

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 24/07/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS SADIOS  
E PORTADORES DE SEQUELAS NEUROLÓGICAS

DANIELLE JAQUETA BARBERINI

Botucatu, São Paulo

Julho – 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS SADIOS  
E PORTADORES DE SEQUELAS NEUROLÓGICAS

DANIELLE JAQUETA BARBERINI

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins  
Amorim

Co-orientadora: Profa. Ass. Dra. Fernanda da  
Cruz Landim

Botucatu, São Paulo

Julho - 2017

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

Barberini, Danielle Jaqueta.

Avaliação do transplante intratecal de células tronco mesenquimais alogênicas em equinos sadios e portadores de sequelas neurológicas / Danielle Jaqueta Barberini. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Rogério Martins Amorim

Coorientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50501062

1. Cordão umbilical. 2. Tecido adiposo. 3. Transplante de células-tronco. 4. Líquido cefalorraquidiano. 5. Medula óssea. 6. Exploração por radioisótopos.

Palavras-chave: Cintigrafia; Cordão umbilical; Líquido cefalorraquidiano; Medula óssea; Tecido adiposo.

Nome do Autor: Danielle Jaqueta Barberini

Título: AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS SADIOS E PORTADORES DE SEQUELAS NEUROLÓGICAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ-UNESP- Botucatu

Dr. Leandro Maia

Membro

Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marimelia Aparecida Porcionatto

Membro

Departamento de Bioquímica

Escola Paulista de Medicina

Profa. Dra. Raquel Yvone Arantes Baccarin

Membro

Departamento de Clínica Médica

FMVZ - USP

Data da Defesa: 24 de julho de 2017.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao alicerce mais importante da vida...

À minha família:

Aos meus pais, Valdir e Claudete, e a minha irmã Fabiene, que dignamente me ensinaram a importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

Pelas horas sustentadas, pelas ausências durante a elaboração do projeto, que sem o apoio de todos não teria sido possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, por ter me orientado desde o Mestrado até o Doutorado, pela dedicação, atenção, incentivo e confiança prestados, possibilitando a concretização deste Trabalho.

A minha co-orientadora, Profa. Fernanda da Cruz Landim, por me socorrer nas horas de angústia com o projeto, e por abrir as portas do Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) possibilitando a realização do experimento.

A minha orientadora, Profa. Dra. Dori L. Borjesson (UC Davis, EUA), por ter aceitado me orientar sem me conhecer previamente, pelos ensinamentos, dedicação e confiança no meu trabalho.

Aos professores da UC Davis, Dra. Monica Aleman, Dr. Mathieu Spriet e Dr. Kevin Woolard pela disponibilidade prestada, auxílio e ensinamentos durante a execução deste Trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro com bolsa de Doutorado (2013/26931-0) e bolsa BEPE (2014/20550-8).

A Universidade da Califórnia, Davis, pela oportunidade em realizar parte deste Trabalho, por ceder suas instalações e serviços.

A família Haas e ao *Center for Equine Health* (CEH) por terem acreditado neste projeto e realizado auxílio financeiro, sem o qual grande parte não teria sido realizada.

A toda a equipe do *Regenerative Medicine Laboratory* (RML) da UC Davis-EUA, Naomi, Kasey, Amir, Emily, Fabio, pelos ensinamentos, companheirismo, ajuda, e por me acolherem tão bem quando estava tão longe de casa.

Aos amigos sempre presentes, de perto e de longe.

Aos meus pais, meu eterno agradecimento, pois sempre me incentivam e torcem pela minha vitória, onde quer que seja.

Aos colegas de trabalho, Denis, Diana e Maria, por madrugarem e me ajudarem nas etapas mais trabalhosas. E a toda equipe do laboratório LANÇA, pela amizade e trabalho.

Aos colegas veterinários, Marcelo Pyles e Bruno Passeti, pela indicação dos casos dos cavalos doentes.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ, pela atenção e carinho com que trataram os animais e sempre me ajudaram.

Ao Hospital Veterinário da UniFil – Londrina – PR, por ceder suas instalações e serviços para a realização de parte deste trabalho.

À FMVZ – UNESP, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação, por ceder suas instalações e serviços para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Sr. Alberto, da empresa ABLA® Import, pela cessão do aparelho de ultrassonografia Edan U50 Portable Ultrasound System VET.

*“Pensar é o trabalho mais difícil que existe. Talvez por isso tão poucos se dediquem a ele”.*

*(Henry Ford)*

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> – Estudos com células tronco em neurologia .....	9
<b>Quadro 2</b> - Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora.....	37

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Dados dos animais com sequelas de MEP.....	36
<b>Tabela 2</b> - Quantificação da persistência (%) no local de transplante ao longo do tempo .....	52
<b>Tabela 3</b> - Resumo dos achados do LCR pré e após (30 dias) o transplante intratecal de CTM-TA .....	53
<b>Tabela 4</b> - Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após os transplantes de CTM.....	55
<b>Tabela 5</b> - Resultados do LCR de equinos com sequelas de MEP antes e após os transplantes de CTM .....	59

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Imagem ultrassonográfica do espaço entre as vértebras C1-C2 utilizada para a coleta de LCR e o transplante de CTM em equinos, demonstrando a musculatura, ligamento amarelo, espaço subaracnóide e medula espinhal..... 34
- Figura 2** - Imunocitoquímica para GFAP,  $\beta$ -III tubulina, nestina e vimentina nas CTM-TA submetidas a três protocolos diferentes para a diferenciação neural.....41
- Figura 3** - Imunocitoquímica para GFAP,  $\beta$ -III tubulina, nestina e vimentina nas CTM-MO submetidas a três protocolos diferentes para a diferenciação neural.....42
- Figura 4** - Expressão dos marcadores neurais  $\beta$ -III tubulina, GFAP, MAP2 e S100 em CTM-CU através da técnica de imunocitoquímica 43
- Figura 5** - Expressão dos marcadores neurais  $\beta$ -III tubulina, GFAP, MAP2 e S100 em CTM-CU induzidas a neurodiferenciação com LCR, através da técnica de imunocitoquímica.....44
- Figura 6** – Médias percentuais de marcação das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU para marcadores de pluripotência e neurais pela técnica de citometria de fluxo ..... 45
- Figura 7** - Avaliação da expressão dos marcadores VEGF, VEGFR, PDGF e PDGFR em CTM-CU, MO e TA..... 46
- Figura 8** - Avaliação da proliferação de CTM-TA e CTM-MO em meio de cultura e co-incubadas com LCR ..... 47
- Figura 9** - Avaliação da secreção de TGF- $\beta$ , PGE2 e IL-6 das CTM-MO e CTM-TA após a co-incubação com LCR, com ou sem ativação com LPS. .... 48
- Figura 10** - Avaliação da migração celular pelo ensaio de invasão nas CTM-MO e CTM-TA cultivadas com LCR .....49
- Figura 11** - Imagens cintigráficas obtidas imediatamente após o transplante das CTM radiomarcadas pelas vias AO (A) e LS (B). ..... 50
- Figura 12** - Imagens cintigráficas obtidas 5 horas após o transplante das CTM radiomarcadas pelas vias AO (A-F) e LS (G-I)..... 51
- Figura 13** - Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora decorrente de MEP durante os diferentes momentos no período de tratamento com CTM-TA..... 58

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AO	atlanto-occipital
AVC	acidente vascular cerebral
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico
BME	$\beta$ -mercaptoetanol
CEH	Center for Equine Health
CTM	células tronco mesenquimais
CTM-CU	células tronco derivadas do cordão umbilical
CTM-MO	células tronco derivadas da medula óssea
CTM-TA	células tronco derivadas do tecido adiposo
CU	tecido do cordão umbilical
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGF	fator de crescimento epidérmico
EHV-1	herpesvírus tipo – 1
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
GC	grupo controle
GD	grupo doente
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GS	grupo sadio
GTCU	grupo tratado com células tronco derivadas do cordão umbilical
GTMO	grupo tratado com células tronco derivadas da medula óssea
GTTA	grupo tratado com células tronco derivadas do tecido adiposo
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
IA	intra-arterial
IDO	indoleamina 2,3- dioxigenase
IFI	imunofluorescência indireta
IL-6	interleucina 6
IT	intratecal
IV	intravenosa
LCR	líquido cefalorraquidiano

LPS	lipopolissacarídeo
LS	lombo-sacro
M0	momento 0 – antes do primeiro transplante
M30	momento 30 – antes do segundo transplante
M60	momento 60 – antes do terceiro transplante
M90	momento 90 – 30 dias após o terceiro transplante
MAP-2	proteína associada a microtúbulo 2
MEP	mieloencefalite equina por protozoário
MEVC	mielopatia estenótica vertebral cervical
MO	medula óssea
NGF	fator de crescimento nervoso
NO	óxido nítrico
NT-3	neurotrofina 3
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	prostaglandina E2
RML	Laboratório de Medicina Regenerativa (UCDavis)
SAG	antígenos de superfície
SCU	sangue do cordão umbilical
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
TA	tecido adiposo
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformador beta
Treg	células T regulatórias
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VFB	Vernau Flow Buffer
VMTH	Veterinary Medical Teaching Hospital - UCDavis
WB	Western Blot

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Características das células-tronco mesenquimais (CTM). .....	6
2.1.1. Terapia autóloga e alogênica .....	7
2.2. Utilização das CTM para o tratamento de lesões do SNC.....	8
2.2.1. Mecanismos de ação das CTM.....	12
2.2.2. Vias de aplicação .....	13
2.2.3. Fonte e doses. ....	14
2.3. Enfermidades neurológicas em equinos.....	15
2.3.1. Mieloencefalite equina por protozoário (MEP). ....	15
3. HIPÓTESES. ....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivos gerais.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
5.1. Delineamento experimental.....	20
5.2. Fase 1 .....	21
5.2.1. Células-tronco mesenquimais utilizadas .....	21
5.2.2. Líquido cefalorraquidiano (LCR). ....	21
5.2.3. Diferenciação neural .....	21
5.2.4. Caracterização por citometria de fluxo .....	24
5.2.5. Avaliação da expressão de fatores de crescimento .....	24
5.2.6. Co-incubação das CTM com LCR.....	24
5.2.6.1. Imunofenotipagem.....	25
5.2.6.2. Proliferação e viabilidade.....	26
5.2.6.3. Secreção das CTM.....	26
5.2.6.4. Migração das CTM .....	27
5.3. Fase 2 .....	28
5.3.1. Comparação entre as vias LS e AO para o transplante intratecal de CTM .....	28

	xiii
5.3.1.1. CTM utilizadas para o transplante .....	28
5.3.1.2. Coleta do LCR .....	29
5.3.1.3. Transplante das CTM .....	29
5.3.1.4. Rastreamento das CTM.....	30
5.3.1.4.1. Radiomarcção das CTM .....	30
5.3.1.4.2. Animais .....	31
5.3.1.4.3. Imagens de cintigrafia .....	31
5.3.1.4.4. Interpretação da cintigrafia.....	32
5.3.1.5. Acompanhamento dos animais .....	32
5.3.2. Segurança de transplantes intratecais sucessivos de CTM através do espaço C1-C2 em animais sadios.....	33
5.3.2.1. CTM utilizadas .....	33
5.3.2.2. Coleta do LCR e transplante de CTM.....	33
5.3.2.3. Acompanhamento dos animais. ....	35
5.3.3. Análise da eficácia do transplante das CTM em animais doentes.....	35
5.3.3.1. Seleção dos animais acometidos por sequelas de MEP...36	
5.3.3.2. Acompanhamento dos animais .....	37
5.4. Análise estatística .....	39
6. RESULTADOS .....	40
6.1. Fase 1 .....	40
6.1.1. Diferenciação neural .....	40
6.1.1.1. Imunocitoquímica .....	40
6.1.2. Citometria de fluxo para marcadores embrionários e neurais. ....	44
6.1.3. Imunocitoquímica para fatores de crescimento .....	45
6.1.4. Co-incubação com LCR .....	47
6.1.4.1. Imunofenotipagem.....	47
6.1.4.2. Proliferação e viabilidade.....	47
6.1.4.3. Secreção das CTM.....	47
6.1.4.4. Migração celular .....	49
6.2. Fase 2 .....	49
6.2.1. Comparação entre administração LS e AO.....	49
6.2.1.1. Transplante intratecal das CTM.....	49
6.2.1.2. Imagens de cintigrafia.....	50

	xiv
6.2.1.3. Acompanhamento clínico dos animais .....	52
6.2.2. Segurança do transplante intratecal de CTM através do espaço C1-C2 em animais sadios .....	53
6.2.3. Avaliação da eficácia do transplante intratecal de CTM através do espaço C1-C2 em animais com sequelas neurológicas de MEP ...	58
7. DISCUSSÃO.....	61
8. CONCLUSÕES GERAIS .....	67
BIBLIOGRAFIA .....	68
10 TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	83
Anexos.....	125

BARBERINI, D.J. **Avaliação do transplante intratecal de células tronco mesenquimais alogênicas em equinos sadios e portadores de sequelas neurológicas**. Botucatu, 2017. 201p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam propriedades antiinflamatórias, imunomoduladoras, neuroprotetoras e neuroregenerativas. Pela capacidade regenerativa limitada do tecido neural, o potencial terapêutico das células-tronco tem sido estudado em várias enfermidades do sistema nervoso central (SNC). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade, segurança e a resposta a transplantes intratecais sucessivos, de CTM provenientes de diversas fontes em equinos. Para isso, foram avaliados o potencial de transdiferenciação, terapêutico e o co-cultivo com líquido cefalorraquidiano (LCR) de CTM provenientes da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical. Posteriormente, as CTM foram utilizadas para o transplante por via intratecal (IT) pela cisterna lombo-sacra (LS), atlanto-occipital (AO) e entre as vértebras C1-C2 em animais sadios (GS), totalizando 3 aplicações com intervalo de 30 dias. Adicionalmente as CTM foram rastreadas por cintigrafia após os transplantes pelas via AO e LS. Finalmente, as CTM foram utilizadas para o transplante IT entre as vértebras C1-C2 em animais com incoordenação motora decorrente de Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP) – grupo doente (GD), sob o mesmo protocolo. Todos os animais (GS e GD) foram avaliados por exame clínico e neurológico, análise hematológica e do LCR antes e após os transplantes. Os resultados demonstraram que as CTM provenientes de diversas fontes apresentaram efeitos positivos na presença de LCR, é uma terapia segura e viável utilizando diferentes vias intratecais, com altas doses e sucessivos transplantes. Adicionalmente, o transplante IT através do espaço entre C1-C2 demonstrou ser mais viável para ser realizado a campo e em animais que apresentam sinais neurológicos. Finalmente, a terapia com CTM demonstrou efeitos benéficos para sequelas crônicas em medula espinhal decorrentes da MEP.

**Palavras-chave:** medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, cintigrafia, líquido cefalorraquidiano

BARBERINI, D.J. **Evaluation of intrathecal transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells into healthy and neurological sequelae horses.** Botucatu, 2017. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

### **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSC) have anti-inflammatory, immunomodulatory, neuroprotective and neuro-regenerative properties. Due to the limited regenerative capacity of neural tissue, the therapeutic potential of stem cells has been studied in several pathological conditions of the central nervous system (CNS). Therefore, the objective of this study was to evaluate the viability, safety and the response to successive intrathecal injections of MSC from different sources in horses. For that, the transdifferentiation, therapeutic potential and co-culture of MSC with cerebrospinal fluid (CSF) from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord were evaluated. Later, MSC were used for intrathecal (IT) transplantation through the lumbosacral cistern (LS), atlanto-occipital (AO) and between the C1-C2 vertebrae into healthy horses (HG), totalizing 3 injections between 30 days apart. Additionally, MSC tracking were performed after AO and LS transplantation. After this step, MSC were used for IT transplantation through the space between the C1-C2 vertebrae in horses with Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM) sequelae - sick group (SG) under the same protocol. All animals (HG and SH) were evaluated by serial clinical and neurological exams, hematological and CSF analysis before and after transplantation. The results demonstrated that MSC from several sources is a possibility of therapy for the CNS diseases, because their behavior in the presence of CSF have shown positive effects, it is a safe and viable therapy using different intrathecal routes, and safe even with high doses and successive transplants of MSC. In addition, IT transplantation between C1-C2 has been shown to be more feasible to be performed in the field and in animals with neurological signs. Finally, MSC therapy demonstrated beneficial effects for chronic sequelae in the spinal cord from EPM.

**Key words:** bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, scintigraphy, cerebrospinal fluid

## 1. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células estromais indiferenciadas caracterizadas por extensa capacidade proliferativa e potencial em se diferenciar em várias linhagens mesenquimais. Estudos com CTM estão em crescente avanço devido às suas propriedades imunomodulatórias, antiinflamatórias e de regeneração tecidual. As CTM são uma ferramenta promissora para o tratamento de inúmeras enfermidades devido à secreção de várias moléculas bioativas que levam a regeneração tecidual (CHAMBERLAIN et al., 2007; NÖTH et al., 2010; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; CARRADE et al., 2012; BURK et al., 2013).

O sistema nervoso central (SNC) possui uma limitada capacidade de regeneração. Sendo assim, as CTM estão sendo avaliadas como uma terapia celular para um grande número de condições neurológicas degenerativas e inflamatórias, e também para lesões neuronais agudas resultantes de trauma ou doença cerebrovascular. Estudos recentes tem demonstrado o potencial terapêutico das CTM em tratar enfermidades tais como Alzheimer, esclerose múltipla e lesões de medula espinhal, mostrando efeitos benéficos (LINDVALL; KOKAIA, 2006; MAZZINI et al., 2010; UCCELLI et al., 2011; COHEN, 2013; KARUSSIS; PETROU; KASSIS, 2013; HYATT et al., 2014; PENHA et al., 2014; CHENG et al., 2015).

Os mecanismos pelos quais as CTM induzem efeitos positivos no sistema nervoso ainda não estão completamente caracterizados. Alguns dos mecanismos que podem ter um papel importante na neuroregeneração e neuroproteção incluem as propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias das CTM, como a secreção de fatores de crescimento, anti-apoptóticos e neurotróficos, assim como de citocinas e proteínas de matriz extracelular (HU et al., 2005; PARR; TATOR; KEATING, 2007; MALTMAN; HARDY; PRZYBORSKI, 2011; UCCELLI et al., 2011; GLAVASKI-JOKSIMOVIC; BOHN, 2013; PAUL; ANISIMOV, 2013).

Há diversas enfermidades neurológicas que afetam os equinos e podem levar a sequelas neurológicas, sendo as mais comuns a mielopatia estenótica vertebral cervical (MEVC) e a mieloencefalite equina por protozoário (MEP)

(REED; GRANT; NOUT, 2008; DIRIKOLU; FOREMAN; TOBIN, 2013). A terapia com CTM detém uma grande promessa em mediar a inflamação neurológica e promover a neuroregeneração, portanto pode ser favorável para as doenças neurológicas de equinos onde a terapia convencional frequentemente não resulta na recuperação completa funcional destes animais.

Já se sabe que tanto as CTM autólogas quanto as alogênicas podem ser administradas seguramente em equinos (CARRADE et al., 2011a; CARRADE et al., 2011b; PIGOTT et al., 2013). As CTM alogênicas são ideais para o tratamento de lesões agudas onde o tempo para a expansão celular de CTM autólogas é uma limitação para a administração rápida das células. Adicionalmente, em indivíduos idosos o potencial terapêutico, de diferenciação e proliferação das CTM é reduzido (ALT et al., 2012).

Para se viabilizar a terapia celular na rotina clínica veterinária, além de pesquisas sobre o cultivo, vias de transplante e propriedades terapêuticas das CTM, faz-se necessário a criação de bancos de células para testes clínicos em pacientes. Nesse sentido, estudos com CTM alogênicas devem ser realizados para estabelecer a segurança desse tipo de transplante no SNC.

O transplante intratecal de CTM autólogas (MAIA et al., 2015) e, posteriormente, alogênicas pela cisterna magna (dados encaminhados para publicação), já foi realizado por esta equipe de pesquisa, com pequenas doses de CTM (1 milhão) e comprovou-se não haver reação imune imediata ou tardia com o protocolo utilizado. Porém, a necessidade de anestésiar o animal para realização desta técnica, muitas vezes dificulta ou até inviabiliza o procedimento em equinos apresentando ataxia e paresia. Diante disso, a técnica de transplante intratecal pela cisterna lombo-sacra ou através do espaço C1-C2, possui a vantagem de realização com o animal em posição quadrupedal, além de ser mais econômica, rápida e de maior exequibilidade na prática clínica a campo. Adicionalmente, a segurança do transplante de uma dose maior, compatível com equinos, deve ser comprovada. Visando o transplante para enfermidades do SNC, o maior conhecimento das características das CTM provenientes da medula óssea, tecido adiposo e da matriz do cordão umbilical, como morfologia, proliferação, viabilidade, imunofenotipagem, multipotencialidade, propriedades terapêuticas, permitirá definir qual é a melhor fonte de CTM para compor um banco de células com o

objetivo de realizar a terapia celular em equinos acometidos com sequelas de enfermidades neurológicas, como a mieloencefalite equina por protozoário.

## 252 REFERÊNCIAS

253

254 [1] Harris, V.K., Vyshkina, T. and Sadiq, S.A. (2016) Clinical safety of intrathecal  
255 administration of mesenchymal stromal cell-derived neural progenitors in multiple  
256 sclerosis. *Cytotherapy* **18**, 1476-1482.

257

258 [2] Yousefifard, M., Nasirinezhad, F., Shardi Manaheji, H., Janzadeh, A., Hosseini, M. and  
259 Keshavarz, M. (2016) Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived  
260 mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model.  
261 *Stem Cell Research & Therapy* **7**, 1-14.

262

263 [3] Cui, Y., Ma, S., Zhang, C., Cao, W., Liu, M., Li, D., Lv, P., Xing, Q., Qu, R., Yao, N., Yang, B.  
264 and Guan, F. (2017) Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation  
265 improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress  
266 and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research* **320**, 291-301.

267

268 [4] Cheng, Q., Zhang, Z., Zhang, S., Yang, H., Zhang, X., Pan, J., Weng, L., Sha, D., Zhu, M.,  
269 Hu, X. and Xu, Y. (2015) Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against  
270 ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation. In: *Brain*  
271 *Research*. pp 293-304.

272

273 [5] Rech, R. and Barros, C. (2015) Neurologic Diseases in Horses. *Veterinary Clinics of*  
274 *North America: Equine Practice* **31**, 281-306.

275

276 [6] Ardanaz, N., Vázquez, F.J., Romero, A., Remacha, A.R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera,  
277 B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I. and Rodellar, C.  
278 (2016) Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an  
279 equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of  
280 pooled allogeneic cells in healthy joints. In: *BMC veterinary research*. pp 1-9.

281

282 [7] Owens, S.D., Kol, A., Walker, N.J. and Borjesson, D.L. (2016) Allogeneic Mesenchymal  
283 Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Stem Cells International*  
284 **2016**, 8.

285

286 [8] Kol, A., Arzi, B., Athanasiou, K.A., Farmer, D.L., Nolta, J.A., Rebhun, R.B., Chen, X.,  
287 Griffiths, L.G., Verstraete, F.J.M., Murphy, C.J. and Borjesson, D.L. (2015) Companion  
288 animals: Translational scientist's new best friends. *Science Translational Medicine* **7**,  
289 308ps321-308ps321.

290

291 [9] Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y. and Hu, D. (2015) The  
292 challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based  
293 therapy. *Stem Cell Research & Therapy* **6**, 234.

294

- 295 [10] Alt, E.U., Senst, C., Murthy, S.N., Slakey, D.P., Dupin, C.L., Chaffin, A.E., Kadowitz, P.J.  
296 and Izadpanah, R. (2012) Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell  
297 properties. In: *Stem Cell Research*. pp 215-225.
- 298
- 299 [11] Stavely, R., Robinson, A.M., Miller, S., Boyd, R., Sakkal, S. and Nurgali, K. (2015)  
300 Allogeneic guinea pig mesenchymal stem cells ameliorate neurological changes in  
301 experimental colitis. In: *Stem Cell Research & Therapy*. pp 1-21.
- 302
- 303 [12] Villanova, M. and Bach, J.R. (2015) Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy  
304 Outcomes for Three Patients with Spinal Muscular Atrophy Type 1. *American Journal*  
305 *of Physical Medicine & Rehabilitation* **94**, 410-415.
- 306
- 307 [13] Windt, T.S.d., Vonk, L.A., Slaper-Cortenbach, I.C.M., Nizak, R., Rijen, M.H.P.v. and Saris,  
308 D.B.F. (2017) Allogeneic MSCs and Recycled Autologous Chondrons Mixed in a One-  
309 Stage Cartilage Cell Transplantation: A First-in-Man Trial in 35 Patients. *STEM CELLS*.
- 310
- 311 [14] Barberini, D.J., Freitas, N.P.P., Magnoni, M.S., Maia, L., Listoni, A.J. and Heckler, M.C.  
312 (2014) Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and  
313 umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem*  
314 *Cell Res Ther* **5**.
- 315
- 316 [15] Pease, A., Behan, A. and Bohart, G. (2012) ULTRASOUND-GUIDED CERVICAL CENTESIS  
317 TO OBTAIN CEREBROSPINAL FLUID IN THE STANDING HORSE. *Veterinary Radiology &*  
318 *Ultrasound* **53**, 92-95.
- 319
- 320 [16] Harris, V.K., Yan, Q.J., Vyshkina, T., Sahabi, S., Liu, X. and Sadiq, S.A. (2012) Clinical and  
321 pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural  
322 progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological*  
323 *Sciences* **313**, 167-177.
- 324
- 325 [17] Jarocho, D., Milczarek, O., Wedrychowicz, A., Kwiatkowski, S. and Majka, M. (2015)  
326 Continuous Improvement After Multiple Mesenchymal Stem Cell Transplantations in a  
327 Patient With Complete Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation* **24**, 661-672.
- 328
- 329 [18] Borjesson, D.L. and Peroni, J.F. (2011) The Regenerative Medicine Laboratory:  
330 Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. In: *Clinics in Laboratory Medicine*. pp  
331 109-123.
- 332
- 333 [19] Hofer, H.R. and Tuan, R.S. (2016) Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells  
334 support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther* **7**, 131.
- 335
- 336 [20] Morigi, M., Introna, M., Imberti, B., Corna, D. and Abbate, M. (2008) Human bone  
337 marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong  
338 survival in mice. *Stem Cells* **26**.

- 339  
340 [21] Drela, K., Lech, W., Figiel-Dabrowska, A., Zychowicz, M., Mikula, M., Sarnowska, A. and  
341 Domanska-Janik, K. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's  
342 Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow  
343 mesenchymal stem cells culture. In: *Cytotherapy*, Elsevier. pp497-509.
- 344  
345 [22] Chung, H.J., Chung, W.H., Lee, J.H., Chung, D.J., Yang, W.J., Lee, A.J., Choi, C.B., Chang,  
346 H.S., Kim, D.H., Suh, H.J., Lee, D.H., Hwang, S.H., Do, S.H. and Kim, H.Y. (2016)  
347 Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of  
348 human-umbilical cord blood stem cells in rats. *Journal of veterinary science* **17**,97-102.
- 349  
350 [23] Du, W.J., Chi, Y., Yang, Z.X., Li, Z.J., Cui, J.J., Song, B.Q., Li, X., Yang, S.G., Han, Z.B. and  
351 Han, Z.C. (2016) Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells  
352 derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell*  
353 *Research & Therapy* **7**, 163.
- 354  
355 [24] Díez-Tejedor, E., Gutiérrez-Fernández, M., Martínez-Sánchez, P., Rodríguez-Frutos, B.,  
356 Ruiz-Ares, G. and Lara, M.L. (2014) Reparative therapy for acute ischemic stroke with  
357 allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase II  
358 randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *J Stroke*  
359 *Cerebrovasc Dis* **23**.
- 360  
361 [25] Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Wang, J., Han, Z. and Sun, L. (2009) Allogeneic  
362 mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Multiple*  
363 *Sclerosis* **15**, 644-646.
- 364  
365 [26] Yang, W.-Z., Zhang, Y., Wu, F., Min, W.-P., Minev, B., Zhang, M., Luo, X.-L., Ramos, F.,  
366 Ichim, T.E., Riordan, N.H. and Hu, X. (2010) Safety evaluation of allogeneic umbilical  
367 cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. In: *Journal of*  
368 *Translational Medicine*, BioMed Central. pp 75-75.
- 369  
370 [27] Piltti, K.M., Avakian, S.N., Funes, G.M., Hu, A., Uchida, N., Anderson, A.J. and  
371 Cummings, B.J. (2015) Transplantation dose alters the dynamics of human neural stem  
372 cell engraftment, proliferation and migration after spinal cord injury. In: *Stem Cell*  
373 *Research*. pp 341-353.
- 374  
375 [28] Maia, L., da Cruz Landim-Alvarenga, F., Taffarel, M.O., de Moraes, C.N., Machado, G.F.,  
376 Melo, G.D. and Amorim, R.M. (2015) Feasibility and safety of intrathecal  
377 transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC*  
378 *veterinary research* **11**, 63.
- 379  
380 [29] Cook, J.R., Jr. and DeNicola, D.B. (1988) Cerebrospinal fluid. *The Veterinary clinics of*  
381 *North America. Small animal practice* **18**, 475-499.
- 382

- 383 [30] Alanen, A., Pira, U., Lassila, O., Roth, J. and Franklin, R.M. (1985) Mott cells are plasma  
384 cells defective in immunoglobulin secretion. *European journal of immunology* **15**, 235-  
385 242.
- 386
- 387 [31] Danielyan, L., Schäfer, R., von Ameln-Mayerhofer, A., Buadze, M., Geisler, J., Klopfer,  
388 T., Burkhardt, U., Proksch, B., Verleysdonk, S., Ayturan, M., Buniatian, G.H., Gleiter,  
389 C.H. and Frey Ii, W.H. (2009) Intranasal delivery of cells to the brain. *European Journal*  
390 *of Cell Biology* **88**, 315-324.
- 391
- 392 [32] Zeira, O., Asiag, N., Aralla, M., Ghezzi, E., Pettinari, L., Martinelli, L., Zahirpour, D.,  
393 Dumas, M.P., Lupi, D., Scaccia, S., Konar, M. and Cantile, C. (2015) Adult autologous  
394 mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory  
395 diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary  
396 clinical findings. *Journal of Neuroinflammation* **12**, 1-11.
- 397
- 398 [33] Fabian, C., Naaldijk, Y., Leovsky, C., Johnson, A.A., Rudolph, L., Jaeger, C., Arnold, K.  
399 and Stolzing, A. (2017) Distribution pattern following systemic mesenchymal stem cell  
400 injection depends on the age of the recipient and neuronal health. *Stem Cell Research*  
401 *& Therapy* **8**, 85.
- 402
- 403 [34] Leibacher, J. and Henschler, R. (2016) Biodistribution, migration and homing of  
404 systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. In: *Stem Cell Research &*  
405 *Therapy*. pp 1-12.
- 406
- 407