BIFARI, F.; GALIE, M.; TURANO. E.; BUDUI, S.; SBARBATI, A.; KRAMPERA, M.; BONETTI, B. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *stem cell translational and clinical research*, v.27, p. 2624–2635, 2009.
3. MOTHE, A.J.; BOZKURT, G.; CATAPANO, J.; ZABOJOVA, J.; WANG, X.; KEATING, A.; TATOR, C.H.; Intrathecal transplantation of stem cells by lumbar puncture for thoracic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord*, v. 49, p. 967–973, 2011.
4. GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S. A.; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *The Veterinary Journal*, v. 191, p. 19-27, 2012.
5. HOFFMAN, A. M.; DOW, S. W. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells*, v.34, p. 1709-1729, 2016.
6. BACH, F.S.; REBELATTO, C.L.K; FRACARO. L.; SENEGAGLIA, A.C.; FRAGOSO, F.Y.I.; DAGA, D.R.; BROFMAN, P.R.S.; PIMPÃO, C.T.; ENGRACIA FILHO,J.R.; MONTIANI-FERREIRA, F. ; VILLANOVA, J.A. J.R. Comparison of the Efficacy of Surgical Decompression Alone and Combined With Canine Adipose Tissue-Derived Stem Cell Transplantation in Dogs With Acute Thoracolumbar Disk Disease and Spinal Cord Injury, *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6 n.383, 2019.
7. KHAN S, RAWAT T, KUMAR R, CHANDRA V, SAXENA, A C, PAWDE AM, KINJAVDEKAR P, AMARPAL A, SHARMA, GT. Clinical evaluation following the percutaneous transplantation of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells (aBM-MSC) in dogs affected by vertebral compression fracture. *Veterinary and Animal Science*. (2020); 10. 100152. 10.1016/j.vas.2020.100152.

8. KARP, J. M.; TEO, G.S.L. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *cell stem cell*, v. 4, p. 206-216, 2009.
9. DIACOVO, T.; ROTH, S.; BUCCOLA, J.; BAINTON, D.; SPRINGER, T. Neutrophil Rolling, Arrest, and Transmigration Across Activated, Surface Adherent Platelets Via Sequential Action of P-Selectin and the Integrin CD11b/CD18. *Blood*. v. 88, p.146-157, 1996.
10. DE BECKER, A.; VAN HUMMELEN, P.; BAKKUS, M.; VANDE BROEK, I.; DE WEVER, J.; DE WAELE, M.; VAN RIET, I. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* v. 92, p. 440–449, 2007.
11. POTAPOVA, I.A.; BRINK, P.R.; COHEN, I.S.; DORONIN, S.V. Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. v. 283, p. 13100–13107, 2008.
12. SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells International*, v. 2013, p.1- 8, 2013.
13. RUSTER, B.; GOTTIG, S.; LUDWIG, R.J.; BISTRAN, R.; MULLER, S.; SEIFRIED, E.; GILLE, J.; HENSCHLER, R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, v. 108, p. 3938–3944, 2006.
14. FOX, J.M.; CHAMBERLAIN, G.; ASHTON, B.A.; MIDDLETON, J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British Journal of Haematology*. v.13, n. 4, p. 491–502, 2007.
15. ZHANG, D.; FAN, G.; ZHOU, X. et al., “Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 44, n. 2, p. 281–292, 2008.

16. LEIBACHER, J. ; HENSCHLER, R.; Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells *StemCell Research&Therapy* v.7, p 7, 2016.
17. GAO, J.; DENNIS, J. E.; MUZIC, R. F.; LUNDBERG, M.; CAPLAN, A. I. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, v. 169, n. 1, p. 12–20, 2001.
18. KRAITCHMAN, D.L.; TATSUMI, M.; GILSON, W.D.; ISHIMORI, T.; KEDZIOREK, D.; WALCZAK, P.; SEGARS, W.P.; CHEN, H.H.; FRITZGES, D.; IZBUDAK, I.; et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* v. 112, p. 1451–1461, 2005.
19. SCHREPFER, S.; DEUSE, T.; REICHENSPURNER, H.; FISCHBEIN, M. P.; ROBBINS, R. C.; PELLETIER, M. P. Stem cell transplantation: the Lung barrier. *Transplantation Proceedings*, v. 39, n. 2, p. 573–576, 2007.
20. SATAKE, K.; JUEREN LOU. M.D.; LENKE, L.G. Migration of Mesenchymal Stem Cells Through Cerebrospinal Fluid into Injured Spinal Cord Tissue. *Spine*, v. 29, n. 18, p. 1971–1979, 2004.
21. DENG, Y. B.; LIU, X.G.; LIU, Z.G.; LIU, X.L.; LIU, Y.; ZHOU, G.Q. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy*, v. 8, n. 3, p. 210-214, 2006.
22. BAKSHI, A.; BARSHINGER, A. L.; SWANGER, S. A.; MADHVANI, V.; SHUMSKY, J. S.; NEUHUBER, B.; FISCHER, I. Lumbar Puncture Delivery of Bone Marrow Stromal Cells in Spinal Cord Contusion: A Novel Method for Minimally Invasive Cell Transplantation. *Journal of Neurotrauma*, v. 23, n.1, p. 55–65, 2006.
23. PAUL, C.; SAMDANI, A.F.; BETZ, R.R.; FISCHER, I.; NEUHUBER, B. Grafting of human bonemarrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine* v.4 p. 328-334, 2009.
24. TRIFFTERER L, MARHOFER P, LECHNER G, MARKSZ TC, KIMBERGER O, SCHMID W, MARHOFER D. An observational study

- of the macro- and micro-haemodynamic implications of epidural anaesthesia in children. *Anaesthesia*. 2017 Apr;72(4):488-495.
25. BURM, AGL. "Clinical pharmacokinetics of epidural and spinal anaesthesia." *Clinical pharmacokinetics* 16.5 (1989): 283-311.
26. PLEUVRY, BARBARA J. "Factors affecting drug absorption and distribution." *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 6.4 (2005): 135-138.
27. VANICKÝ, I. et al. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *Journal of Neurotrauma*, v.8, n.12, p.1399-1407, 2001.
28. MULLER-BORER, BJ, COLLINS MC, GUNST, PR, et al. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J. Nanobiotechnol.* 5, 9 (2007).
29. CARVALHO AM, YAMADA ALM, GOLIM M A, ÁLVAREZ LEC, HUSSNI CA, ALVES AL G. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine veterinary journal* 2013; 46: 635-38.
30. MALINA, T., POLÁKOVÁ, K., SKOPALÍK, J., MILOTOVÁ, V., HOLÁ, K., HAVRDOVÁ, M., ... ZBOŘIL, R. Carbon dots for in vivo fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Carbon*. v.152, p. 434-443, 2019.
31. WALCZAK, P.; ZHANG, J.; GILAD, A.A.; KEDZIOREK, D.A.; RUIZ-CABELLO, J.; YOUNG, R.G.; PITTENGER, M.F.; VAN ZIJL, P.C.M.; HUANG, J.; BULTE, J.W.M. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke* v.39, p. 1569–1574, 2008.