

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^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. 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

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos animais com sequelas de MEP	36
Tabela 2 - Quantificação da persistência (%) no local de transplante ao longo do tempo.....	52
Tabela 3 - Resumo dos achados do LCR pré e após (30 dias) o transplante intratecal de CTM-TA.....	53
Tabela 4 - Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após os transplantes de CTM.....	55
Tabela 5 - 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, β -III tubulina, nestina e vimentina nas CTM-TA submetidas a três protocolos diferentes para a diferenciação neural.....41
- Figura 3** - Imunocitoquímica para GFAP, β -III tubulina, nestina e vimentina nas CTM-MO submetidas a três protocolos diferentes para a diferenciação neural.....42
- Figura 4** - Expressão dos marcadores neurais β -III tubulina, GFAP, MAP2 e S100 em CTM-CU através da técnica de imunocitoquímica.....43
- Figura 5** - Expressão dos marcadores neurais β -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- β , 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 LCR49
- 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	β -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- β	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
RESUMO	1
ABSTRACT	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

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

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 neurorregenerativas. 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 neurorregeneração 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características das células-tronco mesenquimais (CTM)

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células progenitoras multipotentes, não hematopoiéticas, facilmente isoladas a partir de diversos tecidos adultos, e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa e de diferenciação *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais em resposta a um estímulo apropriado, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos e miócitos (CHAMBERLAIN et al., 2007; NIXON et al., 2008; NÖTH et al., 2010).

Estas células possuem efeitos imunomodulatórios no sistema imune regulados pelo seu microambiente e sinais parácrinos. As CTM interagem com neutrófilos, linfócitos B e T, células *natural killers*, mastócitos, células dendríticas, monócitos e macrófagos para realizar a imunomodulação (LE BLANC; DAVIES, 2015). Adicionalmente possuem efeitos imunomodulatórios e secretam moléculas de adesão que inibem a formação de tecido cicatricial, secretam fatores tróficos que inibem apoptose, aumentam angiogênese e estimulam células progenitora intrínsecas para regenerar a função tecidual (BORJESSON; PERONI, 2011; HOFER; TUAN, 2016; SPEES; LEE; GREGORY, 2016).

Para a caracterização imunofenotípica das CTM em equinos, a aderência ao plástico, a diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, a expressão dos marcadores CD90, CD44, CD105, CD29, e a não expressão dos marcadores CD34, CD14, CD79 α e MHC-II, são as propriedades disponíveis mais confiáveis para a caracterização das CTM equinas (CARVALHO et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2012; BARBERINI et al., 2014).

Diversas fontes podem ser utilizadas para obtenção de CTM, como sangue do cordão umbilical (SCU) (BARTHOLOMEW et al., 2009), tecido adiposo (TA) (MAMBELLI et al., 2009; CARVALHO et al., 2011), medula óssea (MO) (BOURZAC et al., 2010; RANERA et al., 2011; MAIA et al., 2013), tecido do cordão umbilical (CU) (HOYNOWSKI et al., 2007), membrana amniótica (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; CAMPOS et al., 2017), sangue

periférico (KOERNER et al., 2006) e tendão (BURK et al., 2013). Sendo que, a medula óssea e o tecido adiposo são as fontes mais comuns de obtenção de CTM em equinos (KOERNER et al., 2006; RICHARDSON et al., 2007; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011).

2.1.1. Terapia autóloga e alogênica

Normalmente, as CTM são obtidas dos próprios pacientes (autólogas) (RICHARDSON et al., 2007), porém sua utilização para o tratamento possui algumas limitações: como a dificuldade de obter CTM suficientes de alguns pacientes (por exemplo, TA de pacientes magros ou MO de pacientes com mielofibrose); em pacientes idosos, pois há uma diminuição na quantidade, na proliferação, no potencial de diferenciação e no potencial regenerativo das CTM proporcionalmente à idade; algumas doenças sistêmicas alteram as propriedades intrínsecas das CTM, prejudicando sua função protetora (como diabetes, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico); além disso, o cultivo de CTM autólogas é mais demorado, dificultando a sua utilização para tratar enfermidades agudas, como por exemplo, acidente vascular cerebral (AVC) e infarto do miocárdio. Em contraste, as CTM alogênicas (provenientes de um doador) estão prontamente disponíveis e podem ser administradas imediatamente. Além disso, a produção comercial de CTM alogênicas deve garantir o controle de qualidade e reduzir o custo das terapias celulares (BORJESSON; PERONI, 2011; CARRADE et al., 2011a; CARRADE et al., 2011b; PERONI; BORJESSON, 2011; ALT et al., 2012; BURK et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

Estudos realizados em diversas espécies demonstram que o uso alogênico (provenientes de um doador) de CTM para aplicações clínicas é possível, indiferentemente do tecido de origem, pois estas células possuem baixa imunogenicidade *in vitro*, e podem escapar do processo normal de reconhecimento de aloantígenos (RYAN et al., 2005; BORJESSON; PERONI, 2011; CARRADE et al., 2011a; SOLE et al., 2012a; BARBERINI et al., 2014; ZHANG et al., 2015). No entanto, as CTM não são totalmente imunoprivilegiadas, porém o sistema imune não consegue eliminá-las

imediatamente, e assim as CTM sobrevivem por um curto período, não sendo efetivas em longo prazo (ZHANG et al., 2015).

Vários estudos tem demonstrado a segurança da aplicação intratecal com CTM autólogas em diversas espécies, como coelho (CHEN et al., 2014), cavalo (MAIA et al., 2015), humanos (HARRIS; VYSHKINA; SADIQ, 2016; NAFISSI et al., 2016; SATTI et al., 2016), cão (ZEIRA et al., 2015); e alogênicas em humanos (LIANG et al., 2009; VILLANOVA; BACH, 2015), mostrando efeitos benéficos.

No entanto, um relato do caso de uma mulher de 27 anos de idade com mielite transversa aguda, demonstrou um episódio de encefalite e neurite óptica, seguido da doença desmielinizante encefalomielite disseminada aguda após transplantes de CTM provenientes da medula óssea (KISHK; ABOKRYSHA; GABR, 2013). Outro relato de caso, de um homem de 66 anos de idade que sofreu múltiplas infusões comerciais de células-tronco (alogênicas, embrionárias e mesenquimais) demonstrou o desenvolvimento de uma neoplasia altamente proliferativa, resultante da administração de células-tronco pluripotentes (SAAD et al., 2016).

2.2. Utilização das CTM para o tratamento de lesões do SNC

As CTM representam uma terapia promissora para o tratamento de doenças neurológicas intratáveis, dada a possibilidade de interferir na neurodegeneração direta e indiretamente, através do seu potente efeito imunomodulador (LARONI; ROSBO; UCCELLI, 2015).

Lesões nervosas são particularmente incapacitantes, tanto para a espécie humana como nos animais domésticos, sendo assim, vários distúrbios neurológicos têm levantado interesse particular para a terapia celular e tem sido estudados em modelos experimentais e clínicos (Quadro 1), tais como a doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e lesões da medula espinal, mostrando efeitos benéficos (LINDVALL; KOKAIA, 2006; COHEN, 2013; KARUSSIS; PETROU; KASSIS, 2013).

QUADRO 1
Estudos com células tronco em neurologia

(continua)

Espécie	Doença	Administração	Resultado	Referência
rato	Trauma cerebral	2×10^6 Cisterna magna CTM-MO	CTM se diferenciaram em células neurais e houve melhora no comportamento	(HU; ZHOU; ZHU, 2004)
rato	Lesão medula espinhal (T9)	3×10^5 Local CTM-MO	Redução da lesão e aumento do crescimento axonal	(GU et al., 2010)
rato	Lesão medula espinhal (T8/T9)	1×10^6 no local (T8/T9) CTM-MO e bulbo olfatório	Melhora no comportamento e histologia	(YAZDANI et al., 2012)
rato	Acidente vascular encefálico	2×10^6 Intravenoso CTM-MO e CTM-TA	Boa recuperação funcional, redução da morte celular, aumento da proliferação celular, sinaptogênese e angiogênese	(GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013)
rato	Lesão medula espinhal (T9)	2×10^5 Local CTM-MO e CTM-TA	Aumento de BDNF, angiogênese, axônio, redução na formação de lesão cavitária e melhora da recuperação funcional	(ZHOU et al., 2013)
camundongo	Encefalomielite autoimune (EAE) e Esclerose múltipla	2×10^4 ; 5×10^4 ; 2×10^5 ; 1×10^6 Intratecal pela cisterna magna CTM-MO	Melhora na função neurológica após várias aplicações	(HARRIS et al., 2012)

QUADRO 1
Estudos com células tronco em neurologia

(continuação)

Espécie	Doença	Administração	Resultado	Referência
cão	Degeneração de disco (L3-L6)	1×10^6 Local CTM-MO	Regeneração dos discos	(HIYAMA et al., 2008)
cão	Lesão medula espinhal (T13-L1)	1×10^7 Intratecal pela medula lombar CTM-MO	Melhora nos sinais neurológicos, RM e histopatologia	(JUNG et al., 2009)
cão	Lesão medula espinhal (L2-L3)	1×10^6 Local L1-L4 CTM sangue do CU	Melhora na remielinização	(LEE et al., 2011)
cão	Lesão medula espinhal (lombar e torácica)	$1 \times 10^6/\text{cm}^3$ local CTM-MO	Recuperação da propriocepção, moderada melhora na função intestinal e vesical	(PENHA et al., 2014)
coelho	Trauma cerebral	2×10^6 Intratecal lombar e intravenosa CTM-MO	Melhora na disfunção motora	(LIU et al., 2008)
humano	Acidente vascular encefálico	5×10^7 Intravenoso CTM-MO	Seguro	(LEE et al., 2010)
humano	Esclerose lateral amiotrófica	75×10^6 Medula espinhal CTM-MO	Seguro	(MAZZINI et al., 2010)

QUADRO 1

Estudos com células tronco em neurologia

(conclusão)

Espécie	Doença	Administração	Resultado	Referência
humano	Condições degenerativas (atrofia múltipla sistêmica, ataxia, paraplegia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica)	$1-3 \times 10^7$ Intratecal lombar + intravenoso CTM sangue do CU	Sem efeitos colaterais	(YANG et al., 2010)
humano	Lesão medula espinhal (completa e crônica)	20×10^6 Ao redor da lesão CTM-MO	Melhora na função neurológica	(DAI et al., 2013)
humano	Lesão medula espinhal (completa e incompleta)	$1 \times 10^6/\text{kg}$ Intratecal lombar CTM-CU	Seguro e pode melhorar a função neurológica e qualidade de vida nas lesões incompletas	(LIU et al., 2013)
humano	Sequela de trauma cerebral	1×10^7 Intratecal lombar	Melhora na função neurológica	(WANG et al., 2013)

Levando em consideração estes diversos estudos com inúmeras espécies demonstrando eficácia e segurança, diversas enfermidades neurológicas em equinos também poderiam ser tratadas com a utilização de CTM devido suas propriedades antiinflamatórias, imunomodulatórias e regenerativas, como mielopatias degenerativas, mielopatia estenótica vertebral cervical (MEVC), leucoencefalomalácia, polirradiculoneurite equina e sequelas de enfermidades inflamatórias como MEP e herpesvírus (EHV-1). Contudo, não há estudos neste sentido até o momento.

2.2.1 Mecanismos de ação das CTM

As CTM possuem um potencial terapêutico enorme para enfermidades neurológicas, devido aos seus efeitos imunomodulatórios, relacionado com a secreção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento transformador beta ($TGF\beta$), prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico (NO), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucina 6 (IL-6) (CARRADE; BORJESSON, 2013; KOTA et al., 2017), antiinflamatórios e de neuroproteção (RAVANIDIS et al., 2015; ROBINSON et al., 2017). Promovem o crescimento neuronal endógeno, diminuem a apoptose, reduzem os níveis de radicais livres, incentivam a conexão sináptica de neurônios danificados e regulam a inflamação, principalmente através de ações parácrinas (JOYCE et al., 2010; KARUSSIS; PETROU; KASSIS, 2013; AL DELFI et al., 2016). A secreção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento nervoso (NGF) e neurotrofina 3 (NT-3) são importantes efeitos terapêuticos das CTM que promovem neurogênese e conexões sinápticas (SONG et al., 2015; CHUNG et al., 2016).

Foram relatadas que as células T reguladoras (Treg) possuem um papel importante além da imunomodulação, elas também promovem a diferenciação de oligodendrócitos e a (re) mielinização (DOMBROWSKI et al., 2017), uma descoberta importante visto que as CTM agem estimulando as células Treg (LU et al., 2013; MELIEF et al., 2013).

Existem evidências de que as CTM transplantadas no SNC migram para a área lesada, como áreas de hipóxia, apoptóticas, inflamadas, degeneradas e

se diferenciam em células neurais, melhorando a função neurológica (CHEN et al., 2001; LEE et al., 2003; YANO et al., 2005; VAQUERO et al., 2006; LIU et al., 2008; PAUL; ANISIMOV, 2013). Embora a diferenciação das CTM em células da linhagem neural não seja o fator principal na recuperação funcional após uma lesão cerebral ou medular (PARR; TATOR; KEATING, 2007; MALTMAN; HARDY; PRZYBORSKI, 2011), uma abordagem interessante seria a transdiferenciação das CTM antes do transplante, aumentando assim o benefício terapêutico do tratamento, contribuindo para a remielinização de axônios lesados e, assim, na recuperação funcional da medula espinhal (CHELLUBOINA; DINH; VEERAVALLI, 2015).

2.2.2 Vias de aplicação

Diversas vias de aplicação de CTM tem sido utilizadas para atingir o SNC, dentre elas a via intravenosa (IV), intra-arterial (IA) e intratecal (IT).

Em comparação com a administração sistêmica, as vias de administração tópica (local, intralesional) possuem a vantagem de que as CTM chegam diretamente ao tecido alvo com pouca perda durante a migração. As CTM administradas por via intravenosa são mais facilmente presas em pequenos capilares pulmonares por causa de seu tamanho e expressão de moléculas de adesão celular, este aprisionamento pulmonar diminui o número de células entregues aos tecidos alvo e pode resultar em um tratamento ineficaz (ZHANG et al., 2015).

A distribuição das CTM após a aplicação sistêmica intravenosa em camundongos demonstrou que em animais jovens as CTM migraram para os pulmões, linfonodos axilares, sangue, rim, medula óssea, baço, fígado, coração e córtex cerebral; em animais idosos, somente no córtex cerebral. E utilizando CTM oriundas de animais idosos, a biodistribuição foi apenas em baço e sangue. O transplante em animais doentes (doença de Alzheimer APP / PS1) teve uma distribuição neuronal grande no cérebro, sendo encontradas no córtex, cerebelo, hipocampo, bulbo olfatório e tronco encefálico; além de fígado, medula óssea e pulmão. Portanto, o envelhecimento do receptor e das CTM afeta drasticamente a eficiência do transplante e da migração pós-transplante (FABIAN et al., 2017).

Outro trabalho comparando as vias intratecal + intra-arterial e intratecal + intravenosa demonstrou que os transplantes pela via intratecal + intra-arterial possuem maior possibilidade de atingir o SNC do que a via intravenosa, induzindo efeitos neurotróficos e neuroprotetores (ZEIRA et al., 2015).

Comparando as vias intraespinal (centro da lesão) e intratecal (espaço subaracnóide), este trabalho demonstrou que as CTM transplantadas via intraespinal podem promover a regeneração em longo prazo, enquanto que as CTM transplantadas pela via intratecal possuem efeito através do mecanismo parácrino, que não exige que as células estejam presentes no tecido (AMEMORI et al., 2015).

Em um modelo de trauma cerebral, foram comparadas as vias intratecal lombar e intravenosa, sendo que a intratecal demonstrou resultados mais eficientes (LIU et al., 2008). Outros trabalhos recentes também utilizam a via intratecal (HARRIS; VYSHKINA; SADIQ, 2016; VAQUERO et al., 2017).

2.2.3 Fonte e doses

Ainda não se sabe a melhor fonte ou dose para se utilizar na terapia celular visando efeitos benéficos no sistema nervoso.

Um estudo em pacientes com esclerose múltipla utilizou CTM derivadas da medula óssea (CTM-MO), e foram realizadas entre 2 e 5 transplantes pela via intratecal de doses crescentes. Com base na escala progressiva da dose, uma dose final de 2-10 milhões de células a cada 3 meses foi bem tolerada sem eventos adversos significativos (HARRIS; VYSHKINA; SADIQ, 2016).

No entanto, outro estudo com CTM-MO em camundongos como modelo de esclerose múltipla, demonstrou que três aplicações pela via intratecal com intervalo de uma semana resultaram em melhora significativa dos sintomas da doença em comparação com uma única aplicação (HARRIS et al., 2012).

Para lesão em medula espinal, um estudo com CTM-MO em humano utilizou cinco transplantes a cada 3-4 meses pela via intratecal lombar, demonstrando melhoras clínicas significativas (JAROCHA et al., 2015).

Em cães, foi utilizada uma única aplicação de CTM-MO na dose de 2 milhões de células via intratecal, 4 milhões via intra-arterial e de 500 mil células/kg via intravenosa para meningoencefalomielite de causa

desconhecida. Todos os cães apresentaram melhora em suas condições gerais e neurológicas, com efeito especial na dor cervical (ZEIRA et al., 2015).

Há ainda estudos com fontes de tecidos fetais, como Geléia de Wharton, relatando ser melhor que CTM-MO *in vitro* (DRELA et al., 2013), e sangue do cordão umbilical (CHUNG et al., 2016), este último indicando o início do tratamento com 3 dias após a lesão na medula espinhal em ratos, e indicando que um transplante adicional após 3 semanas poderiam induzir maiores efeitos protetores. Em camundongos, foi utilizado CTM-CU na dose de 2 milhões de células pela via intravenosa para um modelo de doença de Alzheimer, demonstrando efeitos benéficos (CUI et al., 2017).

Em equinos foi utilizado CTM-MO para um estudo de segurança do transplante pela via intratecal através do espaço atlanto-occipital, na dose de 1 milhão de células por animal em uma única aplicação (MAIA et al., 2015).

2.3. Enfermidades neurológicas em equinos

As doenças neurológicas são muitas vezes fatais e são uma das razões mais comuns para a eutanásia em cavalos (RECH; BARROS, 2015). Diversas enfermidades podem acometer os equinos, como a leucoencefalomalácia, mieloencefalite equina por protozoário (MEP), mielopatia estenótica vertebral cervical (MEVC), doença do neurônio motor, Herpesvírus tipo 1 (EHV-1) entre outras, que muitas vezes não possuem um tratamento efetivo, e mesmo quando há tratamento muitos animais permanecem com sequelas neurológicas. Escolhemos tratar animais com sequelas neurológicas de MEP, visto que esta é uma enfermidade muito comum no Brasil e que gera inúmeros prejuízos na indústria equina (PEIXOTO et al., 2003; STELMANN; AMORIM, 2010; LINS; FEIJÓ; NOGUEIRA, 2014).

2.3.1 Mieloencefalite equina por protozoário (MEP)

A mieloencefalite equina por protozoário equina (MEP) é uma síndrome neurológica que acomete o sistema nervoso central dos equinos, sendo causada pelos protozoários *Sarcocystis neurona* e *Neospora hughesi* (DUBEY et al., 2001; HOWE; MACKAY; REED, 2014; PUSTERLA et al., 2014). É uma

doença infecciosa não contagiosa, endêmica nas Américas, tendo os equinos como hospedeiros acidentais, sendo de grande importância econômica (WITONSKY et al., 2008; DIRIKOLU; FOREMAN; TOBIN, 2013; REED et al., 2016).

A MEP induz lesões multifocais inflamatórias no SNC, e os sinais clínicos podem ser agudos ou crônicos e desenvolvem-se de acordo com o local anatômico da infecção. Normalmente, há manifestações assimétricas da medula espinhal, atrofia muscular, ataxia, disfagia, fraqueza muscular, tropeço e inclinação da cabeça (DUBEY et al., 2001; DUBEY et al., 2015; REED et al., 2016). As lesões macroscópicas aparecem como focos necróticos vermelhos descoloridos (hemorrágicos), as lesões microscópicas afetam tanto a substância cinzenta quanto a branca com necrose, hemorragia e reação inflamatória consistindo de linfócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e algumas células gigantes multinucleadas. Os merozoítos intracelulares podem ser observados em neurônios, células gigantes, neutrófilos ou macrófagos ou extracelularmente em cistos dentro do neurópilo (RECH; BARROS, 2015).

Nas últimas duas décadas diversos testes sorológicos tornaram-se disponíveis para ajudar no diagnóstico de MEP causada por *S. neurona*, incluindo Western blot (WB), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de antígenos de superfície (SAG). Todos podem ser realizados no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) e nenhum é considerado o padrão ouro. A sensibilidade e especificidade de cada método, respectivamente, são de aproximadamente 89% e 80% para WB, 92% e 99% para RIFI, 88% e 96% para SAG ELISA (REED et al., 2016).

Para o tratamento da MEP, recomenda-se terapia com fármaco anticoccidiano (ponazuril, diclazuril ou sulfadiazina e pirimetamina) por tempo prolongado, sendo no mínimo de 28 dias, porém a maioria dos cavalos com MEP são tratados por um período de 6-8 semanas ou mais, dependendo da resposta clínica (DUBEY et al., 2015; REED et al., 2016).

Um estudo mostrou que 65,2% dos cavalos com MEP que foram tratados melhoraram após o tratamento. A maioria dos animais com déficits neurológicos leves (74,1%) melhoraram após o tratamento, ao passo que um número menor de cavalos com moderado (57,8%) ou grave (50%) déficits neurológicos melhoraram após o tratamento (SAVILLE et al., 2000). Os cavalos

podem apresentar recidiva clínica da MEP, mesmo após tratamento prolongado, com sinais clínicos semelhantes ao primeiro episódio. A causa desta recidiva ainda é desconhecida (DUBEY et al., 2015).

3. HIPÓTESES

- As CTM provenientes do cordão umbilical (CU) possuem maior expressão *in vitro* de marcadores de linhagens neurais do que as CTM provenientes da medula óssea (MO) e tecido adiposo (TA)
- As CTM-MO, TA e CU expressam fatores de crescimento (VEGF e PDGF) *in vitro*
- A incubação das CTM-MO, TA e CU com líquido cefalorraquidiano (LCR) de cavalos sadios promoverá a ativação, proliferação e imunomodulação das CTM *in vitro*
- As CTM se difundem pelo espaço subaracnóideo ao longo da medula espinhal após a administração lombo-sacra (LS) e atlanto-occipital (AO) em animais sadios
- O transplante intratecal de CTM pelas vias AO, LS e entre as vértebras C1-C2 é viável e seguro
- Sucessivos transplantes intratecal, de altas doses de CTM é seguro em cavalos sadios e acometidos por mieloencefalite equina por protozoário (MEP)
- O tratamento com CTM pela via intratecal resultará em melhora clínica dos animais acometidos por sequela de mieloencefalite equina por protozoário (MEP)

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

Avaliar a viabilidade, segurança e eficácia de três transplantes sucessivos pela via intratecal de células-tronco mesenquimais alogênicas provenientes da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de expressão de marcadores neurais *in vitro* das CTM provenientes da medula óssea (CTM-MO), tecido adiposo (CTM-TA) e do cordão umbilical (CTM-CU)
- Avaliar a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) e seu receptor (VEGF-R), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e seu receptor (PDGF-R) das CTM provenientes da medula óssea, tecido adiposo e do cordão umbilical *in vitro*
- Determinar se o líquido cefalorraquidiano (LCR) de cavalos induz a ativação, proliferação e imunomodulação das CTM *in vitro*
- Determinar se as CTM se distribuem pelo espaço subaracnóide após a administração via lombo-sacra (LS) e atlanto-occipital (AO) em cavalos saudáveis, através da técnica de cintigrafia
- Avaliar por meio de exame neurológico seriado e pela análise do LCR (físico-químico e citológico) a viabilidade e a segurança dos protocolos de transplante propostos pelas vias LS, AO e entre as vértebras C1-C2
- Avaliar a eficácia clínica do tratamento com CTM pela via intratecal em animais acometidos por seqüela de mieloencefalite equina por protozoário (MEP).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu sob o protocolo nº 161/2014 – CEUA e pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da Universidade da Califórnia – Davis – EUA (UC Davis), sob o protocolo nº 18385.

O experimento foi conduzido em três fases.

A fase 1 consistiu na avaliação *in vitro* das CTM de equinos. Uma parte foi realizada na UC Davis, visando o potencial das CTM-MO e CTM-TA para neurodiferenciação e seu comportamento após incubação com LCR quanto à imunofenotipagem, migração, secreção, proliferação e viabilidade. Adicionalmente, na UNESP-Botucatu foi realizada a caracterização das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU por citometria de fluxo utilizando-se marcadores neurais e de pluripotência. Também foi realizada a avaliação do potencial de neurodiferenciação das CTM-CU e a avaliação da expressão de fatores de crescimento das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU.

Para a fase 2, foram realizados estudos *in vivo* com equinos saudáveis (grupo sadios) visando à viabilidade e segurança do transplante de CTM alogênicas no SNC. A parte realizada na UC Davis consistiu do transplante de CTM-TA alogênicas por via intratecal pela cisterna lombo-sacra (LS) e atlanto-occipital (AO), sendo as CTM rastreadas após o transplante com o auxílio da cintigrafia. Na UNESP-Botucatu as CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU alogênicas foram utilizadas para o transplante intratecal entre as vértebras C1-C2.

Já para a fase 3, estudo *in vivo* realizado na UNESP-Botucatu, foram utilizadas CTM-TA alogênicas para o transplante por via intratecal pelo espaço C1-C2 em equinos com sequelas neurológicas decorrentes de MEP (grupo doente-GD) para avaliar a segurança e a eficácia do transplante.

5.2. Fase 1

5.2.1. Células-tronco mesenquimais utilizadas

As CTM que foram obtidas a partir do Laboratório de Medicina Regenerativa (RML) da UC Davis, foram originalmente utilizadas para o tratamento autólogo dos pacientes, e as células excedentes não utilizadas no tratamento foram doadas para fins de pesquisa, com o consentimento por escrito do proprietário. CTM-TA e CTM-MO de baixa passagem (P2-P4) foram utilizadas para a cultura.

As CTM obtidas do banco de células-tronco do Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) da UNESP-Botucatu, foram originalmente coletadas de cavalos doadores jovens e saudáveis. CTM –CU, CTM-TA e CTM-MO já caracterizadas (BARBERINI et al., 2014), de baixa passagem (P2-P4) foram utilizadas.

5.2.2. Líquido cefalorraquidiano (LCR)

Os LCR de cavalos saudáveis foram obtidos do laboratório de hematologia veterinária do *Veterinary Medical Teaching Hospital* (VMTH) da UC Davis. Um pool de LCR foi utilizado para a parte *in vitro*, na diferenciação neural e para a co-incubação das CTM.

5.2.3. Diferenciação neural

Para a fase realizada na UC Davis, as CTM-TA e CTM-MO foram cultivadas com uma densidade celular de 2×10^4 células/poço em lâminas para cultura celular com 8 poços revestidas com poly L lysine. As células foram mantidas em meio de cultura contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) baixa glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas até aderirem.

Após este tempo, o meio foi removido e as células induzidas à diferenciação neural em diferentes tipos celulares por 3 protocolos diferentes:

Protocolo 1 (neurônios/células gliais): as CTM foram pré-incubadas com meio contendo DMEM, 10% de SFB, 1 mM de β - mercaptoetanol (BME) (Sigma-Aldrich®) e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) durante 24 horas a 37°C. Subsequentemente, as células foram induzidas por meio da adição do meio neural contendo Neurobasal-A, 2% de suplemento B27, 0,5 mM de L-glutamina, 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 200 μ M de hidroxianisole butilado (BHA, Sigma Aldrich®). As células foram então incubadas a 37°C durante 9 dias (KUMAR et al., 2012; CRUZ VILLAGRÁN et al., 2014).

Protocolo 2 (células gliais/astrocitos): as CTM foram incubadas com um meio de pré-indução contendo DMEM, 10% de SFB e 1 mM de BME durante 24 horas. Depois disso, o meio de indução foi substituído pelo meio de manutenção neural que consistiu de Neurobasal-A, 2% StemPro® Neural Supplement, 20 ng/ml de bFGF, 20 ng/ml de fator de crescimento epidérmico (EGF) e 0,5x L-Glutamax por 9 dias (TANG et al., 2012).

Protocolo 3 (utilizando LCR): As CTM foram incubadas com 1 parte de LCR e 2 partes de meio de cultura durante 4 dias. Após este tempo, as células foram cultivadas com 1:1 meio de cultura/LCR durante mais 5 dias (GE et al., 2015).

Após a indução da diferenciação neural, as células foram avaliadas para a expressão dos marcadores nestina (pRb-336c polyclonal rabbit, Covance®), vimentina (clone vim 3B4, Dako®), proteína glial fibrilar ácida – GFAP (polyclonal rabbit anti GFAP, Dako® Z0334) e β -III tubulina (purified anti tubulin beta 3 (TUBB3) mouse - TUJ1, Biolegend®) pela técnica de imunocitoquímica. Para isso, as lâminas foram fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA), a pH 7,34, durante 20 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas com Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS). As lâminas foram colocadas em Reagente Quench (1 ml H₂O₂ a 30% + 1 ml de 10% de azida de sódio + 98ml de DPBS) durante 10 minutos à temperatura ambiente, e após lavou-se duas vezes em DPBS. As lâminas foram colocadas em soro de cabra a 10% durante 5 a 20 minutos à temperatura ambiente. Sem lavagem, os anticorpos foram aplicados às lâminas e incubados na câmara úmida durante 60 minutos à temperatura ambiente, após este tempo lavou-se duas vezes em DPBS. Foi aplicado o polímero de detecção de anticorpo anti-primário (HiDef Detecção™

HRP Polymer System - CELL Marque®) às lâminas, e estas foram incubadas na câmara úmida a temperatura ambiente por 15 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes em DPBS. O cromógeno de detecção (VECTOR NovaRED peroxidase (HRP) substrate kit) foi aplicado às lâminas e incubado por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e, em seguida, colocadas em hematoxilina durante 30 a 60 segundos e enxaguadas novamente em água destilada. Em seguida, as lâminas foram colocadas no *Bluing reagent* durante 30 a 60 segundos e depois lavadas em água destilada.

Para a fase realizada na UNESP-Botucatu, as CTM-CU foram cultivadas com uma densidade celular de 5×10^4 células/well em placas de 24 wells revestidas com poly L lysine. As células foram mantidas em meio de cultura contendo DMEM baixa glicose, 20% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas até aderirem.

Após este tempo, o meio foi removido e as células induzidas à diferenciação neural através do protocolo 3 (utilizando LCR) como previamente descrito.

Após a indução da diferenciação neural, as células foram avaliadas para a expressão dos marcadores GFAP (rabbit polyclonal AB5804, Millipore®), anti β -tubulin III (rabbit T2200, Sigma®), mouse anti-MAP-2 (MAB3418, Millipore®) e S-100 (ab15520, Abcam®) pela técnica de imunocitoquímica, conforme Barberini et al. (2014). Para isso, brevemente, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytofix/Cytoperm™ (BD, USA), sendo em seguida conduzido o bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos, e o bloqueio de proteínas inespecíficas por 1 hora. Em seguida, os anticorpos foram incubados por 18 horas a 4°C, no escuro. Os anticorpos primários foram detectados por incubação no sistema de polímeros HiDef HRP mouse/rabbit Polymer Detection System (Cell Marque, CA, USA). A revelação da reação foi conduzida utilizando a solução de substrato cromogênico DAB (Dako Cytomation, DNK) por 5 minutos, seguida de contra coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, BRA) por 1 minuto. A avaliação da reação foi realizada em microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, GER).

5.2.4. Caracterização por citometria de fluxo

Na UNESP- Botucatu foi avaliado por citometria de fluxo o potencial das CTM-MO, TA e CU em expressar os seguintes marcadores embrionários: Oct-4 (mouse anti-Oct-4 clone 7F9.2 - MAB4419A4, Millipore®), nanog (mouse anti-nanog clone 7F7.1 - MABD24A4, Millipore®), TRA 1-60 (mouse anti-TRA 1-60 clone TRA 1-60 - MAB436063, Millipore®) e TRA 1-81 (mouse anti-TRA 1-81 clone TRA1-81 - MAB4381C3, Millipore®), e os seguintes marcadores neurais: GFAP (rabbit polyclonal AB5804, Millipore®), β -III tubulina (anti β -tubulin III produced in rabbit - T2200, Sigma®) e proteína associada a microtúbulo-2 (MAP-2) (mouse anti-MAP-2 - MAB3418, Millipore®).

Para os marcadores primários não conjugados foi utilizado o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 555 (A21428, Invitrogen®) e rabbit anti-mouse IgG-RPE (STAR12B, Serotec®). Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários e secundários. Durante a análise foram contabilizados 10.000 eventos.

5.2.5 Avaliação da expressão de fatores de crescimento

Na UNESP-Botucatu as CTM-TA, CU e MO foram avaliadas quanto a expressão dos marcadores: VEGF-R (NCL-L-VEGFR-3, clone KLT9, Novocastra), VEGF (Ab-3 VEGF, clone JH121, MS-350-P, NeoMarkers), PDGF-R (PDGFR- β , clone 958, sc-432, Santa Cruz) e PDGF (PDGF-B, clone N-30, sc127, Santa Cruz), pela técnica de imunocitoquímica, conforme descrita anteriormente.

5.2.6 Co-incubação das CTM com LCR

Este estudo foi realizado na UC Davis. CTM-MO e CTM-TA foram cultivadas com LCR de cavalos durante 5 dias e depois avaliadas quanto a proliferação, viabilidade, fenótipo, migração e secreção.

Para isso, as CTM-MO e CTM-TA foram descongeladas em banho-maria a 37°C até a visualização de gelo. Subsequentemente, estas células foram homogeneizadas em meio de cultura pré-aquecido (90% de DMEM, 10% de

SFB e 1% de penicilina) e centrifugadas a 100g durante 10 minutos, com média aceleração e desaceleração. As células foram ressuspensas em meio de cultura e cultivadas até atingirem 70% de confluência (média de 3-4 dias).

Quando confluentes, as CTM foram tripsinizadas utilizando tripsina-EDTA (Gibco®) durante 5 minutos a 37°C e, em seguida, neutralizadas com meio de cultura. Posteriormente, foram centrifugadas a 400g durante 10 minutos.

As CTM foram ressuspensas em meio de cultura e co-incubadas com LCR. O meio de co-incubação consistiu de duas partes de meio de cultura (90% de DMEM, 10% FBS e 1% de penicilina) e uma parte de LCR. Além disso, as CTM também foram cultivadas com e sem a adição de 10 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS – L4391, Sigma-Aldrich®) para promover a ativação destas células.

Estes foram os grupos de tratamento:

- Meio de co-incubação com LCR
- Meio de cultura
- Meio de cultura + LPS (controle ativado)
- Meio de co-incubação com LCR + LPS

As CTM foram incubadas por diferentes períodos, tipos de frascos e placas de acordo com cada avaliação (proliferação, viabilidade, secreção, migração, imunofenotipagem).

5.2.6.1 Imunofenotipagem

A análise imunofenotípica das CTM foi realizada através da citometria de fluxo, antes da co-incubação (tempo 0) e após 4 dias de incubação. Para esta etapa, as CTM foram cultivadas em uma placa de 6 poços.

As CTM foram centrifugadas e ressuspensas em um tampão de bloqueio (DPBS com soro de cabra a 0,5%) e agitadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão de Vernal Flow Buffer (VFB) (DPBS Ca- Mg-, 1% de soro equino, 1% de EDTA 500 mM, 10% de azida de sódio) e distribuído em tubos de citometria de fluxo (200.000 células por tubo). Cada tubo foi marcado com um dos seguintes anticorpos: CD90-FITC mouse anti-rat (WSU

Monoclonal Ab center. Clone IgM) e mouse anti-horse MHC de classe II (clone CVS20, AbD Serotec, Reino Unido). Para os marcadores primários não conjugados, um anticorpo secundário foi utilizado (donkey anti mouse – PE). A citometria de fluxo foi realizada com um citômetro de fluxo FC500 (Beckman Coulter, Hialeah, FL, EUA).

5.2.6.2 Proliferação e viabilidade

A proliferação foi avaliada utilizando o ensaio de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt - The CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega Corporation) e a viabilidade foi realizada por Azul de Tripán como descrito pelos fabricantes.

Para o MTS, brevemente, após 4 dias de co-incubação em uma placa de 96 poços, uma curva padrão com 8 pontos foi realizada utilizando CTM. Estas células foram plaqueadas em duplicata na mesma placa de 96 poços. O meio de co-incubação foi removido e 100 µl de meio de cultura foi adicionado em todos os poços. Em seguida, 20 µl de MTS foi adicionado a todos os poços, e a placa foi incubada durante 2 horas a 37°C. Após este tempo, a placa foi lida em um leitor de placas de ELISA 490 nm com software Gen5.

Para a viabilidade e contagem das CTM, depois de 4 dias em co-incubação em garrafa de T75 cm², as células foram tripsinizadas e neutralizadas com meio de cultura. As CTM foram homogeneizadas em um tubo de microcentrífuga com Azul de Tripán 1:1, e colocadas em câmara de Neubauer onde foram contadas (número de células viáveis, células mortas e total de células).

5.2.6.3 Secreção das CTM

Após 4 dias de co-incubação numa placa de 6 poços, todo o sobrenadante foi retirado e congelado em -80°C para posterior análise do ensaio de ELISA.

A secreção das CTM foi avaliada utilizando kits de ELISA previamente testados e validados para cavalos: prostaglandina E2 (PGE2 – KGE004B,

RnDSystems®), interleucina 6 (IL-6) e fator de transformação do crescimento β (TGF- β 1, RnDSystems®). As amostras foram testadas em duplicatas, de acordo com as normas de cada fabricante. Todas as placas de ELISA foram lidas espectrofotometricamente com leitura em 490nm num leitor de microplacas com software Gen5.

5.2.6.4 Migração das CTM

As propriedades migratórias das CTM foram avaliadas por um ensaio de invasão utilizando placas de 24 poços (Corning® BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers).

Para isso, os reservatórios revestidos com Matrigel foram removidos do congelador até atingir temperatura ambiente. Em seguida, 1 ml de DMEM foi adicionado em cada poço. Os reservatórios revestidos com Matrigel foram transferidos para estes poços, e 0,5 ml de DMEM foi adicionado em cada reservatório. A placa foi colocada a 37°C durante 2 horas para reidratar os reservatórios.

As CTM foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas a 4×10^6 células/mL em meio de cultura com 10% de SFB.

Os reservatórios foram transferidos para poços vazios e 475 μ L de DMEM foi removido de cada reservatório.

Para o controle negativo, foram colocados no poço 750 μ L de meio com 1% de SFB, para o controle positivo foi usado 750 μ L de meio com 10% de SFB, os poços experimentais consistiram em 750 μ L de LCR. Os reservatórios foram então transferidos para os poços contendo os meios descritos. Foi adicionado 100 μ L de CTM a 4×10^6 células/ml a cada reservatório e a placa foi novamente incubada durante 24 horas. Depois disso, os reservatórios foram lavados com PBS e marcados com DAPI durante 2 minutos. A membrana de Matrigel foi cortada e montada em uma lâmina com meio para fluorescência (VECTASHIELD® Hard Set H-1400 – mounting media for fluorescence) e contadas usando um microscópio de fluorescência e o programa "Image J".

5.3 Fase 2

A etapa realizada na UC Davis consistiu de uma comparação entre a segurança do transplante intratecal de CTM-TA pela via lombo-sacra (LS) e pela via atlanto-occipital (AO) em cavalos saudáveis. Além disso, as CTM foram marcadas radioativamente e a cintigrafia foi realizada para acompanhar estas células após o transplante.

Adicionalmente, na UNESP-Botucatu foram realizados 3 transplantes seriados de CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU pela via intratecal entre as vértebras C1-C2 em animais saudáveis.

5.3.1 Comparação entre as vias LS e AO para o transplante intratecal de CTM

Seis cavalos adultos saudáveis (idades entre 5 e 20 anos; diversas raças) alojados no *Center for Equine Health* (CEH) da UC Davis foram utilizados.

Os cavalos foram considerados saudáveis através de um exame clínico, neurológico, e exame de sangue (hemograma completo e perfil bioquímico) normais uma semana antes da aplicação das CTM. O LCR foi coletado no momento do transplante das CTM e submetido à contagem de células, diferencial, concentração de proteína e teste de IFAT para EPM.

5.3.1.1 CTM utilizadas para o transplante

CTM-TA de baixa passagem (P2-P4) alogênicas foram utilizadas para o transplante. Estas CTM foram obtidas a partir do *Regenerative Medicine Laboratory* (RML) da UC Davis, conforme já descrito.

As CTM foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Subsequentemente, estas células foram homogeneizadas com meio de cultura pré-aquecido (90% de DMEM, 10% de SFB e 1% de penicilina) e centrifugada a 100G durante 10 minutos, com média aceleração e desaceleração. As células foram ressuspensas em meio de cultura e cultivadas até 70% de

confluência (média de 4-5 dias). Um total de 100 milhões de CTM-TA foi utilizado para cada transplante.

5.3.1.2 Coleta do LCR

O LCR foi coletado do espaço AO ou LS de acordo com cada grupo de estudo imediatamente antes do transplante das CTM, e após 30 dias.

Coleta AO: Os cavalos foram sedados com xilazina (0,4 mg/kg) e butorfanol (0,01 mg/kg), induzidos com midazolam (0,06 mg/kg) e quetamina (2,2 mg/kg) e mantidos sob anestesia geral com isoflurano (mesmo procedimento que o transplante de CTM). Uma área de aproximadamente 20 x 20 centímetros da pele foi tricotomizada imediatamente caudal à protuberância occipital externa e foi preparada assepticamente para o procedimento. Uma agulha espinhal de calibre 18-gauge e 3,5 polegadas foi inserida perpendicular à pele (no ponto em que uma linha entre as bordas craniais do atlas se cruzam com a linha média) até que o espaço subaracnóide foi penetrado e o LCR foi coletado.

Coleta LS: Os cavalos foram sedados (mesmo procedimento que o transplante de CTM) utilizando detomidina (0,01 mg/kg) e butorfanol (0,01 mg/kg). O local de penetração na pele foi localizado na linha média entre o aspecto caudal do processo espinhoso de L6 e o aspecto cranial do processo espinhoso de S2. Uma área de aproximadamente 20 x 20 cm em torno deste local foi tricotomizada e preparado assepticamente para o procedimento. O tecido subcutâneo foi infiltrado com anestésico local (lidocaína: <4mg / kg). Uma agulha espinhal de calibre 18-gauge e 6 polegadas foi inserida perpendicularmente à pele no local descrito anteriormente. Uma vez que o espaço subaracnóide foi penetrado, o LCR foi coletado por aspiração suave utilizando uma seringa de 6 ml.

5.3.1.3 Transplante das CTM

Quando confluentes, as CTM-TA foram lavadas duas vezes com DPBS. Em seguida, foram adicionados 5 mL de HyClone™ HyQTase™ Cell Detachment Reagent (GE Healthcare Life Sciences) durante 10 minutos a

37°C. Após o descolamento, as células foram centrifugadas durante 10 minutos a 400G. Em seguida, foram lavadas duas vezes com DPBS e uma vez com solução de salina injetável. As CTM foram ressuspensas em 20 milhões de células/ml de solução de salina injetável, totalizando 100 milhões de células. As células foram mantidas em gelo até o momento do transplante.

Os cavalos foram sedados ($n = 3$) utilizando detomidina (0,01 mg/kg i.v.) e butorfanol (0,01 mg/kg i.v.). As 100 milhões de CTM suspensas em 5 ml de solução salina (conforme descrito anteriormente) foram inoculadas diretamente para dentro do espaço LS com os cavalos em estação após a coleta do LCR.

Outros 3 cavalos foram submetidos a anestesia geral, e 100 milhões de CTM suspensas em 5 ml de solução salina (conforme descrito anteriormente) foram inoculadas no espaço AO após a coleta do LCR.

Os cavalos foram mantidos no hospital “Veterinary Medical Teaching Hospital (VMTH)” durante 2 dias após o transplante, sendo que os exames clínicos e neurológicos foram realizados três vezes por dia. Após este período, os animais retornaram aos piquetes e as avaliações clínicas neurológicas foram realizadas diariamente.

5.3.1.4 Rastreamento das CTM

5.3.1.4.1 Radiomarcagem das CTM

Cento e dez milhões de CTM-TA (110×10^6) alogênicas foram marcadas com 20 mCi de ^{99m}Tc -HMPAO de acordo com os protocolos descritos anteriormente (SOLE et al., 2012b; SPRIET et al., 2015), com algumas modificações.

As CTM foram ressuspensas num pequeno volume de meio de cultura com 10% de soro fetal de bovino (~ 0,5 mL). HMPAO (hexametilpropilenamine - reconstituído em solução salina, AnazaoHealth, Tampa, FL) foi adicionado à ^{99m}Tc (exametazima de Tecnécio). As células foram adicionadas para fazer uma concentração final de 125µg/mL HMPAO, 20mCi Tc para o carregamento celular (5 minutos). Após o carregamento celular, as CTM foram lavadas duas vezes com solução salina (primeira lavagem contendo 5% de soro autólogo), e ressuspensas em 5 mL de solução salina estéril. Foram utilizadas 100

milhões de células marcadas para o transplante, as células restantes foram utilizadas para determinar a viabilidade e a persistência da marcação. A eficiência e a persistência da marcação após 5 h foram avaliados como previamente descrito (SOLE et al., 2012b; SPRIET et al., 2015). A viabilidade celular 5 horas após o transplante foi avaliada com base numa amostra de CTM, utilizando o teste de exclusão com azul de tripan.

Para o cavalo Tc controle (sem CTM), HMPAO foi combinado com Tc (HMPAO 125µg + 10 mCi de Tc durante 5 minutos) e, em seguida, diluído a 5 mCi de Tc com solução salina (5 ml).

5.3.1.4.2 Animais

Dois cavalos foram utilizados para esta etapa. O cavalo 1 foi submetido a anestesia geral, e as CTM radiomarcadas foram transplantadas no espaço subaracnóideo via AO após a coleta do LCR. O cavalo 2 foi transplantado em estação sob sedação, por via intratecal pela cisterna LS com as CTM radiomarcadas, após a coleta do LCR.

Para o controle, um cavalo foi inoculado com a mesma técnica pela via AO com marcadores livres (Tc-HMPAO sem CTM).

Os cavalos foram mantidos no VMTH durante 2 dias após o transplante e os exames clínicos e neurológicos foram realizados três vezes por dia.

5.3.1.4.3 Imagens de cintigrafia

As imagens foram obtidas utilizando uma câmara gama (Medical Systems IS2, Ottawa, Canadá) com um colimador de baixo consumo de energia fixado em 140keV pico fotoelétrico e 20% de janela simétrica. As imagens laterais da coluna vertebral a partir da cabeça ao sacro foram obtidas utilizando uma aquisição estática de 1 minuto imediatamente após o transplante, e aos 30 minutos, 1 hora, 5 horas e 24 horas após o transplante. No cavalo 1, transplante AO, as imagens imediatas, 30 minutos e 1 hora após o transplante foram obtidas sob anestesia geral, enquanto que todas as outras imagens foram obtidas com o cavalo em estação sob sedação. No cavalo 2, transplante LS, todas as imagens (imediatas, 30 minutos, 1 hora, 5 e 24 horas)

foram obtidas com o cavalo em estação sob sedação. Pequenos marcadores radioativos foram colocados como pontos de referência para a aquisição da cintigrafia. Uma série de radiografias da coluna vertebral (Eklin EDR-6, Som-Eklin, Carlsbad, Califórnia) foram obtidas no dia seguinte à cintigrafia, com marcadores radiopacos na localização semelhante aos marcadores radioativos.

5.3.1.4.4 Interpretação da cintigrafia

A presença e distribuição do sinal radioativo foram avaliadas subjetivamente por um radiologista certificado, utilizando os marcadores radioativos para a localização anatômica baseando-se na correlação com as radiografias. A persistência no local do transplante foi quantificada ao longo do tempo. A região de interesse foi desenhada utilizando a ferramenta “*free-hand region of interest (ROI)*” de um software de visualização DICOM (Osirix Foundation, Geneva, Switzerland). A persistência foi definida como a razão das contagens detectadas, corrigidas, na ROI em cada ponto de tempo, dividido pelo número de contagens inicialmente presentes na ROI.

5.3.1.5 Acompanhamento dos animais

O sangue foi coletado através da punção da veia jugular e o LCR foi coletado de acordo com cada grupo (LS e AO), antes e após o transplante das CTM-TA (dia 0 e no dia 30, ao final do estudo). Os exames clínicos neurológicos completos foram realizados duas vezes por semana, no entanto os animais foram observados diariamente por 30 dias (final do estudo).

Exames de sangue foram submetidos ao laboratório de hematologia do VMTH para um hemograma completo e perfil bioquímico. O LCR foi submetido ao laboratório de hematologia do VMTH para uma análise de fluidos e concentração de proteína.

5.3.2 Segurança de transplantes intratecais sucessivos de CTM através do espaço C1-C2 em animais sadios

Esta etapa foi realizada na UNESP-Botucatu. Nessa fase, foram utilizados 16 equinos de ambos os sexos, divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (GC=4), grupo tratado com CTM-MO (GTMO=4), CTM-TA (GTTA=4) e CTM-CU (GTCU=4) alogênicas. Estes animais foram considerados saudáveis com base na avaliação de exames clínicos, análise hematológica e do líquido cefalorraquidiano (LCR).

No grupo GC foi administrado DPBS, e nos demais grupos foram administrados uma suspensão de 50 milhões de CTM, por via intratecal pelo espaço C1-C2, totalizando três aplicações com intervalo de 30 dias.

5.3.2.1 CTM utilizadas

CTM-TA, CTM-MO e CTM-CU de baixa passagem (P2-P4) alogênicas foram utilizadas para o transplante. Estas CTM foram obtidas do banco de células do LANÇA – UNESP Botucatu, já previamente caracterizadas (diferenciação em linhagem mesenquimal, marcadores de superfície) (BARBERINI et al., 2014).

As células foram descongeladas e expandidas em cultura para a concentração final de 50 milhões de CTM. Anteriormente ao transplante, as CTM foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes com Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), contadas e ressuspensas em 3ml de DPBS (total de 50 milhões de células). As CTM foram mantidas refrigeradas até o momento do transplante.

5.3.2.2 Coleta do LCR e transplante de CTM

O LCR foi coletado do espaço subaracnóideo entre as vértebras C1-C2 de acordo com a técnica já descrita (PEASE; BEHAN; BOHART, 2012), com pequenas modificações. Para isso, os animais foram sedados com detomidina (10-20 µg/kg intravenoso) e morfina (0,05 mg/kg intravenoso). Em posição quadrupedal, uma área de 15x15 cm, centrada sobre o espaço das vértebras

C1-C2, foi tricotomizada e preparada assepticamente com clorexidine e álcool para punção estéril. Foi realizada a infiltração da pele e do tecido subcutâneo com anestésico cloridrato de lidocaína 2%, utilizando um bloqueio em botão. Com ajuda da ultrassonografia (MyLab™30Gold VET), o espaço subaracnóide entre C1-C2 foi localizado (Figura 1), uma agulha espinhal de 25Gx90mm foi inserida e o LCR aspirado com auxílio de uma seringa de 3mL.

O LCR foi acondicionado em três tubos estéreis sem anticoagulante, e enviados para análise laboratorial (análise de fluidos e concentração de proteína) no Laboratório Clínico Veterinário da UNESP-Botucatu.

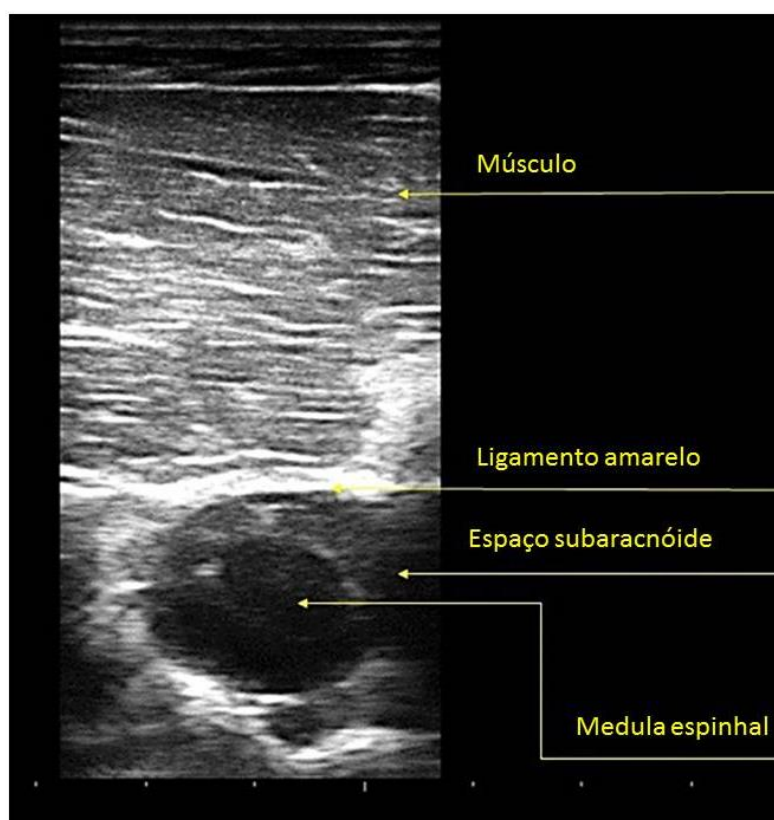


FIGURA 1: Imagem ultrassonográfica do espaço entre as vértebras C1-C2, utilizada para a coleta de LCR e o transplante de CTM em equinos, demonstrando a musculatura, ligamento amarelo, espaço subaracnóide e medula espinhal.

Logo após este procedimento, o PBS (3 ml) ou as CTM (50 milhões em 3 ml), de acordo com os respectivos grupos já descritos, foram transplantados pela mesma via.

Os cavalos foram mantidos na Clínica de Grandes Animais da UNESP-Botucatu durante 24 horas após o transplante e após este período, os animais retornaram aos piquetes.

5.3.2.3. Acompanhamento dos animais

Os exames clínicos e neurológicos completos foram realizados previamente a cada transplante, diariamente na primeira semana, e duas vezes por semana nas demais semanas após cada transplante, no entanto os animais foram observados diariamente.

Os animais foram avaliados pelo mesmo veterinário (capacitado para realizar o exame neurológico) em todos os momentos. Para isso, foi avaliada a integridade encefálica, medular e dos nervos periféricos através da avaliação do estado mental, do comportamento, da posição e coordenação da cabeça, da integridade dos pares de nervos cranianos, da locomoção, da coluna vertebral da região cervical até a sacral e dos membros torácicos e pélvicos.

As amostras para realização dos exames hematológicos foram colhidas imediatamente antes de cada transplante (PBS/CTM), e posteriormente no 1º e 3º dias após cada aplicação intratecal.

O LCR foi avaliado nos seguintes momentos: M0-imediatamente antes do primeiro transplante; M30 - imediatamente antes do segundo transplante (30 dias após M0); M60 - imediatamente antes do terceiro transplante (30 dias após M30); e M90 - 30 dias após M60 (final do estudo).

As amostras sanguíneas e do LCR foram encaminhadas para o Laboratório Clínico Veterinário da UNESP-Botucatu para análise.

5.3.3 Análise da eficácia do transplante das CTM em animais doentes

Nessa fase, foram utilizados 9 equinos com incoordenação motora crônica (GD=9) como sequela de mieloencefalite equina por protozoário (MEP), referenciados por veterinários. O tratamento com as CTM bem como o acompanhamento foram realizados no local onde os animais se encontravam.

Foram utilizadas 50 milhões de CTM-TA alogênicas provenientes do banco de células do LANÇA – UNESP Botucatu, por via intratecal através do

espaço entre as vértebras C1-C2, mediante sedação e com o animal em estação, totalizando três aplicações com intervalo de 30 dias, conforme já descrito.

A preparação das CTM-TA para o transplante, a coleta do LCR e o transplante das CTM-TA foram realizados conforme descrito anteriormente, na Fase 2. Com a única diferença de ter sido utilizado o ultrassom Edan U50 Portable Ultrasound System VET, para esta etapa da pesquisa.

Estes animais foram avaliados por exames clínicos, neurológicos, bem como análise hematológica e do líquido cefalorraquidiano (LCR) nos seguintes momentos: M0-imediatamente antes do primeiro transplante; M30 - imediatamente antes do segundo transplante (30 dias após M0); M60 - imediatamente antes do terceiro transplante (30 dias após M30); e M90 - 30 dias após M60.

5.3.3.1 Seleção dos animais acometidos por sequelas de MEP

Os animais foram selecionados através dos seguintes critérios: diagnóstico laboratorial positivo para MEP (SAG ELISA), já ter sido tratado com drogas antiprotozoárias por pelo menos 30 dias, e estar apresentando sinais neurológicos. Os dados de cada animal utilizado nesta etapa do estudo estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1
Dados dos animais com sequelas de MEP

Identificação	Sexo	Idade (anos)	Raça	Peso (kg)	Exame laboratorial para MEP
1	M	6	QM	413	Soro: positivo 2+. Título 1:500
2	M	10	BH	500	Líquor: positivo 1+. Título 1:2,5
3	F	23	QM	450	Soro: positivo 3+. Título 1:1000
4	F	16	QM	430	Líquor: positivo 2+. Título 1:5
5	F	5	QM	500	Soro: positivo 1+. Título 1:250
6	M	13	SRD	390	Líquor: positivo 2+. Título 1:5
7	M	10	SRD	350	Líquor: positivo 5+. Título 1:40
8	F	2,5	BH	480	Soro: positivo 1+. Título 1:250
9	F	6	BH	560	Soro: positivo 2+. Título 1:500
Média		10,1±6		452,5±60,8	

5.3.3.2 Acompanhamento dos animais

Foi realizado exame clínico completo (frequência cardíaca, respiratória, temperatura, mobilidade intestinal, tempo de preenchimento capilar, palpação de linfonodos, coloração das mucosas) previamente a cada inoculação de CTM e 30 dias após a última aplicação.

A avaliação do sistema nervoso central e periférico foi realizada conforme descrito por (LUNN; MAYHEW, 1989). Os animais foram avaliados pelo mesmo veterinário (capacitado para realizar o exame neurológico) em todos os momentos. Para isso, foi avaliada a integridade encefálica, medular e dos nervos periféricos através da avaliação do estado mental, do comportamento, da posição e coordenação da cabeça, da integridade dos pares de nervos cranianos, da locomoção, dos reflexos espinhais, da coluna vertebral da região cervical até a sacral e dos membros torácicos e pélvicos, previamente a cada transplante de CTM e 30 dias após a última aplicação.

Os graus utilizados para a avaliação da incoordenação motora estão descritos no Quadro 2 (LUNN; MAYHEW, 1989).

QUADRO 2

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora

Grau	Características
0	padrão normal de locomoção
1	déficits dificilmente observados durante a locomoção em linha reta, mas confirmados após a realização de manobras especiais
2	déficits facilmente observados durante a locomoção em linha reta e exacerbados durante a realização de manobras especiais
3	o animal pode cair quando manobras especiais são realizadas e geralmente apresentam posturas anormais mesmo quando parado
4	quedas espontâneas durante a locomoção
5	decúbito permanente

Foram realizadas as seguintes manobras especiais: andar e trotar em linha reta, afastar, andar em círculos, descer e subir rampas, passar por obstáculos, andar com pescoço estendido, deslocamento lateral da garupa.

Os exames hematológicos e do LCR foram realizados imediatamente antes de cada transplante (M0, M30, M60), e após 30 dias do último transplante (M90). As amostras foram analisadas por diferentes laboratórios clínicos.

5.4 Análise estatística

Primeiramente a distribuição de todas as variáveis foi avaliada com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas. Para a análise dos parâmetros da caracterização por citometria de fluxo, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns, para determinar as diferenças nas medianas das variáveis entre as fontes de CTM. Para os resultados da co-incubação com LCR, foi realizada uma Análise de Variância com medidas repetidas, seguida por Tukey para confrontar as médias dos resultados obtidos nas diferentes fontes de CTM e tratamentos. Para o estudo comparando as vias LS e AO, os parâmetros do LCR antes e após o transplante de CTM-TA foram comparados utilizando o teste T student pareado. Para o experimento com transplantes pela via entre as vértebras C1-C2 (GS e GD) foi utilizado o teste de Friedman com pós teste de Dunns. Para os animais saudáveis foram comparados a mediana dos parâmetros entre as fontes de CTM e os momentos, e para os doentes foi verificado se houveram diferenças das medianas entre os diferentes momentos avaliados. Para todas as análises foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. Foram utilizados os softwares Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, 2007¹) e o *Statistical Analysis Software* – SAS versão 9.3 (SAS Institute, 2011²).

¹ GraphPad Software, Inc. 2007. Prism (Data analysis software system), version 5.0 Software e Guia do Usuário. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>.

² SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

6 RESULTADOS

6.1 Fase 1

6.1.1 Diferenciação neural

6.1.1.1 Imunocitoquímica

As CTM-TA controle (sem indução neural) mostraram-se positivas para GFAP, nestina e vimentina, e após a indução com os diferentes protocolos houve uma mudança nesta marcação. Após o protocolo 1, indução para astrócitos e células da glia, as células foram positivas para GFAP (células da glia) e nestina (precursores neurais), confirmando a linhagem glial, e levemente para vimentina. Após a indução pelo protocolo 2, indução para neurônios, houve marcação positiva para nestina porém não houve marcação para β -III tubulina (neurônios), mostrando uma falha na completa diferenciação ou que as células estavam em um estágio mais avançado da diferenciação. Após o protocolo 3, utilizando LCR, as células foram positivas para GFAP (células da glia) e nestina (precursores neurais) e levemente para β -III tubulina (neurônios) e vimentina (células mesenquimais), mostrando uma possível diferenciação para células mais primitivas e células da glia (Figura 2).

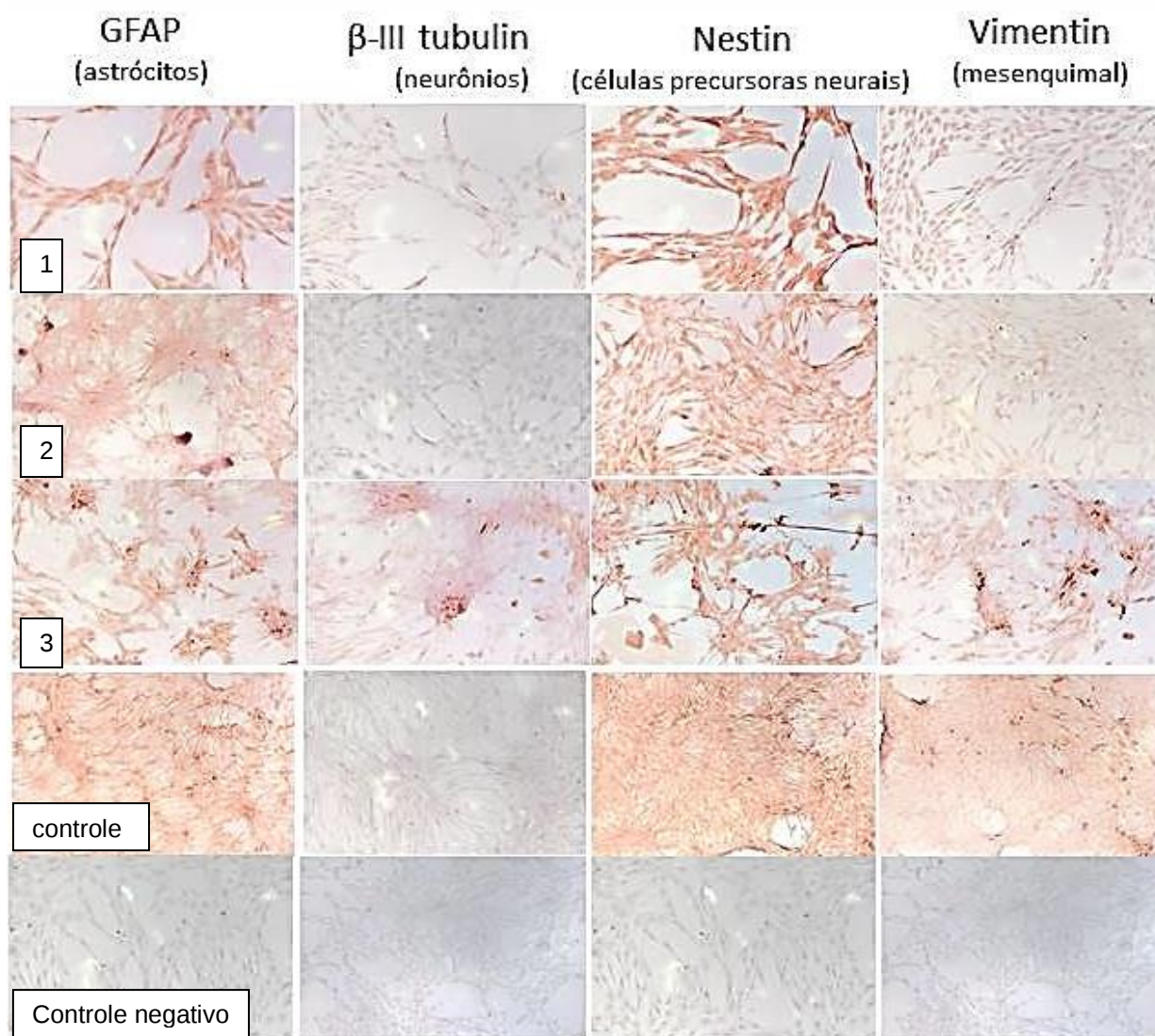


FIGURA 2: Imunocitoquímica para GFAP, β-III tubulina, nestina e vimentina nas CTM-TA submetidas a três protocolos diferentes para a diferenciação neural. 1: protocolo 1; 2: protocolo2; 3: protocolo 3. N=3 réplicas biológicas. Aumento 10x.

As CTM-MO controle também se mostraram positivas para GFAP, nestina e vimentina, e após a indução com os diferentes protocolos houve uma mudança nesta marcação. Após o protocolo 2, indução para neurônios e células da glia, as células foram positivas para GFAP (células da glia), nestina (precursores neurais) e β-III tubulina (neurônios), confirmando a linhagem glial e neurônios, e levemente para vimentina; após o protocolo 1, indução para astrócitos, e protocolo 3, utilizando LCR, houve marcação positiva para todos os marcadores, mostrando uma possível diferenciação em diversos tipos neurais, ou que a MO possui maior capacidade em expressar marcadores neurais de superfície (Figura 3).

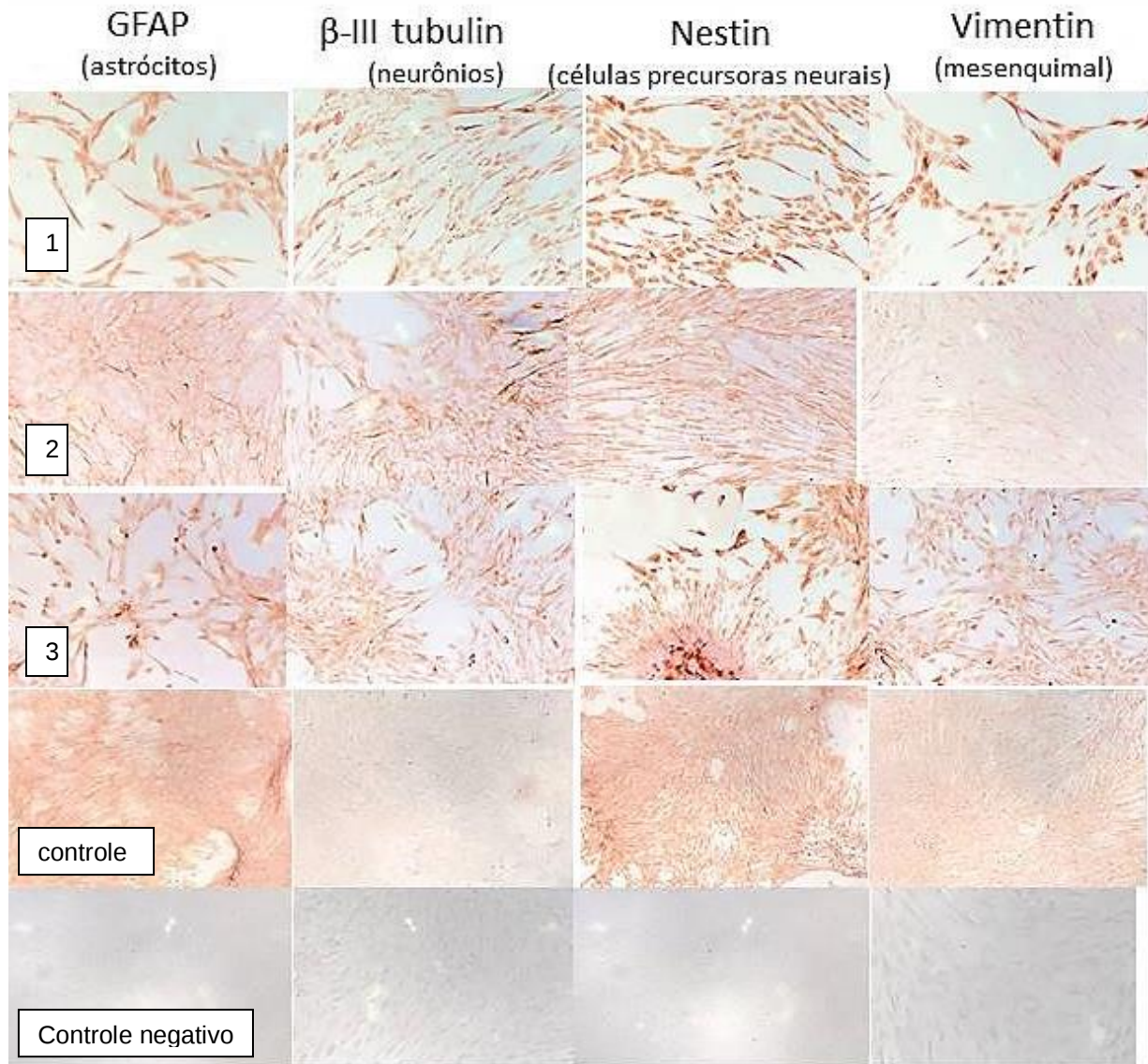


FIGURA 3: Imunocitoquímica para GFAP, β -III tubulina, nestina e vimentina nas CTM-MO submetidas a três protocolos diferentes para a diferenciação neural. 1: protocolo 1; 2: protocolo 2; 3: protocolo 3. N=3 réplicas biológicas. Aumento 10x.

As CTM-CU controle (sem indução neural) (Figura 4) e após a indução neural utilizando LCR (Figura 5) expressaram os marcadores GFAP, β -III tubulina, S100 e MAP2.

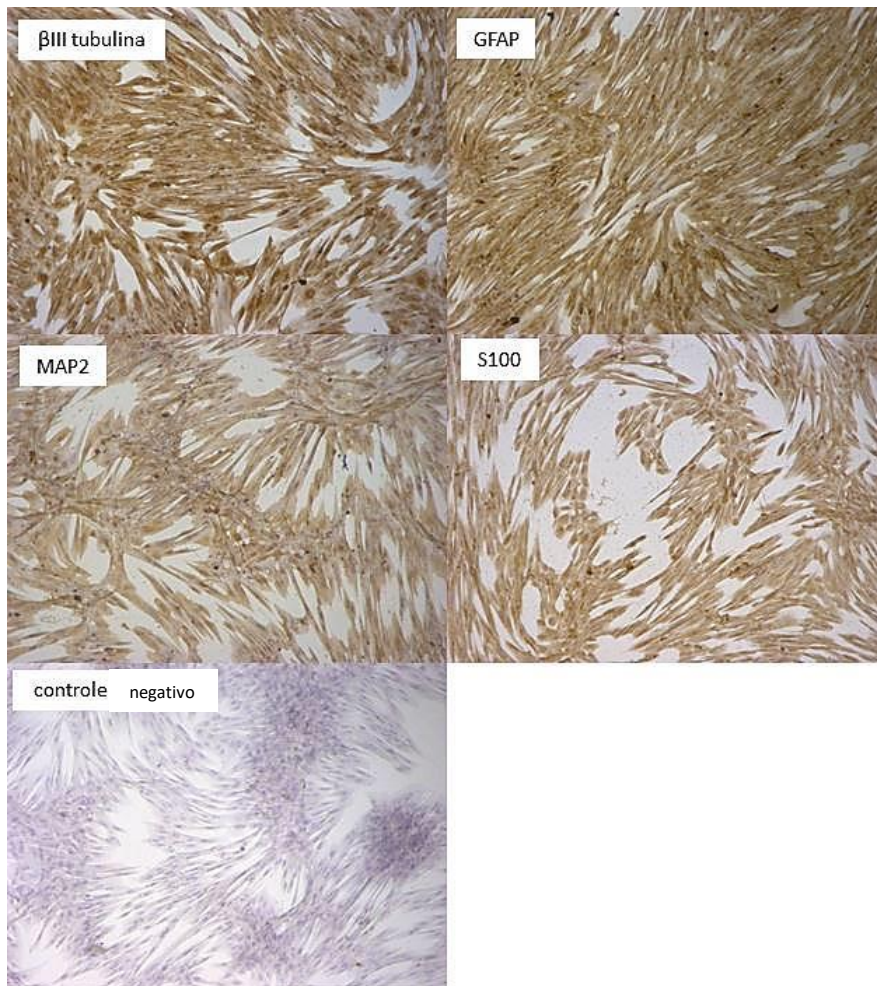


FIGURA 4: Expressão dos marcadores neurais β -III tubulina, GFAP, MAP2 e S100 em CTM-CU através da técnica de imunocitoquímica. N=3 réplicas biológicas. Aumento 10x.

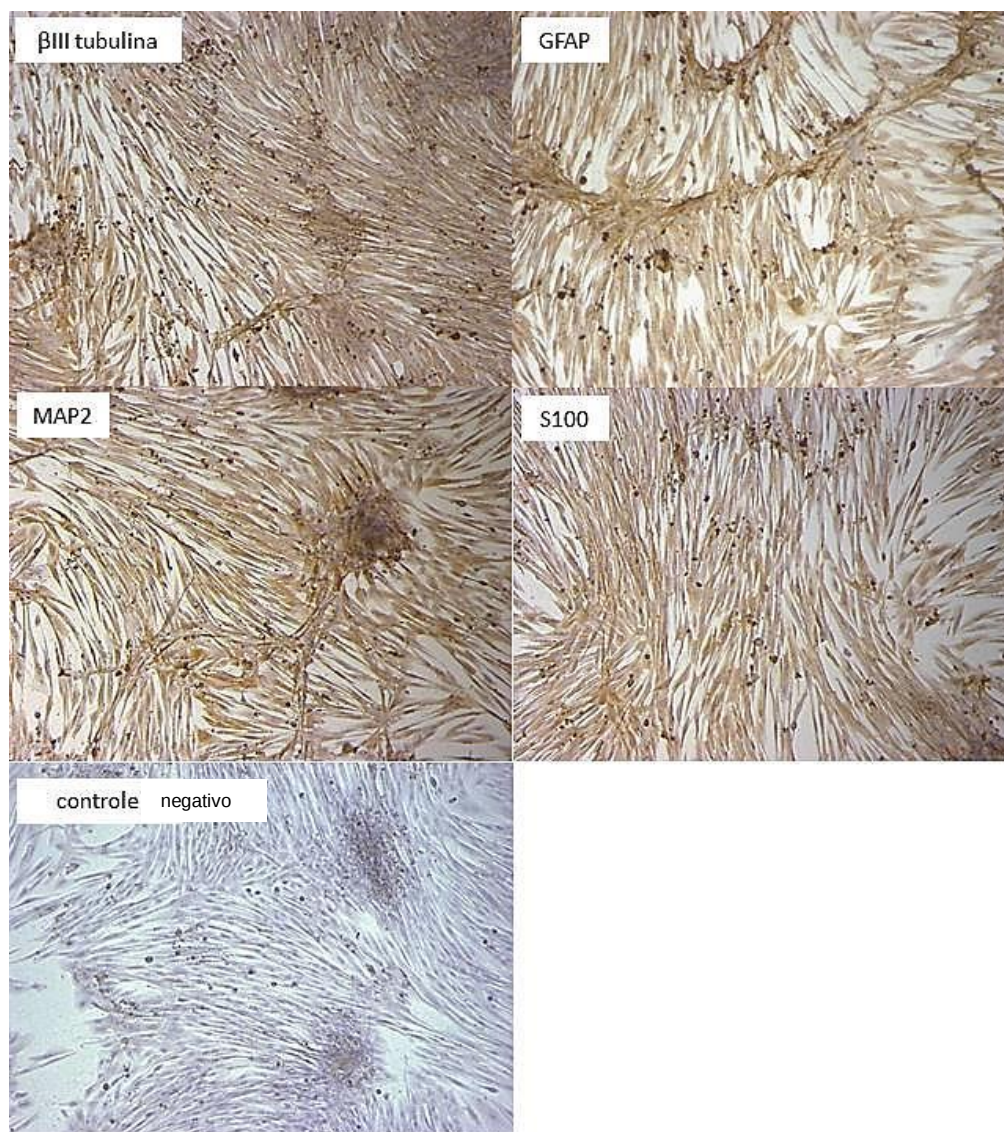


FIGURA 5: Expressão dos marcadores neurais β -III tubulina, GFAP, MAP2 e S100 em CTM-CU induzidas a neurodiferenciação com LCR, através da técnica de imunocitoquímica. N= 3 réplicas biológicas. Aumento 10x.

6.1.2 Citometria de fluxo para marcadores embrionários e neurais

As CTM-MO, TA e CU sem indução neural, foram avaliadas por citometria de fluxo. As CTM-MO foram negativas ($\% < 4\%$) para todos os marcadores. As CTM-TA apresentaram baixa marcação para β -III tubulina e para os marcadores de pluripotência, e não marcaram os anticorpos neurais MAP-2 e GFAP ($\% < 4\%$). As CTM-CU apresentaram marcação para Nanog ($> 50\%$), baixa marcação para Oct-4, β -III tubulina e GFAP, e foram negativas para TRA 1-60, TRA 1-81 e MAP-2 ($< 4\%$). Porém, só houve diferença estatística entre os grupos de CTM para a marcação de TRA 1-60, sendo que as CTM-TA apresentaram marcação superior às CTM-MO (Figura 6).

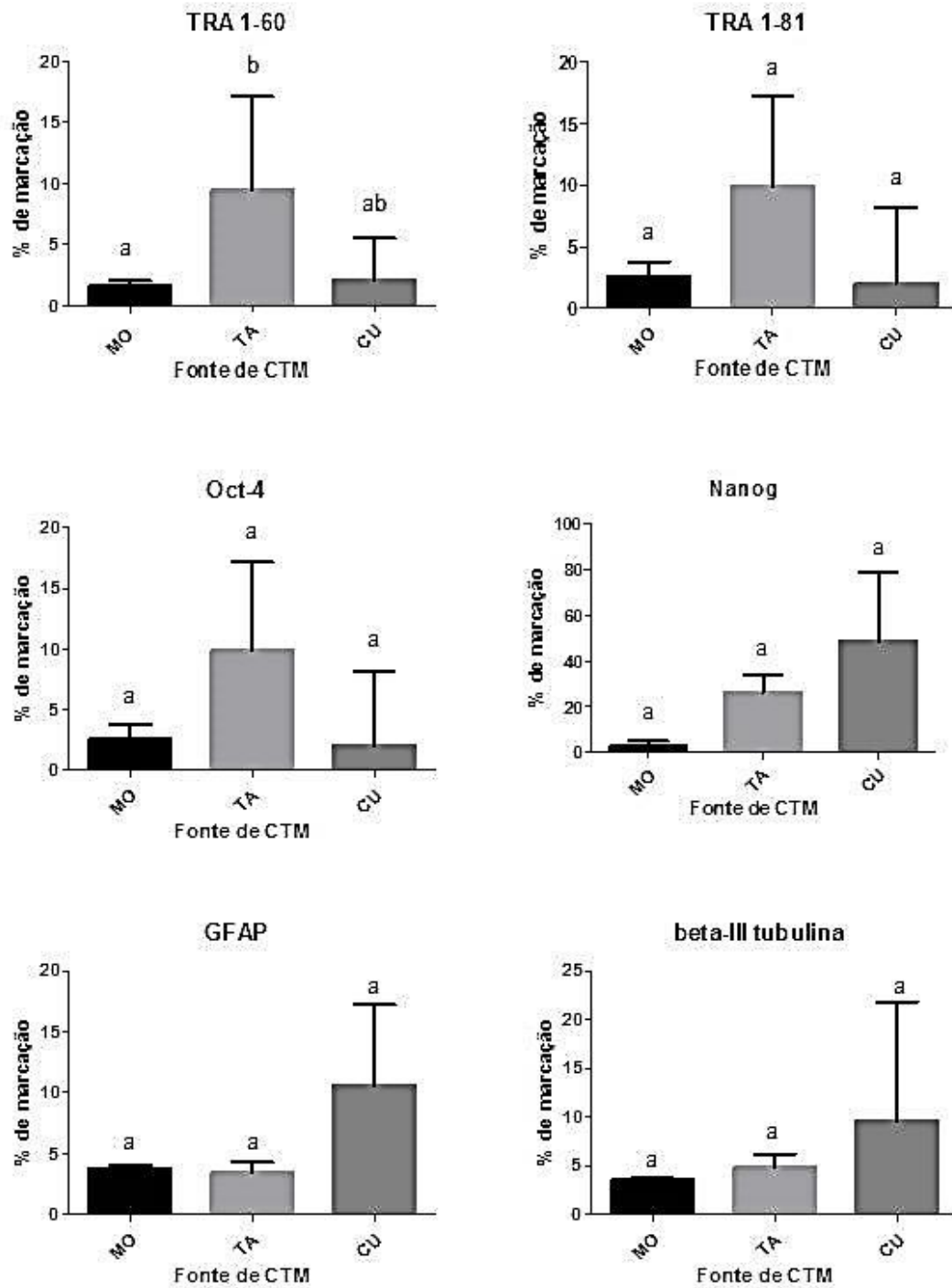


FIGURA 6: Médias percentuais de marcação das CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU para marcadores de pluripotência e neurais pela técnica de citometria de fluxo. Letras distintas diferem ($p < 0,05$).

6.1.3 Imunocitoquímica para fatores de crescimento

As CTM-CU expressaram marcação positiva para PDGF e PDGFR, e leve marcação para VEGF e VEGFR. As CTM-MO foram positivas para os marcadores PDGF, PDGFR e VEGF, e apresentou marcação negativa para VEGFR. E as CTM-TA

foram positivas para os marcadores PDGF e PDGFR, e apresentaram baixa marcação para VEGF e VEGFR (Figura 7).

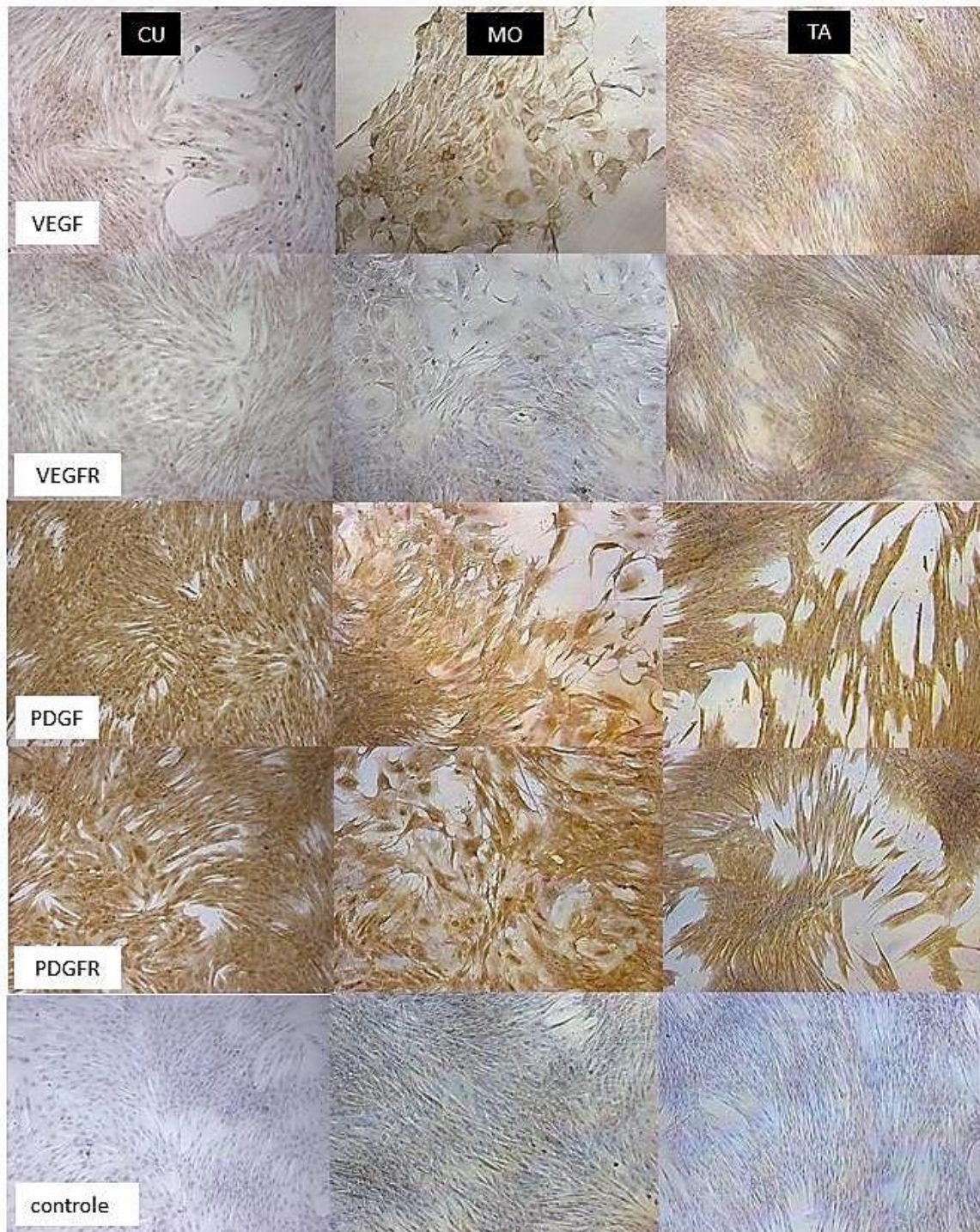


FIGURA 7: Avaliação da expressão dos marcadores VEGF, VEGFR, PDGF e PDGFR em CTM-CU, MO e TA. Aumento 10x.

6.1.4 Co-incubação com LCR

6.1.4.1 Imunofenotipagem

A co-incubação com LCR normal e de animais doentes não alterou a imunofenotipagem das CTM-MO e CTM-TA. As CTM expressaram CD90 (>95%) e uma expressão muito baixa de MHC-II (<2%) antes e após a co-incubação com LCR. Demonstrando assim, que a presença de LCR não alterou as características imunofenotípicas das CTM.

6.1.4.2 Proliferação e viabilidade

As CTM-MO e CTM-TA apresentaram boa proliferação na presença de LCR (Figura 8). Sendo que as CTM-MO co-incubadas com LCR apresentaram maior proliferação ($p=0,0318$) do que as CTM-MO cultivadas em meio de cultura celular.

As CTM-MO e CTM-TA se apresentaram viáveis no cultivo com adição de LCR (>90%).

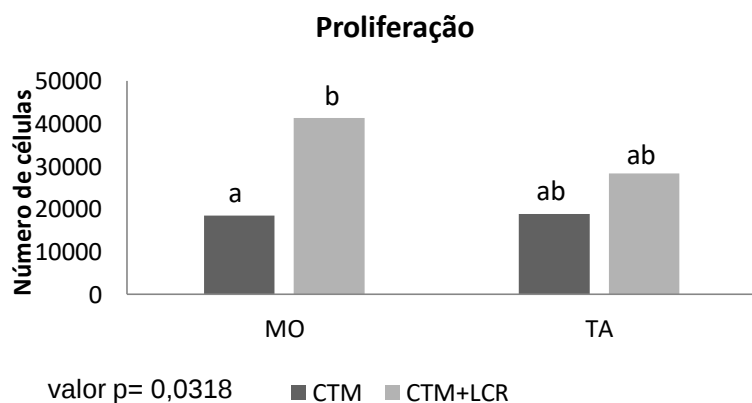


FIGURA 8: Avaliação da proliferação de CTM-TA e CTM-MO em meio de cultura e co-incubadas com LCR. MO: CTM-MO; TA: CTM-TA; CTM: CTM cultivadas com meio de cultura; CTM+LCR: CTM co-incubadas com LCR. Letras distintas diferem estatisticamente.

6.1.4.3 Secreção das CTM

As CTM-MO secretaram mais TGF- β e IL-6, esta após a ativação com LPS, do que as CTM-TA. No entanto, só houve diferença (valor $p=0,0159$) na secreção de TGF- β entre os grupos (CTM-MO e CTM-TA), e não entre os tratamentos (CTM e

CTM+LCR). Por outro lado, as CTM-TA secretaram mais PGE2 do que as CTM-MO, após ativação com LPS, porém só houve diferença (valor $p=0,0275$) entre os grupos (CTM-TA e CTM-MO), e não entre os tratamentos (CTM e CTM+LCR) (Figura 9).

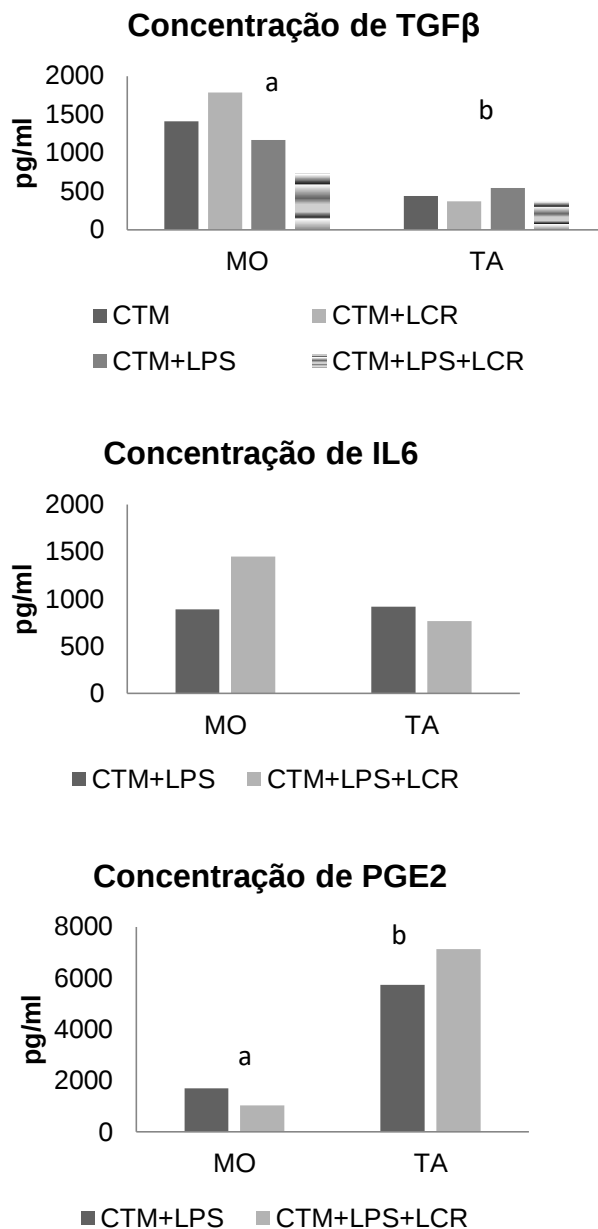


FIGURA 9: Avaliação da secreção de TGF- β , PGE2 e IL-6 das CTM-MO e CTM-TA após a co-incubação com LCR, com ou sem ativação com LPS. IL-6 e PGE2 só foram secretadas após ativação com LPS. Letras distintas diferem estatisticamente. N=5 para cada teste.

6.1.4.4 Migração celular

As CTM-MO e CTM-TA mantiveram suas propriedades migratórias na presença de LCR.

Mas em geral, as CTM-MO parecem apresentar um potencial migratório maior do que as CTM-TA, tanto na presença como na ausência de LCR. Porém só houve diferenças ($p<0,05$) entre os controles negativo e positivo das CTM-MO, e entre os controles positivos da CTM-MO e CTM-TA (Figura 10).

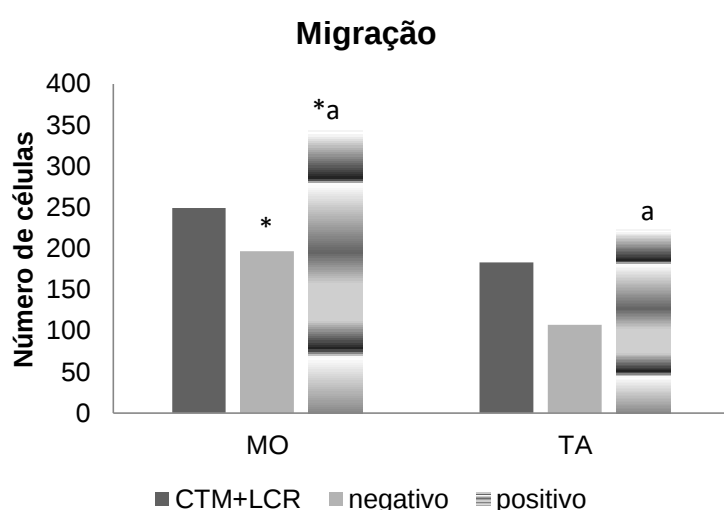


FIGURA 10: Avaliação da migração celular pelo ensaio de invasão nas CTM-MO e CTM-TA cultivadas com LCR. Letras e símbolos iguais diferem estatisticamente ($p<0,05$).

6.2 Fase 2

6.2.1 Comparação entre administração LS e AO

6.2.1.1 Transplante intratecal das CTM

Os procedimentos de sedação e anestesia mostraram-se eficazes de acordo com cada grupo. O transplante de CTM pela via LS e AO foi de fácil execução em todos os cavalos, mostrando-se segura e sem complicações durante o procedimento ou depois, e viável, tanto com os animais anestesiados quanto em estação.

6.2.1.2 Imagens de cintigrafia

Imediatamente após o transplante das CTM radiomarcadas pela via AO, o sinal radioativo foi identificado com a intensidade máxima no local do transplante e estendendo-se cranialmente para o aspecto caudal da depressão craniana e caudalmente ao nível da vértebra cervical C2 (Figura 11). Uma hora após o transplante, o sinal radioativo estava presente ao nível da primeira vértebra torácica, e em 5 horas o sinal radioativo pode ser identificado por toda a coluna lombar (Figura 12).

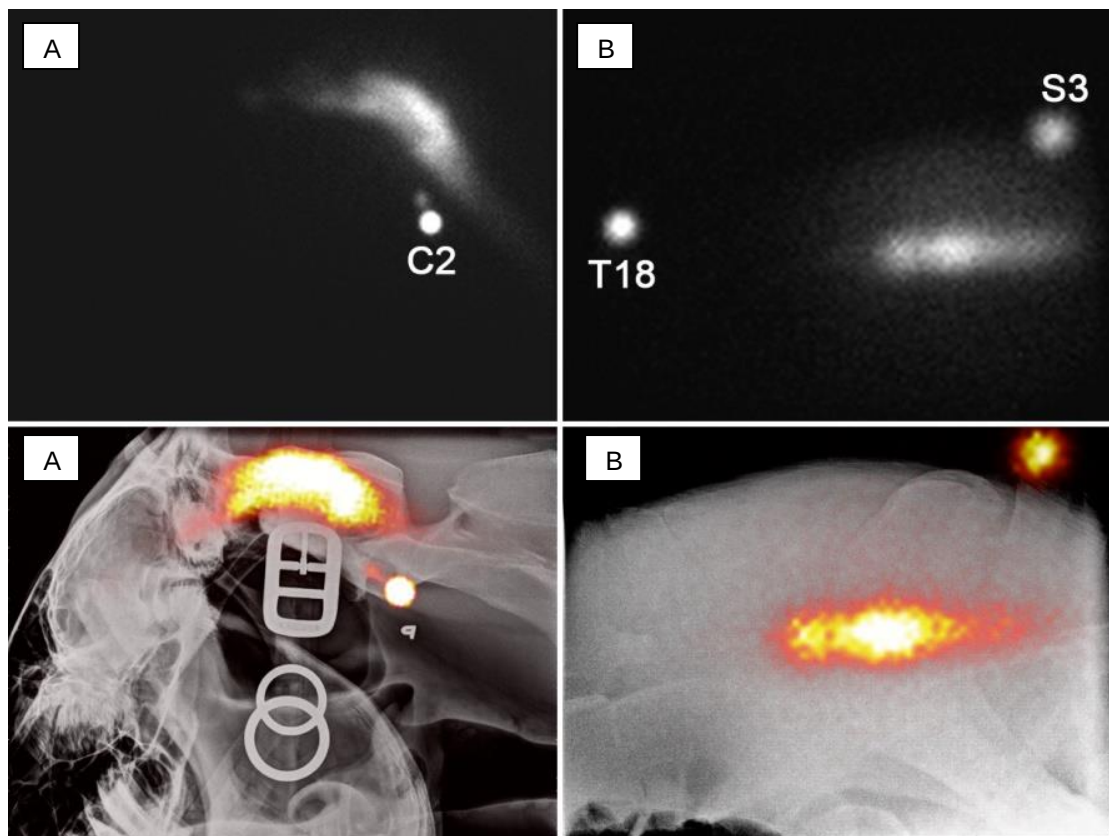


FIGURA 11: Imagens cintigráficas obtidas imediatamente após o transplante das CTM radiomarcadas pelas vias AO (A) e LS (B). A área focal redonda de intenso sinal radioativo são marcadores externos colocados na segunda vértebra cervical (C2), na 18ª vértebra torácica (T18) e na terceira vértebra sacral (S3). A linha inferior mostra a fusão das imagens cintigráficas com radiografias para ajudar na localização anatômica das CTM.

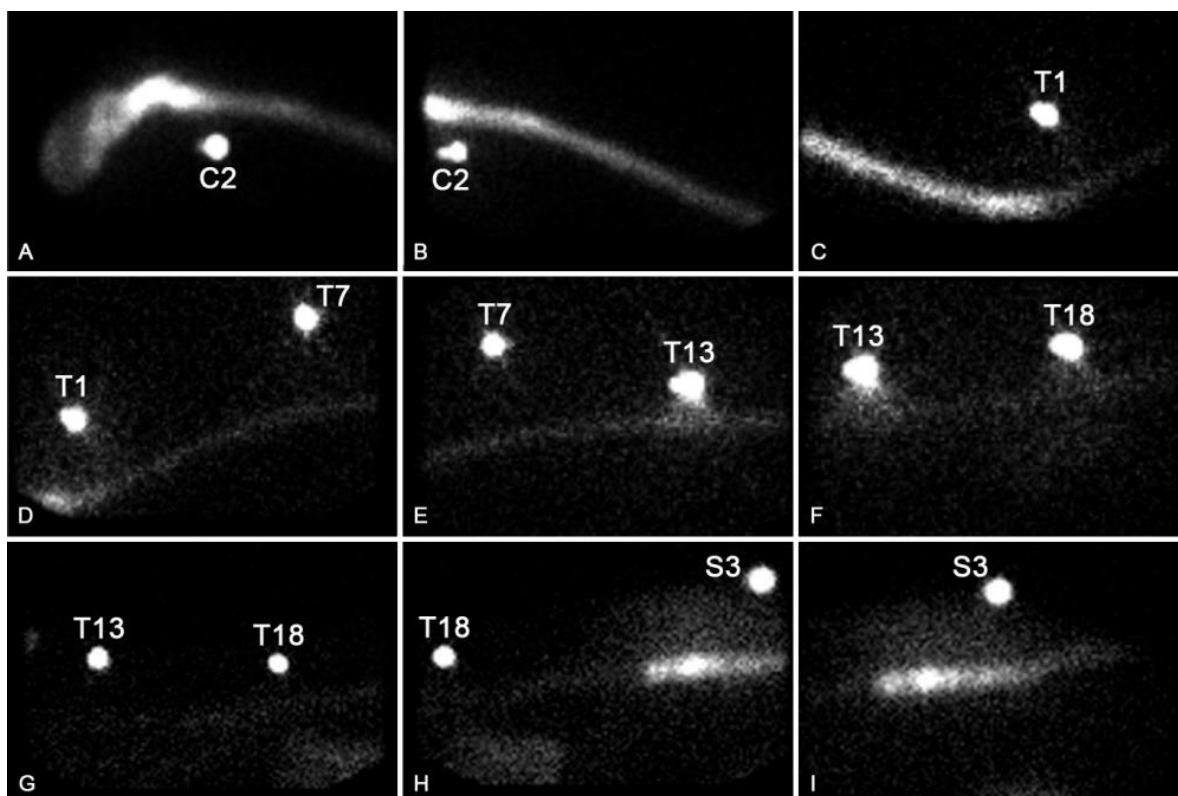


FIGURA 12: Imagens cintigráficas obtidas 5 horas após o transplante das CTM radiomarcadas pelas vias AO (A-F) e LS (G-I). Marcadores radioativos externos foram colocados na segunda vértebra cervical, na primeira (T1), 7 (T7), 13 (T13) e 18 (T18) vértebras torácicas, bem como na terceira vértebra sacral (S3). Após o transplante AO, o sinal radioativo pode ser observado por toda a coluna lombar, enquanto que nenhuma distribuição cranial das CTM radiomarcadas pode ser observada após o transplante LS.

Ao fim de 24 horas após o transplante AO, o sinal radioativo estava ainda presente, sendo mais intenso na coluna cervical cranial, mas um sinal fraco foi ainda apreciado atingindo a coluna lombar. O sinal radioativo manteve-se mais intenso no local do transplante durante todos os períodos de tempo analisados.

Após o transplante lombo-sacro, o sinal radioativo foi imediatamente visível ao nível da última vértebra lombar e sacral cranial (Figura 11). O sinal ao longo do tempo se estendeu caudalmente ao final do espaço dural, mas apenas um mínimo sinal radioativo se estendeu cranialmente (Figura 12). O sinal ainda foi identificado em 24 horas após o transplante.

Quando o transplante controle com o marcador livre pela via atlanto-occipital foi realizado no cavalo 1, a distribuição do sinal radioativo e o tempo de progressão foi semelhante ao transplante das CTM radiomarcadas, com o sinal atingindo a área torácica cranial após 1 hora, e a região sacral após 5 horas. Uma absorção leve foi evidente na glândula tireóide após o transplante do controle. Isto não foi observado com o transplante das CTM radiomarcadas.

A quantificação da persistência no local do transplante (Tabela 2) demonstrou diminuição ao longo do tempo. A persistência após o transplante AO durante os tempos posteriores foi menor do que após o transplante LS. A persistência após o transplante do controle foi mais baixa em todos os tempos com exceção para as 24 horas.

TABELA 2
Quantificação da persistência (%) no local de transplante ao longo do tempo

	AO	LS	AO C
T 0	100 %	100 %	100 %
T 30 min	93 %	87 %	79 %
T 1 h	80 %	85 %	58 %
T 5 h	37 %	48 %	32 %
T 24 h	13 %	18 %	21 %

AO: Atlanto-Occipital, LS: Lombo-Sacra, AO C: Atlanto-Occipital controle.

6.2.1.3 Acompanhamento clínico dos animais

Não houve alteração nos exames sanguíneos (hemograma completo e perfil bioquímico) antes ou após os transplantes de CTM e CTM radiomarcadas, para ambos os grupos AO e LS.

Os exames clínicos e neurológicos se mostraram normais antes e após o transplante das CTM/CTM radiomarcadas.

Os resultados do exame do LCR (Tabela 3) mostraram, em dois cavalos, um aumento de células nucleadas totais (26 e 13 células, respectivamente) e na concentração de proteínas (85 e 121 mg/dL, respectivamente), apesar de nenhum dos animais apresentarem alterações no exame clínico neurológico.

TABELA 3

Resumo dos achados do LCR pré e após (30 dias) o transplante intratecal de CTM-TA

Local de coleta	Proteína total (mg/dl)		Células nucleadas (células/ μ l)		Neutrófilos (%)		Células mononucleares (%)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
LS	84	72	13	7	0	10	59	89
LS	59	67	9	13	2	0	88	91
LS *	64	64	1	4	19	84	23	15
AO	88	121	1	6	47	5	39	83
AO	55	81	<1	6	0	0	0	96
AO *	77	85	<1	26	0	1	0	90
<i>Média</i>	<i>71.2</i>	<i>81.7</i>	<i>4.2</i>	<i>10.3</i>	<i>11.3</i>	<i>16.7</i>	<i>34.8</i>	<i>77.3</i>
<i>Valor P</i>	<i>0.18</i>		<i>0.21</i>		<i>0.72</i>		<i>0.06</i>	

Valores de referência: Proteína total=<100 mg/dl; Células nucleadas <8 céls/ μ l.

*=CTM marcadas com tecnécio; LS= lombo-sacro; AO= atlanto-occipital.

6.2.2 Segurança do transplante intratecal de CTM através do espaço C1-C2 em animais saudáveis

A coleta de LCR e o transplante das CTM através do espaço C1-C2 se mostrou viável pelo método proposto com o auxílio da ultrassonografia. Dentre os 16 animais submetidos ao protocolo, em apenas 2 não foi possível a realização do procedimento devido os mesmos não permanecerem imóveis suficientemente, porém estes foram substituídos.

Não foi demonstrado nenhum efeito colateral após três inoculações com CTM alogênicas. Todos os parâmetros realizados no exame clínico e neurológico se mantiveram dentro da normalidade para a espécie equina durante todos os momentos (antes e após o transplante de CTM), e em todos os grupos (GC, GTTA, GTMO e GTCU). Não houve alterações nos dados hematológicos em nenhum dos momentos analisados em todos os grupos, todos os valores se mantiveram dentro da normalidade para a espécie equina.

Poucas alterações foram encontradas na análise do LCR: aumento no número de células nucleadas em 3 animais do GTA, 4 animais do GMO e 2 animais do GCU. Também notou-se a presença de células atípicas: linfócitos reativos em 1 animal do GTA, 1 animal do GMO e 3 animais do GCU, e presença de célula de Mott em 1 animal

do GCU, embora 2 destes animais não apresentaram aumento no número de células nucleadas. Porém, mesmo com estas pequenas alterações no LCR (sem diferença estatística), todos os animais mantiveram os exames clínicos e neurológicos normais durante toda a fase de avaliação.

Os resultados estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4
Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após os transplantes de CTM (continua)

Animal	Grupo	Momento	cor	aspecto	densidade	Proteínas (mg/dL)	glicose	Sangue oculto	Pandy	hemáceas	Céls nucleadas	Citologia
Referência			incolor	límpido	1,004-1,008	5-100	+ / ++		neg		0-8	
Natalia	PBS	M0	incolor	límpido	1,004	67,8	++	+	neg	1	2	
		M30	incolor	límpido	1,006	44,2	++	+	neg	6	3	
		M60	incolor	límpido	1,006	39,7	++	traços	neg	1	1	
		M90	incolor	límpido	1,006	30,7	++	+++	neg	3	1	
Ana lucia	PBS	M0	incolor	límpido	1,004	60,2	++	neg	neg	2	0	
		M30	incolor	límpido	1,004	57,1	++	+	neg	5	2	
		M60	incolor	límpido	1,004	55,3	++	neg	neg	2	0	
		M90	incolor	límpido	1,004	46,9	++	neg	neg	2	0	
Rombuda	PBS	M0	incolor	límpido	1,004	41,9	++	+++	neg	97	2	
		M30	incolor	límpido	1,006	45,5	++	+	neg	3	2	
		M60	incolor	límpido	1,004	32,7	++	neg	neg	2	1	
		M90	incolor	límpido	1,004	36,4	++	+++	neg	5	1	
Zeire	PBS	M0	incolor	límpido	1,006	33,7	++	+++	neg	1	1	
		M30	incolor	límpido	1,006	31	++	++	neg	4	1	
		M60	incolor	límpido	1,006	37	++	traços	neg	3	1	
		M90	incolor	límpido	1,006	42,3	++	neg	neg	1	2	
Diamante	TA	M0	incolor	límpido	1,004	47,3	++	+	neg	5	1	
		M30	incolor	límpido	1,004	53	++	neg	neg	9	1	
		M60	incolor	límpido	1,004	52,4	+	neg	neg	1	20	
		M90	incolor	límpido	1,006	61,2	++	+	neg	0	12	LR
Sabrina	TA	M0	incolor	límpido	1,004	74,4	++	neg	neg	0	0	
		M30	incolor	límpido	1,006	73,8	++	neg	neg	1	2	
		M60	incolor	límpido	1,006	65,6	++	4+	neg	124	14	
		M90	incolor	límpido	1,004	71,7	++	4+	neg	2103	2	

TABELA 4
Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após os transplantes de CTM

(continuação)

Animal	Grupo	Momento	cor	aspecto	densidade	Proteínas (mg/dL)	glicose	Sangue oculto	Pandy	hemáceas	Céls nucleadas	Citologia
Hitler	TA	M0	incolor	límpido	1,004	20,8	++	neg	neg	2	2	
		M30	incolor	límpido	1,006	39,3	++	neg	neg	0	0	
		M60	incolor	límpido	1,004	34,9	++	4+	neg	1160	9	
		M90	incolor	límpido	1,004	34,3	++	neg	neg	1	0	
Árabe	TA	M0	incolor	límpido	1,004	39,5	++	neg	neg	4	0	
		M30	incolor	límpido	1,006	20,4	++	neg	neg	4	0	
		M60	incolor	límpido	1,006	24	++	+	neg	1	0	
		M90	incolor	límpido	1,004	18,6	+	neg	neg	3	1	
Tordilho	MO	M0	incolor	límpido	1,006	2,3	++	neg	neg	0	0	
		M30	incolor	límpido	1,006	59,8	++	neg	neg	0	3	
		M60	incolor	límpido	1,004	55,3	++	neg	neg	4	12	
		M90	incolor	límpido	1,006	49,7	++	neg	NR	11	5	
Baio	MO	M0	incolor	límpido	1,006	43,4	++	neg	neg	0	0	
		M30	incolor	límpido	1,006	49,7	++	neg	NR	1	1	
		M60	incolor	límpido	1,004	38,4	++	neg	neg	1	0	
		M90	incolor	límpido	1,006	22,2	++	neg	NR	0	9	
Gigante	MO	M0	incolor	límpido	1,006	56,7	++	neg	neg	1	0	
		M30	incolor	límpido	1,006	53,3	++	neg	NR	1	1	
		M60	incolor	límpido	1,004	58,8	++	neg	neg	5	2	
		M90	incolor	límpido	1,006	64,7	++	4+	neg	21750	18	LR
Mico Preto	MO	M0	incolor	límpido	1,006	33,5	++	neg	neg	0	0	
		M30	incolor	límpido	1,004	33,7	+	neg	NR	0	5	
		M60	incolor	límpido	1,004	26,5	++	neg	neg	14	24	
		M90	incolor	límpido	1,006	36,2	++	neg	NR	3	1	

TABELA 4
Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após os transplantes de CTM (conclusão)

Animal	Grupo	Momento	cor	aspecto	densidade	Proteínas (mg/dL)	glicose	Sangue oculto	Pandy	hemáceas	Céls nucleadas	Citologia
Taticia	CU	M0	incolor	límpido	1,004	28,8	++	neg	neg	1	0	LR
		M30	incolor	límpido	1,006	38,6	++	4+	neg	635	6	
		M60	incolor	límpido	1,004	29,6	++	neg	neg	1	1	
		M90	incolor	límpido	1,006	36	++	+	neg	0	1	
Priscilla	CU	M0	incolor	límpido	1,006	44	++	neg	neg	8	0	LR
		M30	incolor	límpido	1,006	41,1	++	+	neg	2	0	
		M60	incolor	límpido	1,006	50,2	++	+	neg	0	3	
		M90	incolor	límpido	1,006	43,8	++	neg	NR	0	8	
Bianca	CU	M0	incolor	límpido	1,006	69,7	++	neg	neg	1	0	LR e MOTT
		M30	incolor	límpido	1,006	60	++	+	neg	2	2	
		M60	incolor	límpido	1,006	61	++	+	neg	3	3	
		M90	incolor	límpido	1,006	66,5	++	+	neg	0	2	
Topázio	CU	M0	incolor	límpido	1,006	60	++	+	neg	11	1	
		M30	incolor	límpido	1,004	59,2	++	neg	neg	3	0	
		M60	incolor	límpido	1,006	69,2	++	neg	NR	0	2	
		M90	incolor	límpido	1,006	73,5	neg	neg	NR	1	10	

LR= linfócitos reativos; MOTT=célula de Mott.

6.2.3 Avaliação da eficácia do transplante intratecal de CTM em animais com sequelas neurológicas de MEP

Todas as aplicações se mostraram seguras em animais com sequelas neurológicas com o protocolo escolhido de sedação e da técnica do transplante.

As análises hematológicas demonstraram todos os valores dentro da normalidade para a espécie equina durante todos os momentos avaliados.

Todos os animais apresentaram mudanças no exame neurológico, mesmo que sutis, indicando uma melhora do estado neurológico inicial após o transplante com as CTM (Anexo 1). As avaliações neurológicas classificadas em graus de acordo com os momentos estão representadas na Figura 13, apesar de não haver diferença estatística, nota-se que houve uma tendência a diminuição do grau neurológico com o passar dos momentos.

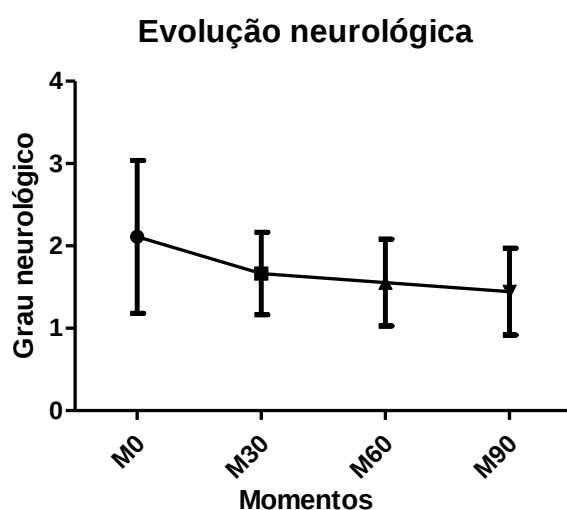


FIGURA 13: Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora decorrente de MEP durante os diferentes momentos no período de tratamento com CTM-TA.

As alterações encontradas no LCR foram aumento no número de células nucleadas em 5 animais. Também notou-se a presença de células atípicas: linfócitos reativos em 6 animais, sendo que em 3 destes esta alteração foi encontrada antes de iniciar o tratamento (M0), embora nenhum destes animais apresentaram aumento no número de células nucleadas. Porém, mesmo com estas alterações no LCR (sem diferença estatística), nenhum dos animais apresentou reação adversa, e pelo contrário, houve uma melhora na avaliação do quadro neurológico.

Os resultados do LCR estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5

Resultados do LCR de equinos com sequelas de MEP antes e após os transplantes de CTM

(continua)

Animal	Momento	cor	aspecto	densidade	Proteínas (mg/dL)	glicose	Sangue oculto	Pandy	hemáceas	Céls nucleadas	Citologia
Referência		incolor	límpido	1,004-1,008	5-100	+ / ++		neg		0-8	
1	M0	incolor	límpido	1,006	47,8	++	neg	neg	3	0	
	M30	incolor	límpido	1,006	44,4	++	neg	neg	2	1	
	M60	incolor	límpido	1,006	59,8	++	neg	neg	0	2	LR
	M90	incolor	límpido	1,004	49	++	traços	neg	50	0	
2	M0	incolor	límpido	1,006	56	++	+	neg	0	0	LR
	M30	incolor	límpido	1,004	52	++	neg	neg	0	0	
	M60	incolor	límpido	1,014	traços	traços	++	neg	29	2	
	M90	incolor	límpido	1,004	66,8	+	neg	neg	3	3	
3	M0	incolor	límpido	1,004	40,7	++	++++	neg	0	0	LR
	M30	incolor	límpido	1,008	40,3	+	neg	neg	1	3	
	M60	incolor	límpido	1,004	41,2	++	+++	neg	1	11	
	M90	incolor	límpido	1,006	41,7	++	++++	traços	5	3	
4	M0	incolor	límpido	1,004	40,5	++	traços	neg	2	2	LR
	M30	incolor	límpido	1,014	55,4	+	neg	neg	1	582	
	M60	incolor	límpido	1,004	61,8	++	++++	neg	12	13	
	M90	incolor	límpido	1,006	43,4	++	++++	traços	6	1	
5	M0	incolor	límpido	1,004	46,3	++	neg	neg	2	0	
	M30	incolor	límpido	1,006	67,4	++	++	neg	7	21	
	M60	incolor	límpido	1,006	traços	++	+++	neg	3	40	
	M90	incolor	límpido	1,006	1+	++	++++	neg	4750	70	
6	M0	incolor	límpido	1,005	48	++	neg	neg	0	0	
	M30	incolor	límpido	1,006	56,6	++	neg	neg	12	0	LR
	M60	incolor	límpido	1,006	57,1	++	neg	neg	8	0	
	M90	incolor	límpido	1,006	48,8	++	neg	neg	0	0	

TABELA 5

Resultados do LCR de equinos com sequelas de MEP antes e após os transplante de CTM

(conclusão)

Animal	Momento	cor	aspecto	densidade	Proteínas (mg/dL)	glicose	Sangue oculto	Pandy	hemáceas	Céls nucleadas	Citologia
7	M0	incolor	límpido	1,005	36,9	++	neg	neg	0	0	LR
	M30	incolor	límpido	1,006	46,8	++	neg	neg	9	0	
	M60	incolor	límpido	1,006	38,5	++	neg	neg	0	0	
	M90	incolor	límpido	1,005	39,9	++	neg	neg	1	0	
8	M0	incolor	límpido	1,006	51,8	++	neg	neg	3	0	
	M30	incolor	límpido	1,006	37,2	+	neg	neg	1	3	
	M60	incolor	límpido	1,004	53,3	++	traços	neg	1	2	
	M90	incolor	límpido	1,004	62,8	+	++++	neg	4	11	
9	M0	incolor	límpido	1,006	46,3	++	neg	neg	12	0	
	M30	incolor	límpido	1,006	27	+	+	neg	3	3	
	M60	incolor	límpido	1,006	51,8	++	neg	neg	2	6	
	M90	incolor	límpido	1,004	46	++	traços	neg	3	27	

LR= linfócitos reativos.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que as CTM de diversas fontes possuem a capacidade de expressar marcadores de superfície neurais mesmo sem indução neural, e de se diferenciar em células com fenótipo *neural-like* após diferentes protocolos de indução neural, inclusive com a presença de LCR durante o cultivo. Esses resultados foram semelhantes aos demonstrados em estudos anteriores (KUMAR et al., 2012; MAIA et al., 2012; TANG et al., 2012; CRUZ VILLAGRÁN et al., 2014; FARIVAR et al., 2015; GE et al., 2015).

Adicionalmente, o potencial terapêutico das CTM foi confirmado com a expressão de marcadores de superfície, onde as CTM-CU e TA expressaram marcação positiva para PDGF e PDGFR, e leve marcação para VEGF e VEGFR. As CTM-MO foram positivas para os marcadores PDGF, PDGFR e VEGF, e apresentou marcação negativa para VEGFR. Um estudo com CTM-CU também demonstrou que não houve a detecção de VEGF no meio condicionado (KUCHROO et al., 2014). Outros achados indicam que as vesículas extracelulares (VE) liberadas por CTM-TA podem contribuir para a angiogênese induzida pelas CTM-TA, e sugerem que o PDGF pode desencadear a liberação das VE com maior potencial angiogênico (LOPATINA et al., 2014).

Ao avaliarmos a marcação das CTM pela técnica de citometria de fluxo para marcadores de pluripotência e marcadores neurais, as CTM-MO apresentaram uma marcação muito baixa para todos os marcadores. Já as CTM-TA demonstraram uma maior marcação dos anticorpos de pluripotência do que as da CTM-MO, porém uma baixa expressão dos marcadores neurais. No entanto, as CTM-CU apresentaram maior marcação para os anticorpos neurais, nanog, β -III tubulina e GFAP, e também uma baixa marcação para os marcadores de pluripotência. Ao utilizar a técnica de PCR, foi demonstrado que CTM-SCU apresentaram expressão para Oct-4, nanog e Sox-2 (MOHANTY et al., 2014), e CTM derivadas de diversas fontes, inclusive CTM-MO, TA e CU, expressaram diversos marcadores de pluripotência (STANKO et al., 2014), o que não foi demonstrado pelo presente estudo. Já para os marcadores neurais, foi relatado que comumente as CTM de diversas fontes, inclusive do TA,

expressam β -III tubulina (FOUDAH et al., 2014), o que também difere do nosso estudo.

Quando cultivadas na presença de LCR, as CTM mantiveram sua viabilidade e imunofenotipagem, e ainda aumentaram sua capacidade proliferativa e migratória, sendo mais evidente nas CTM-MO. Outro estudo também demonstrou que o LCR promove a proliferação, inibe a apoptose, aumenta a velocidade migratória e a distância percorrida das CTM, fornecendo informações sobre a eficácia clínica das CTM para o tratamento de patologias do SNC (ZHU et al., 2014).

As CTM também secretaram interleucinas fundamentais para o papel imunomodulatório no SNC, como TGF- β , IL-6 e PGE2. Levando em consideração outro estudo que comparou CTM-MO, TA e SCU, este apresentou uma produção muito maior de IL-6 e PGE-2, porém somente após estimulação das CTM com fitohemaglutinina (PHA), e o TGF- β foi secretado por todas as fontes sem a necessidade de estímulo (CARRADE et al., 2012). Como no presente estudo utilizamos LPS como estímulo, este pode ser o motivo da discordância entre os resultados.

As CTM-MO secretaram mais TGF- β do que as CTM-TA, e as CTM-TA secretaram maior quantidade de PGE2 do que as CTM-MO, portanto pode ser que haja uma diferença no mecanismo de ação dependente da fonte de CTM. Estudos indicam que o TGF- β é de fundamental importância no SNC, tanto atenuando reações imunes (YOO et al., 2013), quanto protegendo contra a neurodegeneração, atuando na manutenção da integridade neuronal e na regulação da ativação microglial (BRIONNE et al., 2003). Em um modelo de trauma encefálico, o benefício terapêutico correlacionou-se com a secreção de PGE2 pelas CTM antes do tratamento, sugerindo que a medição de PGE2 poderia ser um marcador de potência muito útil para criar um índice de eficácia prevista das CTM para o tratamento desta enfermidade. A PGE-2 também é um importante fator imunomodulador expresso pelas CTM, e também um marcador valioso para a avaliação da eficácia terapêutica das CTM. Adicionalmente, as CTM-MO secretaram maior quantidade de PGE2 do que as CTM-TA (KOTA et al., 2017).

Não há um consenso sobre a melhor via para a administração de CTM no sistema nervoso central (JOYCE et al., 2010). Estudos utilizaram de forma

variável transplantes pela via intravenosa (LEE et al., 2010), intratecal (WANG et al., 2013), intranasal (DANIELYAN et al., 2009), intralesional e intracerebral (SHYU et al., 2006). Teoricamente, a injeção intratecal poderia ser mais eficaz, já que as CTM não teriam que passar pela barreira hematoencefálica (BHE). Sendo assim, vários estudos relataram efeitos benéficos após administração de CTM pela via intratecal para doenças do SNC (LINDVALL; KOKAIA, 2006; HARRIS et al., 2012; COHEN, 2013; KARUSSIS; PETROU; KASSIS, 2013; SAHRAIAN et al., 2014; JAROCHA et al., 2015) e utilizando CTM alogênicas (LIANG et al., 2009; YANG et al., 2010; DÍEZ-TEJEDOR et al., 2014).

Neste estudo, o transplante pelas vias AO, LS e entre C1-C2 foi tecnicamente fácil e seguro de se realizar, sem efeitos colaterais demonstrados nos cavalos. A distribuição caudal das CTM marcadas após o transplante AO e a falta de distribuição cranial após o transplante LS sugerem que as células estão progredindo na direção do fluxo de LCR, na ausência de qualquer lesão identificada da medula espinhal.

A menor persistência no local do transplante AO quando comparado ao LS é consistente com a avaliação subjetiva da migração das CTM. A migração caudal de CTM transplantada pelo espaço AO é provavelmente responsável por esta menor persistência.

A persistência relativamente baixa às 24 horas também observada com o transplante LS, apesar da falta de migração local demonstrada, é semelhante à persistência que foi relatada com após o transplante intralesional de CTM no tendão flexor digital superficial de equino (24% às 24 horas) (SOLE et al., 2013). Isso pode ser devido à distribuição sistêmica das CTM após o transplante, mas também pode refletir uma limitação da técnica de rastreamento. A persistência sub-ótima foi demonstrada após o transplante de CTM marcadas com ^{99m}Tc -HMPAO em cães (SPRIET et al., 2015). Embora seja mais difícil demonstrar em cavalos devido a limitações físicas na imagem do corpo inteiro (tamanho e atenuação do sinal), é provável que a persistência medida seja uma subestimação da persistência real das CTM devido a perda de marcação de algumas células.

A preocupação com a presença de marcador livre foi a justificativa para a realização de um animal controle. A distribuição semelhante das CTM radiomarcadas e o marcador livre sugerem que ambos estão se distribuindo

seguindo o fluxo do LCR. A menor persistência inicial do marcador livre pode ser explicada por uma distribuição mais rápida ou maior absorção sistêmica que pode ser explicada pelo menor tamanho do marcador em comparação com as CTM. A maior persistência as 24 horas com marcador livre pode ser explicada pela fixação de alguns dos marcadores em células locais. A absorção na região da tireoide observada com o transplante controle confirma a distribuição sistêmica do marcador livre e a absorção do tecnécio livre pela glândula tireóide.

A punção atlanto-occipital é a via de administração preferencial para facilitar a obtenção da maior concentração de CTM na área cervical. Dado que ambas as vias são seguras, determinar o melhor local para o transplante das CTM deve levar em conta a segurança para o cavalo (por exemplo, a anestesia geral não é necessária para a punção LS e pode ser mais segura para os animais que apresentam sinais neurológicos) e a localização da lesão (JOHNSON; CONSTANTINESCU, 2000; ALEMAN et al., 2007). Porém, embora a punção AO seja rotineiramente realizada sob anestesia geral (SCHWARZ; PIERCY, 2006), foi relatado a punção entre o espaço C1-C2 no cavalo em estação com sedação apropriada (PEASE; BEHAN; BOHART, 2012), sendo que utilizamos todas as vias no presente estudo.

A utilização da via entre as vértebras C1-C2 para transplante de CTM se mostrou viável e reproduzível de ser realizada a campo, inclusive com animais apresentando alterações neurológicas. Por ser uma via realizada com o animal em estação, com sedação, foi a via de escolha para a utilização em animais com sequela neurológica, evitando assim a anestesia geral (para punção AO) e as dificuldades de posicionar o animal pela via LS quando este apresenta alteração neurológica.

A via entre C1-C2 foi muito segura de ser realizada, mesmo para diversos transplantes no mesmo animal, sendo de maior facilidade quando comparada com as vias AO e LS, no entanto, requer o auxílio de ultrassonografia.

Ainda não se sabe a melhor fonte ou dose para se utilizar na terapia celular visando efeitos benéficos no sistema nervoso. Nosso estudo demonstrou que as CTM-MO, TA e CU possuem características relativamente semelhantes, e as que são distintas não selecionaram uma melhor fonte.

Todas as fontes foram seguras de serem sucessivamente transplantadas, no entanto, optamos por utilizar as CTM-TA para a terapia clínica devido sua facilidade de obtenção e de rápido crescimento *in vitro*.

Adicionalmente, a terapia alogênica com CTM-TA se mostrou eficaz no tratamento de sequelas neurológicas decorrente de mieloencefalite equina por protozoário (MEP), apesar de não ter sido demonstrada diferença ($p>0,05$), todos os animais apresentaram melhora desde o início do tratamento. Do mesmo modo, diversos estudos tem demonstrado a eficácia da terapia com CTM para enfermidades do SNC (HARRIS et al., 2012; JARROCHA et al., 2015; ZEIRA et al., 2015; CHUNG et al., 2016; CUI et al., 2017). Alguns animais (3/9) apresentavam enfermidades concomitantes com a sequela de MEP, como pneumonia, artrose e escoliose, o que dificultou a avaliação neurológica. Adicionalmente, o grupo de animais com sequela de MEP foi bem heterogêneo, contendo desde casos crônicos (anos de evolução) a mais recentes (meses), e sinais neurológicos com graus muito diversos, com animais iniciando o tratamento com grau 3, e ao mesmo tempo outros animais iniciando com grau neurológico 1. Essa heterogeneidade dificultou a análise estatística dos resultados, bem como o entendimento da terapia com as CTM propostas, pois não pudemos concluir em quais momentos (agudo ou crônico) ou grau neurológico a terapia seria mais eficaz.

A dose terapêutica ideal para o SNC também não é conhecida, havendo uma grande divergência na literatura: 2 e 5 transplantes pela via intratecal com doses de 2-10 milhões de células a cada 3 meses (HARRIS; VYSHKINA; SADIQ, 2016); uma única aplicação na dose de 2 milhões de células via intratecal, 4 milhões de CTM via intra-arterial e de 500 mil células/kg via intravenosa (ZEIRA et al., 2015); 2 milhões de células pela via intravenosa (CUI et al., 2017). Na busca de uma dose compatível com equinos, optamos por testar a segurança com 100 milhões de CTM, e para a eficácia clínica utilizamos 3 transplantes com 50 milhões de CTM. Os resultados do nosso estudo demonstraram que uma dose alta é segura, e a dose terapêutica sugerida pode ser eficaz, porém é necessário um estudo homogêneo com um maior número de animais para um completo entendimento de como as CTM estariam demonstrando maiores efeitos benéficos para esta enfermidade.

Contudo, o presente estudo demonstrou que as CTM são uma possibilidade de terapia para as enfermidades do SNC, pois seu comportamento na presença de LCR demonstra efeitos positivos. É uma terapia segura mesmo em sucessivas doses, e ainda eficaz para sequelas crônicas em medula espinhal decorrentes da MEP. Adicionalmente, o transplante pela via intratecal através do espaço entre C1-C2 demonstrou ser mais viável para ser realizado a campo e em animais que apresentam sinais neurológicos.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- As CTM-MO, CTM-TA e CTM-CU não apresentaram nenhuma característica distinta para que pudesse ser escolhida uma fonte principal para a terapia do SNC
- As CTM demonstraram a manutenção de suas propriedades quando cultivadas na presença de LCR, demonstrando que sua utilização no SNC é viável
- Após o transplante em animais saudáveis pela via AO, as CTM se distribuíram ao longo de todo o espaço subaracnóide, em contrapartida, após o transplante pela via LS as CTM permaneceram no local do transplante, sugerindo que a via AO seria melhor para a distribuição das CTM no SNC
- O transplante intratecal de altas doses (100 milhões) de CTM é seguro tanto pela via lombo-sacra (LS) quanto pela via atlanto-occipital (AO)
- Transplantes sucessivos (3 aplicações) de 50 milhões de CTM utilizando o espaço entre as vértebras C1-C2 com o animal em estação é seguro em animais sadios e com sequelas neurológicas, e viável de ser realizada a campo, não inferindo riscos ao animal
- A terapia com 3 doses de 50 milhões de CTM-TA alogênicas com intervalo de 30 dias, apresentou efeitos positivos na melhora clínica de sequelas neurológicas em decorrência de MEP em equinos

BIBLIOGRAFIA

AL DELFI, I. R. et al. Canine mesenchymal stem cells are neurotrophic and angiogenic: An in vitro assessment of their paracrine activity. **The Veterinary Journal**, v. 217, p. 10-17, 11// 2016.

ALEMAN, M. et al. Ultrasound-assisted collection of cerebrospinal fluid from the lumbosacral space in equids. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 3, p. 378-384, 2007/02/01 2007.

ALT, E. U. et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. **Stem Cell Research**, v. 8, n. 2, p. 215-225, 3// 2012. ISSN 1873-5061. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506111001565> >.

AMEMORI, T. et al. Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2015. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0255-2> >.

BARBERINI, D. J. et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, 2014.

BARTHOLOMEW, S. et al. Collection of equine cord blood and placental tissues in 40 Thoroughbred mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 8, p. 724-728, 2009. ISSN 2042-3306. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.2746/042516409X429446> >.

BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 109-123, 21/09/2011 2011. ISSN 0272-2712. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272271210001551> >.

BOURZAC, C. et al. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 6, p. 519-527, 2010. ISSN 2042-3306. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x> >.

BRIONNE, T. C. et al. Loss of TGF- β 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. **Neuron**, v. 40, 2003.

BURK, J. et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 98-106, 07/02/2013 2013.

CAMPOS, L. L. et al. Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 278-286, 2017.

CARRADE, D. D. et al. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. **Cytotherapy**, v. 13, n. 10, p. 1180-1192, 07/02/2013 2011a. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2011.602338> >.

CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species. **Comparative Medicine**, v. 63, n. 3, p. 207-217, 06/06/2015 2013. ISSN 1532-0820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690426/> >.

CARRADE, D. D. et al. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells(). **Cell medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 16/06/2013 2012.

CARRADE, D. D. et al. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cytotherapy**, v. 13, n. 4, p. 419-430, 07/02/2013 2011b. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2010.536213> >.

CARVALHO, A. D. et al. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. **J Equine Vet Sci**, v. 31, 2011.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **STEM CELLS**, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 08/09/2012 2007.

CHELLUBOINA, B.; DINH, D. H.; VEERAVALLI, K. K. Transdifferentiation of differentiated stem cells contributes to remyelination. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2015. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0186-y> >.

CHEN, B. K. et al. A safety study on intrathecal delivery of autologous mesenchymal stromal cells in rabbits directly supporting Phase I human trials. **Transfusion**, p. n/a-n/a, 27/04/2015 2014.

CHEN, J. et al. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1005-1011, April 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://stroke.ahajournals.org/content/32/4/1005.abstract> >.

CHENG, Q. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation. **Brain Research**, v. 1594, n. 0, p. 293-304, 04/04/2015 2015. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899314014875> >.

CHUNG, H. J. et al. Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of human-umbilical cord blood stem cells in rats. **J Vet Sci**, v. 17, n. 1, p. 97-102, Mar 2016.

COHEN, J. A. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 333, n. 1–2, p. 43-49, 05/04/2015 2013.

CRUZ VILLAGRÁN, C. et al. Differentiation of Equine Mesenchymal Stromal Cells into Cells of Neural Lineage: Potential for Clinical Applications. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 12, 09/04/2015 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/891518> >.

CUI, Y. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 291-301, 3/1/ 2017.

DAI, G. et al. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. **Brain Research**, v. 1533, p. 73-79, 10/2/ 2013. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899313011190> >.

DANIELYAN, L. et al. Intranasal delivery of cells to the brain. **European Journal of Cell Biology**, v. 88, n. 6, p. 315-324, 6// 2009.

DE SCHAUWER, C. et al. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry**

Part A, v. 81A, n. 4, p. 312-323, 2012. ISSN 1552-4930. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22026> >.

DÍEZ-TEJEDOR, E. et al. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 23, 2014.

DIRIKOLU, L.; FOREMAN, J. H.; TOBIN, T. Current therapeutic approaches to equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 4, p. 482-491, 27/01/2014 2013. ISSN 0003-1488. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2460/javma.242.4.482> >. Acesso em: 2015/05/06.

DOMBROWSKI, Y. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. v. 20, n. 5, p. 674-680, May 2017.

DRELA, K. et al. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. **Cytotherapy**, v. 18, n. 4, p. 497-509, 2013. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.01.006> >. Acesso em: 2016/05/11.

DUBEY, J. P. et al. An update on Sarcocystis neurona infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1-2, p. 1-42, 01/04/2015 2015.

DUBEY, J. P. et al. A review of Sarcocystis neurona and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 89-131, 01/04/2015 2001. ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401700003848> >.

FABIAN, C. et al. Distribution pattern following systemic mesenchymal stem cell injection depends on the age of the recipient and neuronal health. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 85, 2017.

FARIVAR, S. et al. Neural Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells by Cerebrospinal Fluid. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 9, n. 1, p. 87-93, 28/04/2015 2015. ISSN 1735-4668

2008-0700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322504/> >.

FOUDAH, D. et al. Expression of Neural Markers by Undifferentiated Mesenchymal-Like Stem Cells from Different Sources. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 16, 2014.

GE, W. et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neural Stem Cells Using Cerebrospinal Fluid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 71, n. 1, p. 449-455, 10/04/2015 2015. ISSN 1085-9195. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-0222-z> >.

GLAVASKI-JOKSIMOVIC, A.; BOHN, M. C. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 247, n. 0, p. 25-38, 25/05/2014 2013.

GU, W. et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord. **Neuropathology**, v. 30, n. 3, p. 205-217, 2010. ISSN 1440-1789. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01063.x> >.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M. et al. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 1, p. 11-11, 01/28

09/26/received

11/21/revised

12/12/accepted 2013. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3706777/> >.

GUTIERREZ-NIBEYRO, S. D. Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 363-371, 07/02/2013 2011.

HARRIS, V. K.; VYSHKINA, T.; SADIQ, S. A. Clinical safety of intrathecal administration of mesenchymal stromal cell-derived neural progenitors in multiple sclerosis. **Cytotherapy**, v. 18, n. 12, p. 1476-1482, Dec 2016.

HARRIS, V. K. et al. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 313, n. 1-2, p. 167-177, 2/15/ 2012.

HIYAMA, A. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 5, p. 589-

600, 2008. ISSN 1554-527X. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1002/jor.20584> >.

HOFER, H. R.; TUAN, R. S. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. **Stem Cell Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 131, Sep 09 2016.

HOWE, D. K.; MACKAY, R. J.; REED, S. M. Equine Protozoal Myeloencephalitis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 659-675, 01/04/2015 2014. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.012> >. Acesso em: 2015/05/06.

HOYNOWSKI, S. M. et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2, p. 347-353, 10/19/ 2007. ISSN 0006-291X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X07016609> >.

HU, D. Z. et al. Upregulated gene expression of local brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor after intracisternal administration of marrow stromal cells in rats with traumatic brain injury. **Chin J Traumatol**, v. 8, n. 1, p. 23-6, 07/04/2015 2005. ISSN 1008-1275 (Print)

1008-1275.

HU, D. Z.; ZHOU, L. F.; ZHU, J. H. Marrow stromal cells administrated intracisternally to rats after traumatic brain injury migrate into the brain and improve neurological function. **Chin Med J (Engl)**, v. 117, n. 10, p. 1576-8, 08/04/2015 2004.

HYATT, A. J. T. et al. Mesenchymal stromal cells integrate and form longitudinally-aligned layers when delivered to injured spinal cord via a novel fibrin scaffold. **Neuroscience Letters**, v. 569, n. 0, p. 12-17, 05/04/2015 2014. ISSN 0304-3940. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394014002225> >.

JARROCHA, D. et al. Continuous Improvement After Multiple Mesenchymal Stem Cell Transplantations in a Patient With Complete Spinal Cord Injury. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 661-672, // 2015.

JOHNSON, P. J.; CONSTANTINESCU, G. M. Collection of cerebrospinal fluid in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2000.

JOYCE, N. et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. **Regen Med**, v. 5, 2010.

JUNG, D.-I. et al. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 285, n. 1–2, p. 67-77, 22/04/2015 2009.

KARUSSIS, D.; PETROU, P.; KASSIS, I. Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 324, n. 1–2, p. 1-9, 01/04/2015 2013.

KISHK, N. A.; ABOKRYSHA, N. T.; GABR, H. Possible induction of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like demyelinating illness by intrathecal mesenchymal stem cell injection. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 310-312, 2013.

KOERNER, J. et al. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, 2006.

KOTA, D. J. et al. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Traumatic Brain Injury. **STEM CELLS**, v. 35, n. 5, p. 1416-1430, 2017.

KUCHROO, P. et al. Paracrine Factors Secreted by Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Angiogenesis In Vitro by a VEGF-Independent Pathway. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 4, p. 437-450, 2015/02/15 2014.

KUMAR, B. M. et al. Neurogenic and cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from minipig bone marrow. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 749-757, 25/05/2014 2012. ISSN 0034-5288. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528811003717> >.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. **Equine Vet J**, v. 45, 2013.

LARONI, A.; ROSBO, N. K. D.; UCCELLI, A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases: Immunoregulation beyond neuroprotection. **Immunology Letters**, v. 168, n. 2, p. 183-190, 12// 2015.

LE BLANC, K.; DAVIES, L. C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. **Immunol Lett**, v. 168, n. 2, p. 140-6, Dec 2015.

LEE, J.-H. et al. Schwann cell-like remyelination following transplantation of human umbilical cord blood (hUCB)-derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 300, n. 1, p. 86-96, 2011. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2010.09.025> >. Acesso em: 2016/07/10.

LEE, J. et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. **Neuropathology**, v. 23, n. 3, p. 169-180, 07/04/2015 2003. ISSN 1440-1789. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1789.2003.00496.x> >.

LEE, J. S. et al. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. **STEM CELLS**, v. 28, n. 6, p. 1099-1106, 2010.

LIANG, J. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 15, n. 5, p. 644-646, May 1, 2009 2009.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1094-1096, 02/04/2015 2006.

LINS, L. A.; FEIJÓ, L. S.; NOGUEIRA, C. E. W. Mieloencefalite protozoária equina nas regiões da Campanha e do sul do Rio Grande do Sul no período de 1998-2006. **2014**, v. 11, n. 3, p. 3, 2014-09-25 2014.

LIU, J. et al. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 2, p. 185-191, 05/04/2015 2013.

LIU, W. et al. Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits. **Neuroscience Letters**, v. 434, n. 2, p. 160-164, 3/28/ 2008. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394008000323> >.

LOPATINA, T. et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. **Cell Communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 26, April 11 2014.

LU, L. et al. [Mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cells in the up-regulation of regulatory T cells by transforming growth factor β 1 in systemic lupus erythematosus]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 93, n. 13, p. 980-983, 2013/04// 2013.

LUNN, D. P.; MAYHEW, I. G. The neurological evaluation of horses. **Equine Veterinary Education**, v. 1, n. 2, p. 94-101, 1989.

MAIA, L. et al. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. **BMC Vet Res**, v. 11, n. 1, p. 63, 01/04/2015 2015.

MAIA, L. et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 6, p. 618-624, 2013.

MAIA, L. et al. Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 444-452, 25/09/2014 2012. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000500013&nrm=iso >.

MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 3, p. 347-356, 25/05/2015 2011. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019701861100204X> >.

MAMBELLI, L. I. et al. Characterization of Equine Adipose Tissue–Derived Progenitor Cells Before and After Cryopreservation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 1, p. 87-94, 2009/03/01 2009. ISSN 1937-3384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0186> >. Acesso em: 2016/07/09.

MAZZINI, L. et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 1, p. 229-237, 08/04/2015 2010.

MELIEF, S. M. et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. **STEM CELLS**, v. 31, n. 9, p. 1980-1991, 2013.

MOHANTY, N. et al. Immunophenotypic characterization and tenogenic differentiation of mesenchymal stromal cells isolated from equine umbilical cord blood. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 50, n. 6, p. 538-48, Jun 2014.

NAFISSI, S. et al. Intraspinal delivery of bone marrow stromal cell-derived neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A safety and feasibility study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 362, p. 174-181, 3/15/ 2016. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X1630051X> >.

NIXON, A. J. et al. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **Am J Vet Res**, v. 69, 2008.

NÖTH, U. et al. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 7–8, p. 765-783, 23/08/2014 2010.

PARR, A. M.; TATOR, C. H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. **Bone Marrow Transplant**, v. 40, n. 7, p. 609-619, 23/04/2015 2007. ISSN 0268-3369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705757> >.

PAUL, G.; ANISIMOV, S. V. The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2246-2256, 25/05/2015 2013. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908413002356> >.

PEASE, A.; BEHAN, A.; BOHART, G. ULTRASOUND-GUIDED CERVICAL CENTESIS TO OBTAIN CEREBROSPINAL FLUID IN THE STANDING HORSE. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 53, n. 1, p. 92-95, 2012.

PEIXOTO, A. et al. Mieloencefalite protozoária eqüina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 4, n. 1, p. 30-34, 2003.

PENHA, E. M. et al. Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 8, 05/04/2015 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/437521> >.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 27, 2011.

PIGOTT, J. H. et al. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156, n. 1-2, p. 99-106, 12/07/2014 2013. ISSN 0165-2427. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242713002511> >.

PUSTERLA, N. et al. Comparison of prevalence factors in horses with and without seropositivity to *Neospora hughesi* and/or *Sarcocystis neurona*. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 332-334, 5// 2014. ISSN 1090-0233. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023314000999> >.

RANERA, B. et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 144, 2011.

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, p. 1-17, 2015.

RECH, R.; BARROS, C. Neurologic Diseases in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 281-306, 8// 2015.

REED, S.; GRANT, B.; NOUT, Y. Cervical Vertebral Stenotic Myelopathy. **Equine Neurology**, p. 283-298, 2008.

REED, S. M. et al. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 491-502, 2016/03// 2016.

RICHARDSON, L. E. et al. Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 409-416, 2007. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.009> >. Acesso em: 2016/07/09.

ROBINSON, A. M. et al. The neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells are dose-dependent in TNBS colitis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 87, 2017.

RYAN, J. M. et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 2, p. 8-8, 03/03/2011 2005. ISSN 1476-9255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1215510/> >.

SAAD, M. et al. Glioproliferative Lesion of the Spinal Cord Derived from Intrathecal Administration of Stem Cells (P4.234). **Neurology**, v. 86, n. 16 Supplement, April 5, 2016 2016. Disponível em: < http://www.neurology.org/content/86/16_Supplement/P4.234.abstract >.

SAHRAIAN, M. A. et al. Intrathecal Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Follow-Up Study for Five Years After Injection. **Arch Neurosci**, v. 1, n. 2, p. 71-75, 2014.

SATTI, H. S. et al. Autologous mesenchymal stromal cell transplantation for spinal cord injury: A Phase I pilot study. **Cytotherapy**, v. 18, n. 4, p. 518-522, 2016.

SAVILLE, W. J. et al. Evaluation of risk factors associated with clinical improvement and survival of horses with equine protozoal myeloencephalitis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 217, n. 8, p. 1181-5, Oct 15 2000. ISSN 0003-1488 (Print)

0003-1488.

SCHWARZ, B.; PIERCY, R. J. Cerebrospinal fluid collection and its analysis in equine neurological disease. **Equine Veterinary Education**, v. 18, n. 5, p. 243-248, 2006.

SHYU, W.-C. et al. Intracerebral Peripheral Blood Stem Cell (CD34+) Implantation Induces Neuroplasticity by Enhancing β 1 Integrin-Mediated Angiogenesis in Chronic Stroke Rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 13, p. 3444-3453, March 29, 2006 2006.

SOLE, A. et al. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99 m) Tc-HMPAO. **Equine Vet J**, v. 44, 2012a.

SOLE, A. et al. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using 99mTc-HMPAO. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 594-599, 07/02/2012 2012b. ISSN 2042-3306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00530.x> >.

SOLE, A. et al. Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb. **Equine Vet J**, v. 45, 2013.

SONG, M. S. et al. In vitro validation of effects of BDNF-expressing mesenchymal stem cells on neurodegeneration in primary cultured neurons of APP/PS1 mice. **Neuroscience**, v. 307, p. 37-50, 10/29/ 2015. ISSN 0306-4522. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452215007344> >.

SPEES, J. L.; LEE, R. H.; GREGORY, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 125, 2016/08/31 2016.

SPRIET, M. et al. SCINTIGRAPHIC TRACKING OF MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER PORTAL, SYSTEMIC INTRAVENOUS AND SPLENIC ADMINISTRATION IN HEALTHY BEAGLE DOGS. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 56, n. 3, p. 327-334, 2015.

STANKO, P. et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 158, n. 3, p. 373-7, Sep 2014.

STELMANN, U. J. P.; AMORIM, R. M. Mieloencefalite protozoária equina. **Veterinária e Zootecnia**, p. 163-176, 2010.

TANG, Y. et al. Neural progenitor cells derived from adult bone marrow mesenchymal stem cells promote neuronal regeneration. **Life Sciences**, v. 91, n. 19–20, p. 951-958, 27/06/2014 2012. ISSN 0024-3205. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320512005048> >.

UCCELLI, A. et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 24, n. 1, p. 59-64, 15/04/2015 2011. ISSN 1521-6926. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521692611000053> >.

VAQUERO, J. et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? **Neurosci Lett**, v. 398, 2006.

VAQUERO, J. et al. Repeated subarachnoid administrations of autologous mesenchymal stromal cells supported in autologous plasma improve quality of life in patients suffering incomplete spinal cord injury. **Cytotherapy**, v. 19, n. 3, p. 349-359, 2017.

VILLANOVA, M.; BACH, J. R. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy Outcomes for Three Patients with Spinal Muscular Atrophy Type 1. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 94, n. 5, p. 410-415, 2015.

WANG, S. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1532, p. 76-84, 9/26/ 2013.

WITONSKY, S. G. et al. Horses Experimentally Infected with *Sarcocystis neurona* Develop Altered Immune Responses In Vitro. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1047-1054, 24/03/2015 2008. ISSN 0022-3395. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1441.1> >. Acesso em: 2015/05/06.

YANG, W.-Z. et al. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 75-75, 08/03

04/02/received

08/03/accepted 2010. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2922090/> >.

YANO, S. et al. In Vivo Fluorescence Tracking of Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into a Pneumatic Injury Model of Rat Spinal Cord. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 8, p. 907-918, 07/04/2015 2005. ISSN 0897-7151. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2005.22.907> >. Acesso em: 2015/05/06.

YAZDANI, S. O. et al. A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat. **Tissue and Cell**, v. 44, n. 4, p. 205-213, 8// 2012. ISSN 0040-8166. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816612000237> >.

YOO, S. W. et al. Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- β . **Neurobiol Dis**, v. 58, 2013.

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, p. 1-11, 2015.

ZHANG, J. et al. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, p. 234, 12/01/2015 2015.

ZHOU, Z. et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. **Cytotherapy**, v. 15, n. 4, p. 434-448, 2013. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.015> >. Acesso em: 2016/07/10.

ZHU, M. et al. Human Cerebrospinal Fluid Regulates Proliferation and Migration of Stem Cells Through Insulin-Like Growth Factor-1. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 2, p. 160-171, 27/04/2015 2014. ISSN 1547-3287. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2014.0076> >. Acesso em: 2015/05/06.

10 TRABALHOS CIENTÍFICOS

10.1 Trabalho a ser enviado para a revista “*Stem Cell Research & Therapy*”.

Intrathecal allogeneic mesenchymal stem cell transplantation into healthy horses: feasibility, safety and cell distribution

Danielle Jaqueta Barberini¹ (daniellebarberini@yahoo.com.br)

Monica Aleman² (mraleman@ucdavis.edu)

Fabio Aristizabal³ (faristi@ucdavis.edu)

Mathieu Spriet³ (mspriet@ucdavis.edu)

Naomi J. Walker¹ (njwalker@ucdavis.edu)

Larry D. Galuppo³ (ldgaluppo@ucdavis.edu)

Kevin D. Woolard¹ (kdwoolard@ucdavis.edu)

Rogério Martins Amorim⁴ (rmamorim@fmvz.unesp.br)

Dori L. Borjesson¹ (dlborjesson@ucdavis.edu) *

¹Veterinary Institute for Regenerative Cures and the Department of Pathology, Microbiology & Immunology, University of California, Davis, USA

²Department of Medicine & Epidemiology, University of California, Davis, USA

³Department of Surgical & Radiological Sciences, University of California, Davis, USA

⁴Department of Veterinary Clinics, São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, SP, Brazil

*corresponding author

ABSTRACT

Background: Mesenchymal stem cells (MSC) are a promising therapy in humans and animals with neurologic diseases due to their immunomodulatory, anti-inflammatory, neuroprotective and neuroregenerative potential. It is currently unknown if intrathecal administration of a high dose of allogeneic MSC is safe and if MSC migrate throughout the vertebral canal, regardless of location of administration. Large animal models can often provide more relevant pre-clinical information on safety, cell dose, route of administration and stem cell movement in vivo to inform human clinical trials. The aims of this study were to evaluate the safety of intrathecal injection of high dose allogeneic adipose derived-MSC (ASC) and to assess the distribution of ASC after atlanto-occipital (AO) and lumbosacral (LS) injection. We hypothesized that intrathecal injection of allogeneic ASC would be safe and that ASC would distribute throughout the subarachnoid space after both LS and AO injection.

Methods: Six healthy horses received 100×10^6 allogeneic ASC via AO (n=3) or LS injection (n=3). For 2 of these horses, ASC were radiolabeled with Technetium and injected AO (n=1) or LS (n=1). Scintigraphic images were obtained immediately post-injection and at 30 mins, 1 h, 5 h and 24 h after injection. Neurological examinations were performed daily and blood and cerebrospinal fluid (CSF) were evaluated prior to and 30 days after injection.

Results: There were no significant alterations in blood, CSF or neurological examinations at any point after either AO or LS ASC injection. Radioactive signal could be identified all the way to the lumbar area after AO ASC injection. After LS injection, the signal extended caudally but only minimal radioactive signal extended further cranially.

Conclusions: The intrathecal injection of allogeneic ASC was safe and easy to perform in horses. The AO administration of ASC resulted in better distribution within the entire subarachnoid space in healthy horses.

Keywords: mesenchymal stem cells; intrathecal; neurology; scintigraphy; adipose tissue; cerebrospinal fluid

BACKGROUND

Mesenchymal stem cells (MSC) are a promising alternative therapy in humans and animals with neurologic diseases due to their immunomodulatory, anti-inflammatory, neuroprotective and neuroregenerative potential [1-6]. Several neurological disorders in humans have raised particular interest for stem-cell based therapy and have been studied in experimental studies and clinical trials [7-13]. Horses suffer from a wide range of traumatic, degenerative, inflammatory and infectious diseases and disorders of the nervous system that can result in a range neurological problems and can result in euthanasia [14-17]. These neurological disorders affecting the spinal cord can present a therapeutic challenge [14, 15, 18, 19] and many horses have ongoing neurological sequelae post therapy.

Preliminary studies have demonstrated the safety of intrathecal MSC administration in rats [20], humans [21], dogs [22], rabbits [23] and horses (low dose, autologous, bone marrow derived) [24]. MSC could potentially be administered intrathecally to horses at 3 different sites: atlanto-occipital (AO) [25] cisterna, intervertebral space between first and second cervical vertebrae (C1-C2) [26], and lumbosacral (LS) space [25]. Site selection could depend on

neuroanatomical localization of lesions (administration site preferred closest to the lesion), clinician's expertise, patient cooperation, and pharmacological protocol (e.g. sedation versus general anesthesia) [27]. It is currently unknown if MSC administered intrathecally would be able to migrate throughout the subarachnoid space. Developing protocols to administer allogeneic MSC would permit immediate cell therapy in acute and subacute neurological diseases and would eliminate variation in ex vivo expansion that can hinder autologous cell use, especially in older animals and humans [28]. These types of pre-clinical pilot studies in large animals can help determine safety of regenerative medicine therapies and define ideal cell dose, route of administration and expectations for cell trafficking after cell administration prior to human clinical trials [29].

The objectives of this study were to 1) determine if the intrathecal administration of a relatively high number of allogeneic ASC (100×10^6) would be well-tolerated in healthy horses and 2) assess the distribution of ASC after both LS and AO administration using scintigraphy. We hypothesized that intrathecal administration of allogeneic ASC into healthy horses would be safe, as measured by clinical neurological evaluation, bloodwork and cerebrospinal fluid (CSF) analysis, and that ASC would distribute throughout the subarachnoid space after both LS and AO injection.

METHODS

Animal Selection

Six clinically healthy adult mares of Thoroughbred (n = 2), Quarter Horse (n = 2), and Warmblood (n = 2) breeds from Center of Equine Health (CEH), UC

Davis were selected for the study. The mares' age ranged from 6 to 21 years of age (mean 12 years). The protocol was approved by UC Davis IACUC Protocol #: 18785. All mares were determined to be healthy based on a normal physical and neurological examination, performed by a board certified equine internal medicine and neurology specialist, and by baseline bloodwork (complete blood count and serum biochemical profile).

Study Design

Six horses were enrolled. Three horses were randomly assigned to receive ASC via AO injection and 3 horses received ASC via LS injection. One horse from each group received ASC radiolabeled with with ^{99m}Tc -HexaMethyl-Propylene-Amine-Oxyme (^{99m}Tc -HMPAO) for cell tracking studies. A control AO injection of ^{99m}Tc -HMPAO without ASC was performed in one horse. Blood (jugular venipuncture) and CSF were collected prior to and after ASC injection (day 0 and day 30, end of study). Complete neurological clinical examinations were performed prior to ASC injection and once/day for 30 days (end of study).

Adipose derived-MSC (ASC)

Low passage, allogeneic ASC were used (P2-P4). These ASC were obtained from UC Davis Veterinary Medical Teaching Hospital (VMTH) Regenerative Medicine Laboratory (RML). These samples were originally submitted for ASC expansion for autologous patient treatment. Excess cells not used for treatment were donated for research purposes, with written owner consent. Cryopreserved ASC were thawed, washed and expanded in culture exactly as previously described [6], the same ASC line was used for all cell

injections. Prior to injection, the ASC were washed with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS - Gibco® by Life technologies™, Carlsbad, CA, US) and resuspended at 20 million cells/mL in injectable saline (total 100 million cells). Cells were kept on ice until injection.

CSF collection and analysis

CSF was collected utilizing published anatomical landmarks from the AO or LS space prior to and at 30 days post ASC injection. For the AO tap, in brief, horses were sedated with xylazine (0.4 mg/kg IV) and butorphanol (0.01mg/kg IV), induced with midazolam (0.06 mg/kg IV) and ketamine (2.2 mg/kg IV), and maintained under general anesthesia with isoflurane. Horses were positioned in lateral recumbency, the area was aseptically prepared and a spinal needle (18G, 3.5 inches) was inserted parallel to the ground with the needle pointing to the direction of the mandible. The subarachnoid space was penetrated and CSF obtained. For the LS tap, in brief, horses were sedated with detomidine hydrochloride (0.01 mg/kg IV) and butorphanol (0.01 mg/kg IV). The area was clipped and aseptically prepared. Subcutaneous tissue was infiltrated with lidocaine hydrochloride (1mL). A spinal needle (18G, 6 inches) was inserted perpendicular to the skin and the subarachnoid space was penetrated, CSF was collected by gentle aspiration. The CSF was submitted for complete cytological analysis. Due to the observed and reported seroprevalence in our area [30], an immunofluorescent antibody test (IFAT) for the detection of antibodies against *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi*, the causative agents of equine protozoal myeloencephalitis (EPM), was done concurrently on serum and CSF.

Intrathecal ASC injection

100 x 10⁶ ASC were injected in 5 mL of sterile saline either AO or LS (depending on group, n=3 each) immediately following CSF collection. One horse in each group received Tc-labeled ASC and one horse was injected AO with free label (Tc-HMPAO without ASC; control) after the study was completed.

Scintigraphic tracking of ASC

Cell Labeling:

ASC were labeled with 20 mCi of ^{99m}Tc-HMPAO (AnazaoHealth, Tampa, FL, US) as previously described [31, 32] with minor modifications as follows. ASC were resuspended in a small volume of media with 10% fetal bovine serum (~0.5 ml). HMPAO (reconstituted in saline) was added to the ^{99m}Tc and incubated for 5 minutes. Cells were added to make a final concentration of 125 µg/mL HMPAO, 20 mCi^{99m} Tc for cell loading (22 mins). After cell loading, ASC were washed twice with saline (first wash contained 5% autologous serum), and resuspended in sterile saline. 100 million labeled cells in 5 mL were injected. An aliquot of cells were used to determine viability and label persistence. Labeling efficiency and label persistence at 6 h were assessed as previously described [31, 32]. Cell viability at 6 h was assessed on a sample of ASC using the trypan blue exclusion test. For the control injection (no ASC), HMPAO was combined with ^{99m}Tc (125µg HMPAO + 10mCi Tc for 5 minutes) and then 5mCi ^{99m}Tc-HMPAO was diluted to 5mL with saline for injection.

Scintigraphic Imaging:

Images were acquired using a gamma camera (IS2 medical Systems, Ottawa, Canada) with a low-energy all-purpose collimator set at 140keV photoelectric peak and 20% symmetrical window. Lateral images of the spine

from the head to the sacrum were obtained using a 1-minute static acquisition immediately post-injection and at 30 minutes, 1 h, 5 h and 24 h after injection. Small radioactive markers were placed as landmarks for scintigraphic acquisition. Radiographs (Eklin EDR-6, Sound-Eklin, Carlsbad, California) of the vertebral column from the head to the sacrum were obtained the day after scintigraphy with radiopaque markers in the similar location as the radioactive markers.

Scintigraphic Interpretation:

The presence and distribution of the radioactive signal were assessed subjectively by a board certified radiologist, using the radioactive markers for anatomical localization based on correlation with the radiographs. The persistence at the injection site was quantified over time. A region of interest (ROI) was drawn using the free-hand ROI tool of the DICOM viewer software (Osirix Foundation, Geneva, Switzerland). Persistence was defined as the ratio of detected counts, corrected for decay, in the ROI at each time point divided by the number of counts initially present in the ROI.

Statistical analysis

CSF parameters prior to and after ASC injection were compared using a paired students T test. A *P* value of <0.05 was considered significant for all analyses.

RESULTS

High dose intrathecal ASC injection was safe and well-tolerated

ASC administration was readily performed in both standing (LS) and laterally recumbent anesthetized horses (AO). No adverse events were noted during or after ASC administration. The complete blood count and biochemical

profile showed no alterations prior to or after ASC injection (with or without ^{99m}Tc -HMPAOTc), for both AO and LS groups. All mares had normal physical and neurological examinations prior and after the administration of ASC including the 30 day re-check examination post-injection.

High dose intrathecal administration of ASC does not alter CSF parameters

Data from CSF analyses prior to and after ASC administration are detailed in Table 1.

Table 1. Summary of CSF analytes prior to and after (30 days) intrathecal ASC administration.

Site of Collection	Total Protein (mg/dl)		Nucleated cellcount (cells/ μl)		Neutrophil (%)		Small mono (%)		Large mono (%)	
	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>
LS	84	72	13	7	0	10	59	89	41	1
LS	59	67	9	13	2	0	88	91	10	9
LS *	64	64	1	4	19	84	23	15	58	1
AO	88	121	1	6	47	5	39	83	14	12
AO	55	81	<1	6	0	0	0	96	0	4
AO *	77	85	<1	26	0	1	0	90	0	2
<i>Mean</i>	<i>71.2</i>	<i>81.7</i>	<i>4.2</i>	<i>10.3</i>	<i>11.3</i>	<i>16.7</i>	<i>34.8</i>	<i>77.3</i>	<i>20.5</i>	<i>4.8</i>
<i>P value</i>	<i>0.18</i>		<i>0.21</i>		<i>0.72</i>		<i>0.06</i>		<i>0.20</i>	

Reference intervals: Total Protein= <100 mg/dl; Nucleated cell count <8 cells/ μl .

*= Technetium labeled cells; LS= lumbosacral; AO= atlanto-occipital; mono= mononuclear cells.

There were no statistical differences between AO and LS CSF parameters prior to or after ASC administration, as such, the groups were combined for further analyses. In addition, there were no significant differences

in CSF total protein, nucleated cell count or cell differential prior to or after ASC administration ($P>0.05$). The majority of horses had normal cell counts, total protein and cell differential both prior to and after ASC administration. Prior to ASC administration, 2/6 horses (33%) had increased nucleated cell count (9 and 13 cells/ μ L, reference range ≤ 5 cells/ μ L) and all horses had a normal total protein concentration (<100 mg/dL). These changes were not considered clinically relevant in light of normal neurological and physical examination. Thirty days after ASC administration, 1/6 horses (17%) had an increased CSF protein (121 mg/dl, reference interval <100 mg/dl) and 5/6 horses (83%) had an increased nucleated cell count (6, 7, 13 and 26 cells/ μ L, reference interval ≤ 5 cells/ μ L). Serology on IFAT for both blood and CSF was negative for antibodies to *S. neurona* and *N. hughesi*.

ASC administered AO distributed caudally throughout the vertebral canal whereas ASC administered LS failed to distribute cranially

Immediately after AO injection of radiolabeled ASC, radioactive signal was identified with the maximal intensity at the site of injection and extending cranially into the caudal aspect of the cranial vault and caudally to the level of the 2nd cervical vertebra (Figure 1A, 1C). One-hour after injection, radioactive signal was present at the level of the first thoracic vertebra and, at 5 h, radioactive signal could be identified within the lumbar spine (Figure 2A). At 24 h post-injection, radioactive signal was still present and strong, in the cranial cervical spine, with weaker signal appreciated within the lumbar spine. The radioactive signal remained the most intense at the injection site at all time points.

After LS injection, radioactive signal was immediately visible at the level of the last lumbar vertebra and cranial sacrum (Figure 1B, 1D). Over time, the signal extended caudally to the posterior dural sac, while minimal radioactive signal extended cranially (Figure 2). Signal was still identified at 24 h post-injection.

The distribution and progression of the free ^{99m}Tc -HMPAO radioactive signal after AO administration was similar to the injection of labeled ASC, with signal reaching the cranial thoracic area after 1 h and the sacral area after 5 h. Mild uptake was apparent in the thyroid gland after the control injection. This was not seen with the labeled ASC injection.

Radiolabel persistence at the injection site was quantified (Table 2). Persistence decreased over time with all 3 injections. The persistence after AO injection at the later time points was lower than after LS injection. The persistence after the control injection was lower at all time points except for the 24 hours.

Table 2. Quantification of radiolabel persistence (%) at the injection site over time

Time	AO	LS	AO-C
0	100 %	100 %	100 %
30 min	93 %	87 %	79 %
1 hr	80 %	85 %	58 %
5 hr	37 %	48 %	32 %
24 hr	13 %	18 %	21 %

AO: Atlanto-Occipital, LS: Lumbosacral, AO C: Atlanto-Occipital control

DISCUSSION

Data from this exploratory study suggest that intrathecal administration of relatively high doses of allogeneic, culture-expanded ASC is well-tolerated in healthy horses regardless of whether the cells are administered AO or LS. In addition, ASC appear to distribute from cranial to caudal but they do not distribute from caudal to cranial. Other human studies have demonstrated the safety of intrathecal injection of autologous MSC [23, 24, 33, 34] with few studies using allogeneic MSC [35, 36].

There is no consensus about the best route to deliver MSC to the neurological system [37]. Studies have variably used intravenous [8], intrathecal [38], intranasal [39], direct lesional and intracerebral [40] injections. Theoretically, intrathecal injection could be more effective since relatively large MSC would not have to pass the blood–brain barrier. In support of this, several studies have reported beneficial effects after intrathecal MSC administration for central nervous system diseases [12, 41-45]. However, at least one serious adverse event (acute disseminated encephalomyelitis) has been reported after intrathecal bone marrow (BM)-MSC administration in a person [46].

In this study, both AO and LS transplantation of ASC were technically easy and safe to perform with no demonstrated side effects in horses. The caudal distribution of the labeled ASC after AO injection and the lack of cranial migration after LS injection suggest that the cells are progressing with the direction of CSF flow in the absence of any identified spinal cord lesions. The lower persistence at the AO injection site when compared to LS is consistent with the subjective assessment of migration of ASC. The caudal migration of ASC injected at the AO space is likely responsible for this lower persistence.

Atlanto-occipital centesis is the preferred route of administration to facilitate getting the highest concentration of MSC in the cervical area. Given that both routes are safe, determining the best site for ASC transplantation should take into account safety for the horse (for example, general anesthesia is not required for LS puncture and might be safer for animals showing neurological signs) and lesion location [47]. Lumbosacral puncture is a relative easy procedure that does not require general anesthesia [48]. This approach may be preferable in animals showing neurological signs localized caudal to T3 spinal cord segments. Although AO puncture is routinely done under general anesthesia [49], it has been reported that it could be performed in the standing horse with appropriate sedation [26].

The relatively low persistence at 24 hours also observed with the LS injection despite the lack of demonstrated local migration is similar to the persistence that has been reported with local intralesional injection of MSC in the equine superficial digital flexor tendon (24% at 24 hour) [50]. This might be due to systemic distribution of the MSC after injection but this might also reflect a limitation of the tracking technique. Suboptimal label persistence has been demonstrated after injection of ^{99m}Tc -HMPAO labeled MSC in dogs [32]. Although it is harder to demonstrate in horses due to physical limitations in imaging the whole body (size and signal attenuation), it is likely that the measured persistence is an underestimation of the actual cell persistence due to loss of label from some of the cells.

The concern about the presence of the free label was the justification for performing a control injection. The similar distribution of the labeled ASC and the free label suggest that both are distributing following the CSF flow. The

lower initial persistence of the free label can be explained by a faster distribution or higher systemic absorption that can be explained by the smaller size of the label compared with the ASC. The higher persistence at 24 hours with free label might be explained by fixation of some of the label in local cells. The uptake in the thyroid region observed with the control injection confirms systemic distribution of the free label and absorption of free Technetium by the thyroid gland.

Limitations of the study include the small number of horses making interpretation of quantitative data difficult (for example the increase in CSF protein in one horse). There were small changes in the CSF nucleated cell count both prior to and after ASC injection in 4 out of 5 horses. These findings might represent normal variation, mild subclinical disease or mild response to the cells themselves, although all animals were neurologically normal on examinations. Future work on horses with neurological diseases may help clarify some of these changes.

CONCLUSIONS

Our results demonstrate that AO and LS intrathecal injection of allogeneic ASC is safe and easy to perform in horses. Additionally, AO administration of ASC had a better distribution within the subarachnoid space and presumably to the spinal cord, suggesting that this approach might be more suitable for cranial lesions in the spinal cord. Additional work needs to be done to determine if multiple intrathecal allogeneic MSC injections are well-tolerated as well as to determine the migratory ability of MSC in horses with a

neurological lesion and the efficacy of MSC to treat horses with inflammatory or degenerative lesions of the nervous system.

LIST OF ABBREVIATIONS

MSC: mesenchymal stem cells

ASC: adipose derived - mesenchymal stem cells

AO: atlanto-occipital

LS: lumbosacral

CSF: cerebrospinal fluid

CEH: Center of Equine Health

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

^{99m}Tc -HMPAO: ^{99m}Tc Technetium-HexaMethyl-Propylene-Amine-Oxyme

VMTH: Veterinary Medical Teaching Hospita

RML: Regenerative Medicine Laboratory

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

IFAT: immunofluorescent antibody test

EPM: equine protozoal myeloencephalitis

ROI: region of interest

BM-MSC: bone marrow derived – mesenchymal stem cells

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

The following application was reviewed and approved by the UC Davis IACUC on June 02, 2015.

Title: Feasibility, safety and cell tracking after intrathecal allogeneic MSC transplantation into healthy horses

Principal Investigator: Dori L. Borjesson

Protocol #: 18785

Institution: University of California, Davis

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This project was supported by a generous gift from the Haas Family and by the Center for Equine Health with funds provided by the State of California satellite wagering fund and contributions by private donors. Danielle J. Barberini was supported by grant BEPE #2014/20550-8, São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil. The funding agencies played no role in the development of the study, collection, analysis and interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

Authors' contributions

The study was designed by all authors. DJB cultured and prepared ASC for injection and wrote the manuscript. FA performed sedation and anesthesia of the horses. MA performed neurologic exams. FA, MA and DJB performed collections of cerebrospinal fluid and cell injection, clinical and neurological examinations and the majority of the data acquisition. NW performed cell labelling with technetium. MS supervised scintigraphic and radiographic imaging acquisition and performed interpretation. All authors contributed to data interpretation and manuscript preparation. LG, MS, KDW and RMA revised the manuscript. DB provided funding and mentorship and revised the manuscript. All authors read the final manuscript and gave approval for it to be published.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' information (optional)

DJB, DVM, MS, Veterinary Institute for Regenerative Cures and the Department of Pathology, Microbiology & Immunology, University of California, Davis, USA

MA, DVM, PhD, Dipl. ACVIM, Department of Medicine & Epidemiology, University of California, Davis, USA

FA, DVM, MS, Department of Surgical & Radiological Sciences, University of California, Davis, USA

MS, DVM, MS, Dipl. ACVR, Dipl. ECVDI, Department of Surgical & Radiological Sciences, University of California, Davis, USA

NW, BA, Veterinary Institute for Regenerative Cures and the Department of Pathology, Microbiology & Immunology, University of California, Davis, USA

LDG, DVM, Dipl. ACVS, Department of Surgical & Radiological Sciences, University of California, Davis, USA

KDW, DVM, PhD, Dipl. ACVP, Veterinary Institute for Regenerative Cures and the Department of Pathology, Microbiology & Immunology, University of California, Davis, USA

RMA, DVM, MS, PhD, Department of Veterinary Clinics, São Paulo State University "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Botucatu, SP, Brazil

DLB, DVM, PhD, Dipl. ACVP, Veterinary Institute for Regenerative Cures and the Department of Pathology, Microbiology & Immunology, University of California, Davis, USA

REFERENCES

- [1] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *STEM CELLS*. 2007;25:2739-49.
- [2] Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:765-83.
- [3] Gutierrez-Nibeyro SD. Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2011;27:363-71.
- [4] Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszky C, et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *The Veterinary Journal*. 2013;195:98-106.
- [5] Ravanidis S, Bogie JFJ, Donders R, Craeye D, Mays RW, Deans R, et al. Neuroinflammatory signals enhance the immunomodulatory and neuroprotective properties of multipotent adult progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:1-17.
- [6] Carrade DD, Lane MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells(). *Cell medicine*. 2012;4:1-11.

- [7] Glavaski-Joksimovic A, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2013;247:25-38.
- [8] Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. *STEM CELLS*. 2010;28:1099-106.
- [9] Kerkis I, Haddad MS, Valverde CW, Glosman S. Neural and mesenchymal stem cells in animal models of Huntington's disease: past experiences and future challenges. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:1-15.
- [10] Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Experimental Neurology*. 2010;223:229-37.
- [11] Lee HJ, Lee JK, Lee H, Carter JE, Chang JW, Oh W, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiology of Aging*. 2012;33:588-602.
- [12] Harris VK, Yan QJ, Vyshkina T, Sahabi S, Liu X, Sadiq SA. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2012;313:167-77.
- [13] Yousefifard M, Nasirinezhad F, Shardi Manaheji H, Janzadeh A, Hosseini M, Keshavarz M. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:1-14.
- [14] Cole C, Bentz B. Treatment of equine nervous system disorders. *Equine Pharmacology*: John Wiley & Sons, Inc; 2014. p. 192-217.
- [15] Reed SM, Furr M, Howe DK, Johnson AL, MacKay RJ, Morrow JK, et al. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med*. 2016;30:491-502.
- [16] Petrov AA, Lebedev VN, Kulish VS, Pyshnaya NS, Stovba LF, Borisevich SV. Epidemiologic analysis of outbreaks of diseases caused by american equine encephalitis causative agents in endemic regions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*. 2015:103-10.
- [17] Rech R, Barros C. Neurologic Diseases in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2015;31:281-306.
- [18] Reed S, Grant B, Nout Y. Cervical Vertebral Stenotic Myelopathy. *Equine Neurology*. 2008:283-98.
- [19] Dubey JP, Howe DK, Furr M, Saville WJ, Marsh AE, Reed SM, et al. An update on Sarcocystis neurona infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*. 2015;209:1-42.
- [20] Hu DZ, Zhou LF, Zhu JH. Marrow stromal cells administrated intracisternally to rats after traumatic brain injury migrate into the brain and improve neurological function. *Chinese medical journal*. 2004;117:1576-8.
- [21] Liu J, Han D, Wang Z, Xue M, Zhu L, Yan H, et al. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2013;15:185-91.
- [22] Jung D-I, Ha J, Kang B-T, Kim J-W, Quan F-S, Lee J-H, et al. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal

stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;285:67-77.

[23] Chen BK, Staff NP, Knight AM, Nesbitt JJ, Butler GW, Padley DJ, et al. A safety study on intrathecal delivery of autologous mesenchymal stromal cells in rabbits directly supporting Phase I human trials. *Transfusion*. 2014;n/a-n/a.

[24] Maia L, da Cruz Landim-Alvarenga F, Taffarel MO, de Moraes CN, Machado GF, Melo GD, et al. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC veterinary research*. 2015;11:63.

[25] Mayhew IG. Collection of cerebrospinal fluid from the horse. *The Cornell veterinarian*. 1975;65:500-11.

[26] Pease A, Behan A, Bohart G. ULTRASOUND-GUIDED CERVICAL CENTESIS TO OBTAIN CEREBROSPINAL FLUID IN THE STANDING HORSE. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2012;53:92-5.

[27] Lunn DP, Mayhew IG. The neurological evaluation of horses. *Equine Veterinary Education*. 1989;1:94-101.

[28] Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, et al. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:234.

[29] Kol A, Arzi B, Athanasiou KA, Farmer DL, Nolte JA, Rebhun RB, et al. Companion animals: Translational scientist's new best friends. *Science Translational Medicine*. 2015;7:308ps21-ps21.

[30] Pusterla N, Tamez-Trevino E, White A, VanGeem J, Packham A, Conrad PA, et al. Comparison of prevalence factors in horses with and without seropositivity to *Neospora hughesi* and/or *Sarcocystis neurona*. *The Veterinary Journal* 2014. p. 332-4.

[31] Sole A, Spriet M, Galuppo LD, Padgett KA, Borjesson DL, Wisner ER. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99 m) Tc-HMPAO. *Equine Vet J*. 2012;44.

[32] Spriet M, Hunt GB, Walker NJ, Borjesson DL. SCINTIGRAPHIC TRACKING OF MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER PORTAL, SYSTEMIC INTRAVENOUS AND SPLENIC ADMINISTRATION IN HEALTHY BEAGLE DOGS. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2015;56:327-34.

[33] Satti HS, Waheed A, Ahmed P, Ahmed K, Akram Z, Aziz T, et al. Autologous mesenchymal stromal cell transplantation for spinal cord injury: A Phase I pilot study. *Cytotherapy*. 2016;18:518-22.

[34] 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;12:1-11.

[35] Villanova M, Bach JR. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy Outcomes for Three Patients with Spinal Muscular Atrophy Type 1. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2015;94:410-5.

[36] Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Wang J, Han Z, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2009;15:644-6.

[37] Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 2010;5.

- [38] Wang S, Cheng H, Dai G, Wang X, Hua R, Liu X, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Research*. 2013;1532:76-84.
- [39] Danielyan L, Schäfer R, von Ameln-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, Klopfer T, et al. Intranasal delivery of cells to the brain. *European Journal of Cell Biology*. 2009;88:315-24.
- [40] Shyu W-C, Lin S-Z, Chiang M-F, Su C-Y, Li H. Intracerebral Peripheral Blood Stem Cell (CD34+) Implantation Induces Neuroplasticity by Enhancing β 1 Integrin-Mediated Angiogenesis in Chronic Stroke Rats. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26:3444-53.
- [41] Jarochoa D, Milczarek O, Wedrychowicz A, Kwiatkowski S, Majka M. Continuous Improvement After Multiple Mesenchymal Stem Cell Transplantations in a Patient With Complete Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*. 2015;24:661-72.
- [42] Sahraian MA, Mohyeddin Bonab M, Ahmadi Karvigh S, Yazdanbakhsh S, Nikbin B, Lotfi J. Intrathecal Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Follow-Up Study for Five Years After Injection. *Arch Neurosci*. 2014;1:71-5.
- [43] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*. 2006;441:1094-6.
- [44] Cohen JA. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013;333:43-9.
- [45] Karussis D, Petrou P, Kassis I. Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013;324:1-9.
- [46] Kishk NA, Abokrysha NT, Gabr H. Possible induction of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like demyelinating illness by intrathecal mesenchymal stem cell injection. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2013;20:310-2.
- [47] Johnson PJ, Constantinescu GM. Collection of cerebrospinal fluid in horses. *Equine Veterinary Education*. 2000;12:7-12.
- [48] Aleman M, Borchers A, Kass PH, Puchalski SM. Ultrasound-assisted collection of cerebrospinal fluid from the lumbosacral space in equids. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007;230:378-84.
- [49] Schwarz B, Piercy RJ. Cerebrospinal fluid collection and its analysis in equine neurological disease. *Equine Veterinary Education*. 2006;18:243-8.
- [50] Sole A, Spriet M, Padgett KA, Vaughan B, Galuppo LD, Borjesson DL. Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb. *Equine Vet J*. 2013;45.

FIGURES

Figure 1: Scintigraphic images obtained immediately after AO (A) and LS (B) injection of radiolabeled ASC. The focal round area of intense radioactive signal are external markers placed on the second cervical vertebra (C2), the 18th thoracic vertebra (T18) and the 3rd sacral vertebra (S3). The bottom row shows fusion of the scintigraphic images with radiographs after AO (C) and LS (D) injection to help with anatomical localization of the ASC.

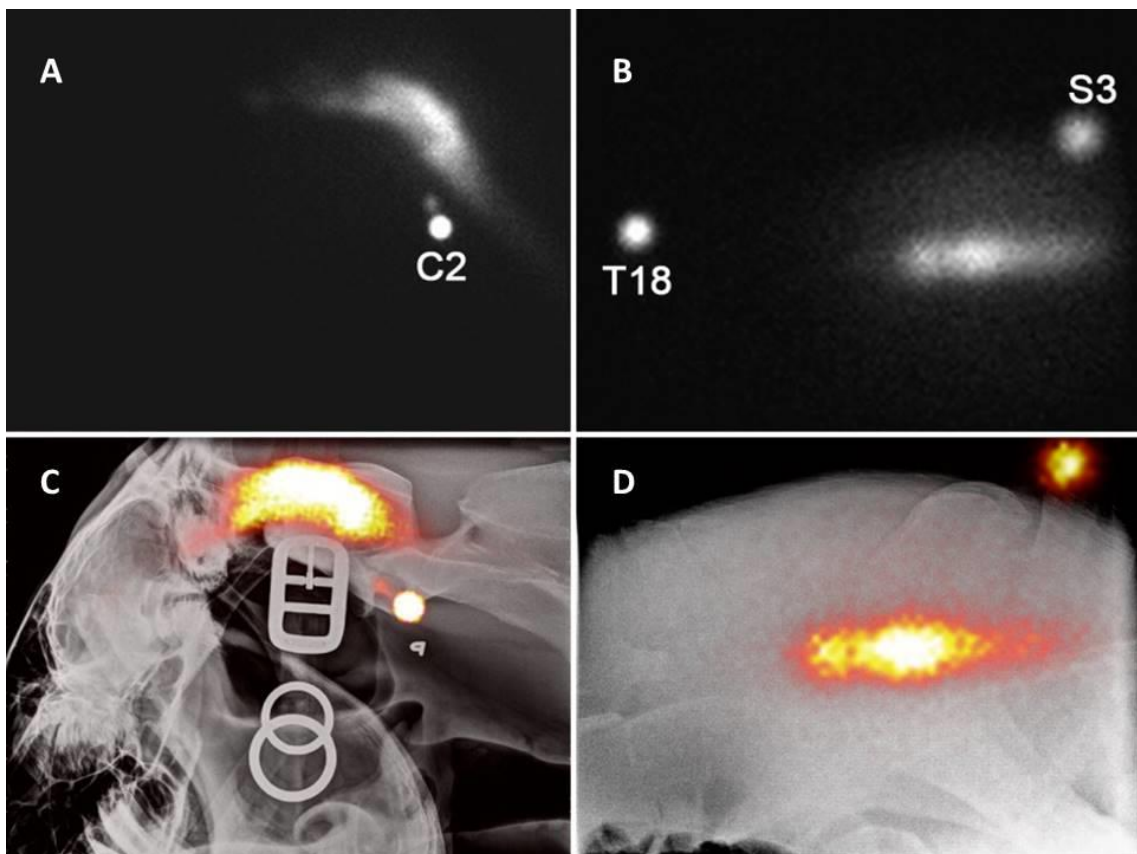
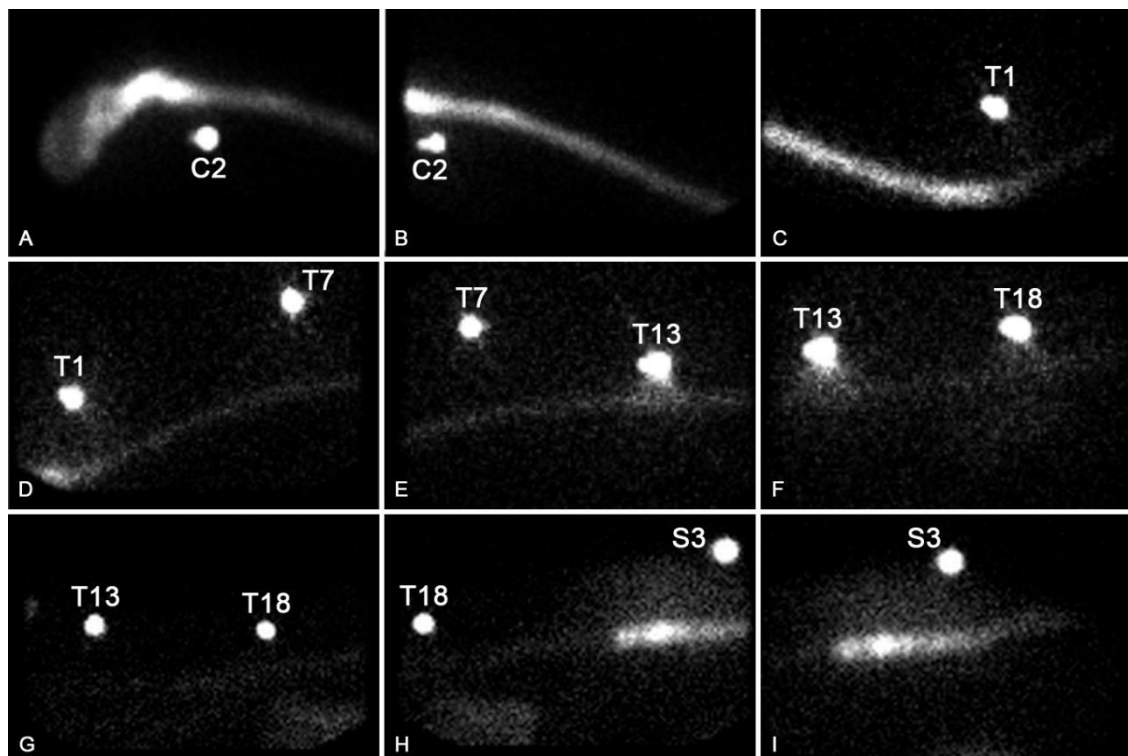


Figure 2: Scintigraphic images obtained 5 h after AO (A-F) and LS (G-I) injection of radiolabeled ASC. External radioactive markers were placed at the 2nd cervical vertebra, the 1st (T1), 7th (T7), 13th (T13) and 18th (T18) thoracic vertebrae, as well as the 3rd sacral vertebra (S3). After AO injection, radioactive signal can be observed all the way to the lumbar spine, whereas no cranial migration of radiolabeled ASC can be observed after lumbosacral injection.



10.2 Trabalho a ser enviado para a revista “Equine Veterinary Journal”.

“Title page”

1 **Autores**

2 Dr. Danielle Jaqueta Barberini DVM, MS¹ * (daniellebarberini@yahoo.com.br)*

3 Dr. Denis Jeronimo Svicero DVM, MS¹ (de_svicero@hotmail.com)

4 Dr. Diana Leocata de Queiróz DVM¹ (diana_leocata@hotmail.com)

5 Dr. Maria Cristina Reis Castiglioni DVM² (maria.castiglioni@hotmail.com)

6 Dr. Nayara Dantas Limonta DVM¹ (nay_limonta@hotmail.com)

7 Dr. Fernanda da Cruz Landim, DVM, MS, PhD² (fernanda@fmvz.unesp.br)

8 Dr. Rogério Martins Amorim, DVM, MS, PhD ¹ (rmamorim@fmvz.unesp.br)

9 ¹ Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de
10 Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, SP, Brasil

11 ² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade
12 Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, SP, Brasil

13 *corresponding author

14

15 O estudo foi projetado por D. J. Barberini e R. M. Amorim. D. J. Barberini fez a
16 coleta, cultura e o preparo das CTM-TA para os transplantes. D. J. Barberini
17 realizou os exames neurológicos. D. Leocata, D. J. Svicero e D. J. Barberini
18 realizaram os transplantes das CTM e os exames clínicos. M. realizou os
19 exames ultrassonográficos e a interpretação das imagens. Todos os autores
20 contribuíram com a interpretação dos dados e a preparação do manuscrito.
21 F.C. Landim e R. M. Amorim revisaram o manuscrito. Todos os autores leram
22 a versão final do manuscrito e aprovaram seu envio para publicação.

Considerações éticas

O projeto de pesquisa “Avaliação do transplante intratecal de células tronco mesenquimais alogênicas em equinos sadios e portadores de sequelas neurológicas” - Protocolo nº 161/2014 - CEUA, do Professor Rogério Martins Amorim, a ser conduzido por Danielle Jaqueta Barberini, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 10 de outubro de 2014.

Interesses competitivos

Os autores declaram que não possuem interesses competitivos.

Agradecimentos

Fontes de financiamento

Danielle J. Barberini recebeu bolsa BEPE número 2014/20550-8 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). A agência de financiamento não teve nenhum papel no desenvolvimento deste estudo, coleta, análise e interpretação de dados, na escrita do manuscrito ou na decisão de submeter este manuscrito para publicação.

Palavras-chave

neurologia; tecido adiposo; cavalo; cervical; Líquido cefalorraquidiano

Detalhes mascarados para a revisão

Linha número 62: FMVZ UNESP – Botucatu

48 Linha número 62: Protocolo nº 161/2014, CEUA - Faculdade de Medicina
49 Veterinária e Zootecnia, em 10 de outubro de 2014.

50 Linha número 87: Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular
51 (LANÇA) – FMVZ UNESP - Botucatu

52

53 **Contagem de palavras**

54 3.601 palavras para o texto completo (incluindo legendas de figuras, tabelas e
55 referências).

“Arquivo de Texto do manuscrito”

1

1 Segurança de sucessivos transplantes intratecais de células-tronco 2 mesenquimais alogênicas em equinos

3

4 **Palavras-chave:** neurologia; tecido adiposo; cavalo; cervical; Líquido
5 cefalorraquidiano

6

7 RESUMO

8 **Introdução:** A terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) para
9 enfermidades neurológicas vem sendo estudada. O uso de CTM alogênicas é
10 necessário em alguns casos, por isso é importante verificar a segurança deste
11 tipo de terapia pela via intratecal, mediante a utilização de equinos como
12 modelo experimental.

13 **Objetivos:** Avaliar a segurança de sucessivos transplantes com diferentes
14 fontes de CTM alogênicas pela via intratecal.

15 **Design do estudo:** Estudo de segurança

16 **Métodos:** Foram utilizados 16 equinos sadios, divididos aleatoriamente em
17 quatro grupos: grupo controle com administração de PBS (GC=4), grupo
18 tratado com CTM alogênicas provenientes da medula óssea (GTMO=4), do
19 tecido adiposo (GTTA=4) e do cordão umbilical (GTCU=4). Os transplantes
20 foram realizados por via intratecal pelo espaço C1-C2, totalizando três
21 aplicações com intervalo de 30 dias. Foram realizados exames clínicos
22 seriados, análise hematológica e do líquido cefalorraquidiano (LCR) antes e
23 após os transplantes.

Resultados: Não houve nenhum efeito adverso nos animais, todos os exames clínicos, neurológicos e hematológicos se mantiveram dentro da normalidade. Houve um pequeno aumento no número de células nucleadas no LCR em 3 animais do GTA, 4 animais do GMO e 2 animais do GCU, em diferentes momentos. Também notou-se a presença de linfócitos reativos em 1 animal do GTA, 1 animal do GMO e 3 animais do GCU, e presença de célula de Mott em 1 animal do GCU, embora 2 destes animais não apresentaram aumento no número de células nucleadas.

Principais limitações:

Conclusões: Transplantes sucessivos de CTM de todas as fontes utilizadas (TA, MO e CU) pela via intratecal através do espaço entre C1-C2 são seguros de serem realizados somente com sedação.

INTRODUÇÃO

Diversas enfermidades neurológicas degenerativas, inflamatórias, traumáticas, vasculares, tem sido alvo de diversos estudos considerando a terapia celular como uma opção de tratamento, devido seus efeitos antiinflamatórios, imunomodulatórios e neuroprotetivos [1-4]. Os equinos são acometidos por diversas enfermidades neurológicas, que muitas vezes, levam a sequelas graves levando o animal a óbito ou a realização de eutanásia [5]. Neste sentido, é importante considerar a terapia com CTM como uma possibilidade de tratamento. Com a medicina translacional, os equinos são importante fonte de estudo para enfermidades e terapias em humanos [6-8], sendo um excelente modelo para diversas enfermidades neurológicas.

Como as células-tronco (CTM) autólogas em alguns casos não são viáveis de serem utilizadas, como em pacientes idosos ou para enfermidades

agudas [9; 10], diversos estudos com terapias alogênicas vem sendo realizados [11-13]. No entanto, ainda é necessário atestar a segurança desta terapia, levando em consideração sucessivas aplicações. Adicionalmente, ainda não estão estabelecidas a dose terapêutica, a via de aplicação nem a fonte ideal de CTM para a utilização em distúrbios do SNC.

O objetivo deste estudo foi testar (1) a segurança de sucessivos transplantes com diferentes fontes de CTM, e (2) a viabilidade e segurança de transplantes pela via intratecal através do espaço entre as vértebras C1-C2 em equinos em estação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais:

Foram utilizados 16 equinos, de ambos os sexos, com idades entre 10 e 17 anos da “**mascarado para revisão**”. O protocolo “**mascarado para revisão**” foi aprovado. Estes animais foram considerados saudáveis com base na avaliação de exames clínicos, análise hematológica e do líquido cefalorraquidiano (LCR).

Desenho experimental:

Os 16 equinos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (GC=4) onde foi administrado PBS, grupo tratado com CTM alogênicas provenientes da medula óssea (GTMO=4), do tecido adiposo (GTTA=4) e do cordão umbilical (GTCU=4). Foi administrado PBS ou CTM pela via intratecal pelo espaço C1-C2, mediante sedação e com o animal em

posição quadrupedal, conforme Pease et al. (2011), totalizando três aplicações com intervalo de 30 dias.

Estes animais foram avaliados por exames clínicos e neurológicos seriados, diariamente na primeira semana após o transplante, e semanalmente nas outras semanas. A análise hematológica foi realizada imediatamente antes de cada administração das CTM ou PBS, e posteriormente em 1 e 3 dias após a aplicação. O líquido cefalorraquidiano (LCR) foi analisado nos seguintes momentos: M0-imediatamente antes do primeiro transplante; M30 - imediatamente antes do segundo transplante (30 dias após M0); M60 - imediatamente antes do terceiro transplante (30 dias após M30); e M90 - 30 dias após M60.

Células-tronco utilizadas para o transplante

CTM alogênicas do CU, MO e TA de baixa passagem (P2-P4) foram utilizadas. Estas CTM foram obtidas do banco de CTM do “ **mascarado para revisão**”. Estas células foram previamente caracterizadas (diferenciação em linhagem mesenquimal, marcadores de superfície) [14]. As células foram descongeladas e expandidas em cultura para a concentração final de 50 milhões de CTM. Anteriormente ao transplante, as CTM foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes com Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)¹, contadas e ressuspensas em 20 milhões de células/ml de DPBS¹ (total de aproximadamente 50 milhões de células). As células foram mantidas refrigeradas até momento do transplante.

Transplante das CTM/PBS e coleta do LCR

A colheita foi realizada de acordo com a técnica descrita por [15] com pequenas modificações. Para isso, os animais foram sedados com detomidina² (10-20 µg/kg intravenoso) e morfina³ (0,05 mg/kg intravenoso). Em posição quadrupedal, uma área de 15x15 cm, centrada sobre o espaço das vértebras C1-C2, foi tricotomizada e preparada assepticamente para punção estéril. Foi realizada a infiltração da pele e do tecido subcutâneo com anestésico local cloridrato de lidocaína 2%⁴ utilizando um bloqueio em botão. Com auxílio de uma probe linear de ultrassom⁵, o espaço subaracnóide entre C1-C2 foi localizado, uma agulha espinhal de 25Gx90mm foi inserida (Figura 1) e o LCR aspirado com auxílio de uma seringa de 3mL. Logo após este procedimento, o PBS (3 ml) ou as CTM (50 milhões em 3 ml), de acordo com os respectivos grupos já descritos, foram transplantados pela mesma via (Figura 2). No total foram realizados 3 transplantes com intervalo de 30 dias em cada animal de acordo com os grupos (GC, GTTA, GTMO, GTCU).

A coleta do LCR foi realizada imediatamente antes de cada transplante de PBS (GC) ou de CTM (GTMO, GTTA, GTCU), e 30 dias após o último transplante, sendo o LCR acondicionado em três tubos estéreis sem anticoagulante e enviado para análise laboratorial.

Estatística

Para o experimento foi utilizado o teste de Friedman com pós teste de Dunns. Foram comparados a mediana dos parâmetros entre as fontes de CTM e os momentos. Para todas as análises foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. Foram utilizados os softwares Graphpad Prism 5.0 (GraphPad,

2007¹) e o *Statistical Analysis Software* – SAS versão 9.3 (SAS Institute, 2011²).

RESULTADOS

Avaliação dos animais

Todos os animais se mantiveram até o final do estudo sem demonstrar efeitos adversos. Todos os parâmetros do exame clínico e neurológico se mantiveram dentro da normalidade para a espécie equina durante todos os momentos (antes e após o transplante de CTM), e em todos os grupos (GC, GTA, GMO e GCU) após os três transplantes intratecais. Não houve alterações nos dados hematológicos em nenhum dos momentos analisados em todos os grupos, todos os valores se mantiveram dentro da normalidade para a espécie equina.

LCR

Os resultados do LCR antes e após os transplantes estão apresentados na tabela 1. Poucas alterações foram encontradas na análise do LCR: aumento no número de células nucleadas em diferentes momentos em 3 animais do GTA, 4 animais do GMO e 2 animais do GCU. Também notou-se a presença de células atípicas, sendo linfócitos reativos em 1 animal do GTA, 1 animal do GMO e 3 animais do GCU, e presença de célula de Mott em 1 animal do GCU, embora 2 destes animais não apresentaram aumento no número de células nucleadas.

Transplantes de CTM pela via intratecal entre as vértebras C1-C2

As coletas de LCR e os sucessivos transplantes das CTM através do espaço C1-C2 com o animal em estação, mediante sedação, se mostraram viáveis e seguros pelo método proposto com o auxílio da ultrassonografia. Nenhum dos animais demonstrou desconforto durante o procedimento ou após. Não houve infecção, dor, inflamação ou nenhum outro tipo de alteração local ou sistêmica. Dentre os 16 animais submetidos ao protocolo, em apenas 2 não foi possível a realização do procedimento devido os mesmos não permanecerem imóveis suficientemente após a sedação, porém estes foram substituídos.

Foram administrados uma média de $44,7 \pm 10,8$ milhões de CTM nos transplantes, sendo que a dose de CTM proposta para ser utilizada (50 milhões de células) se mostrou viável e não causou nenhum tipo de reação clínica nos animais.

DISCUSSÃO

Enfermidades neurológicas são um desafio em todas as espécies, humanos e animais, levando muitas vezes a sequelas graves que incapacitam a realização de atividades corriqueiras. A terapia com CTM demonstra um grande potencial no tratamento de certas enfermidades tanto para a cura como na interrupção da progressão da doença, e também como uma possibilidade para tratar as sequelas neurológicas [3; 16; 17].

O uso da terapia com CTM autólogas muitas vezes é impossibilitado por características do paciente, como idade, doença, como também quando se

necessita de um tratamento imediato para enfermidades agudas [9; 10; 18]. Com isso, a terapia alogênica vem ganhando campo de estudo visando a sua segurança e a eficácia em diversas enfermidades, como osteomusculares, neurológicas e endócrinas [6; 11; 13; 19; 20].

Como ainda não se sabe a melhor fonte de CTM para ser utilizada como terapia no SNC [21-23], é de extrema importância verificar se diferentes fontes de CTM seriam seguras para se utilizar. O transplante de sucessivas CTM alogênicas, derivadas da MO, TA e CU, se mostrou viável e seguro neste estudo. Nenhum dos animais apresentou alterações clínicas ou neurológicas, e os exames hematológicos também se mantiveram dentro da normalidade durante todos os momentos avaliados (antes e após os transplantes), corroborando com outros estudos visando a segurança da utilização de CTM alogênicas no SNC [24-26].

Outra informação desconhecida até o momento é a dose ideal de CTM para atingir eficácia terapêutica [1; 17; 27; 28]. Nós propusemos a dose de 50 milhões de CTM por transplante, totalizando 3 aplicações com intervalo de 30 dias entre as mesmas. Este protocolo se mostrou viável, sendo transplantadas uma média de $44,7 \pm 10,8$ milhões de células, e seguro, sendo que nenhuma animal apresentou reação clínica.

Pequenas alterações foram encontradas na análise do LCR. Houve um aumento no número de células nucleadas em diferentes momentos em 3 animais do GTA, 4 animais do GMO e 2 animais do GCU. Também notou-se a presença de células atípicas, sendo linfócitos reativos em 1 animal do GTA, 1 animal do GMO e 3 animais do GCU, e presença de célula de Mott em 1 animal do GCU, embora 2 destes animais não apresentaram aumento no número de

células nucleadas. A presença de linfócitos reativos indica a presença de linfócitos B (LB), responsáveis pela produção de Imunoglobulinas (Ig), podendo indicar que houve uma estimulação antigênica, mas sua presença no LCR não tem especificidade [29]; do mesmo modo a célula de Mott também indica presença de imunoglobulinas [30]. Por outro lado, marcadores de lesão neural/inflamação, como as metaloproteinases (MMP), podem ser mais precisos do que somente a análise de LCR. Porém, esses achados foram somente em um momento, e mesmo com estas alterações no LCR, todos os animais mantiveram os exames clínicos e neurológicos normais durante toda a fase de avaliação.

Diversas vias tem sido utilizadas para a administração das CTM no SNC, como intranasal [31], intra-arterial [32], intravenosa [33], intratecal [1]. Porém já foi relatado que ocorre um aprisionamento pulmonar das CTM após a administração intravenosa [33; 34]. Tendo em vista que a via intratecal já é uma via direta para o SNC, optamos por utilizar esta via no presente estudo. A utilização da via intratecal através do espaço entre as vértebras C1-C2 foi proposta levando em consideração a possibilidade de execução da técnica com o cavalo em estação, sendo mais prática para ser utilizada a campo [15].

Com os resultados deste estudo podemos concluir que transplantes sucessivos de 50 milhões de CTM derivadas da TA, MO e CU são seguros, e que a via intratecal através do espaço entre C1-C2 é viável e segura para ser utilizada para o transplante de CTM para o SNC de equinos.

DETALHES DOS FABRICANTES

¹Gibco® por Life technologies™, Carlsbad, CA, EUA

² Detomidin®, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, BR

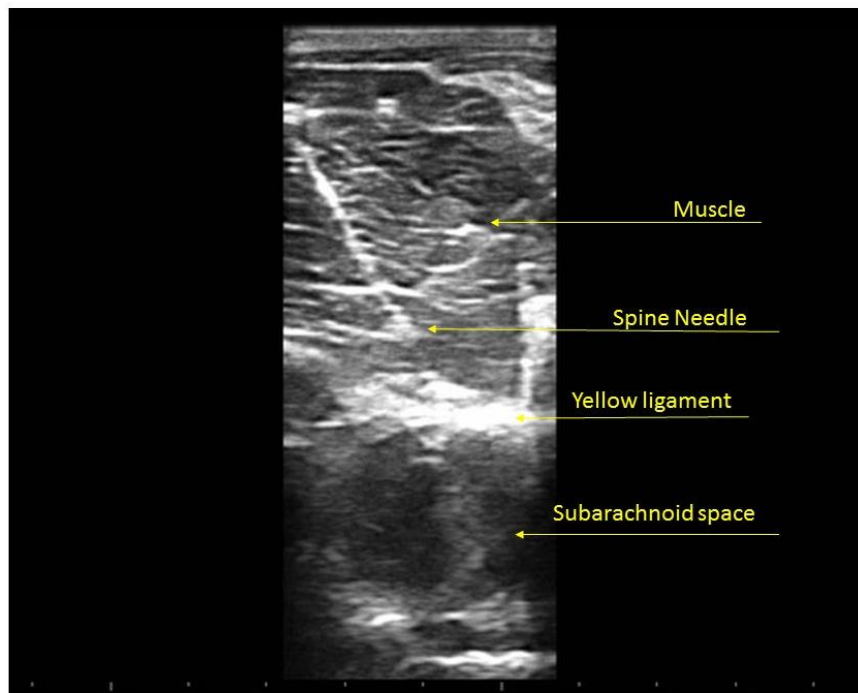
³ Dimorf®, Cristália, Itapira, SP, BR

⁴ Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro, RJ, BR

11 MyLab™30Gold VET, Esaote, Genova, Itália

LEGENDAS DAS FIGURAS:

Figura 1: Imagem ultrassonográfica da coleta de LCR e transplante de CTM pela via intratecal entre o espaço das vértebras C1-C2 em equinos. Visualiza-se o ligamento amarelo, o espaço subaracnóide, a medula espinhal e a agulha.



TABELAS

Tabela 1: Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após sucessivos transplantes (continua)

Animal	Grupo	Momento	Proteínas (g/dL)	Céls nucleadas	Citologia
Referência			5-100	0-6	
1	PBS	M0	67,8	2	
		M30	44,2	3	
		M60	39,7	1	
		M90	30,7	1	
2	PBS	M0	60,2	0	
		M30	57,1	2	
		M60	55,3	0	
		M90	46,9	0	
3	PBS	M0	41,9	2	
		M30	45,5	2	
		M60	32,7	1	
		M90	36,4	1	
4	PBS	M0	33,7	1	
		M30	31	1	
		M60	37	1	
		M90	42,3	2	
5	TA	M0	47,3	1	
		M30	53	1	
		M60	52,4	20	
		M90	61,2	12	LR
6	TA	M0	74,4	0	
		M30	73,8	2	
		M60	65,6	14	
		M90	71,7	2	
7	TA	M0	20,8	2	
		M30	39,3	0	
		M60	34,9	9	
		M90	34,3	0	
8	TA	M0	39,5	0	
		M30	20,4	0	
		M60	24	0	
		M90	18,6	1	

Tabela 1: Resultados do LCR de equinos saudáveis antes e após sucessivos transplantes (conclusão)

Animal	Grupo	Momento	Proteínas (g/dL)	Céls nucleadas	Citologia
9	MO	M0	2,3	0	
		M30	59,8	3	
		M60	55,3	12	
		M90	49,7	5	
10	MO	M0	43,4	0	
		M30	49,7	1	
		M60	38,4	0	
		M90	22,2	9	
11	MO	M0	56,7	0	
		M30	53,3	1	
		M60	58,8	2	
		M90	64,7	18	LR
12	MO	M0	33,5	0	
		M30	33,7	5	
		M60	26,5	24	
		M90	36,2	1	
13	CU	M0	28,8	0	
		M30	38,6	6	
		M60	29,6	1	
		M90	36	1	LR
14	CU	M0	44	0	
		M30	41,1	0	
		M60	50,2	3	
		M90	43,8	8	LR
15	CU	M0	69,7	0	
		M30	60	2	
		M60	61	3	
		M90	66,5	2	LR e MOTT
16	CU	M0	60	1	
		M30	59,2	0	
		M60	69,2	2	
		M90	73,5	10	

LR= linfócitos reativos; MOTT= célula de Mott

REFERÊNCIAS

- [1] Harris, V.K., Vyshkina, T. and Sadiq, S.A. (2016) Clinical safety of intrathecal administration of mesenchymal stromal cell-derived neural progenitors in multiple sclerosis. *Cytotherapy* **18**, 1476-1482.
- [2] Yousefifard, M., Nasirinezhad, F., Shardi Manaheji, H., Janzadeh, A., Hosseini, M. and Keshavarz, M. (2016) Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem Cell Research & Therapy* **7**, 1-14.
- [3] Cui, Y., Ma, S., Zhang, C., Cao, W., Liu, M., Li, D., Lv, P., Xing, Q., Qu, R., Yao, N., Yang, B. and Guan, F. (2017) Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research* **320**, 291-301.
- [4] Cheng, Q., Zhang, Z., Zhang, S., Yang, H., Zhang, X., Pan, J., Weng, L., Sha, D., Zhu, M., Hu, X. and Xu, Y. (2015) Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation. In: *Brain Research*. pp 293-304.
- [5] Rech, R. and Barros, C. (2015) Neurologic Diseases in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **31**, 281-306.
- [6] Ardanaz, N., Vázquez, F.J., Romero, A., Remacha, A.R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera, B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I. and Rodellar, C. (2016) Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. In: *BMC veterinary research*. pp 1-9.
- [7] Owens, S.D., Kol, A., Walker, N.J. and Borjesson, D.L. (2016) Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Stem Cells International* **2016**, 8.
- [8] Kol, A., Arzi, B., Athanasiou, K.A., Farmer, D.L., Nolta, J.A., Rebhun, R.B., Chen, X., Griffiths, L.G., Verstraete, F.J.M., Murphy, C.J. and Borjesson, D.L. (2015) Companion animals: Translational scientist's new best friends. *Science Translational Medicine* **7**, 308ps321-308ps321.
- [9] Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y. and Hu, D. (2015) The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research & Therapy* **6**, 234.

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

- [21] Drela, K., Lech, W., Figiel-Dabrowska, A., Zychowicz, M., Mikula, M., Sarnowska, A. and Domanska-Janik, K. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. In: *Cytotherapy*, Elsevier. pp 497-509.
- [22] Chung, H.J., Chung, W.H., Lee, J.H., Chung, D.J., Yang, W.J., Lee, A.J., Choi, C.B., Chang, H.S., Kim, D.H., Suh, H.J., Lee, D.H., Hwang, S.H., Do, S.H. and Kim, H.Y. (2016) Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of human-umbilical cord blood stem cells in rats. *Journal of veterinary science* **17**, 97-102.
- [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 Han, Z.C. (2016) Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell Research & Therapy* **7**, 163.
- [24] Díez-Tejedor, E., Gutiérrez-Fernández, M., Martínez-Sánchez, P., Rodríguez-Frutos, B., Ruiz-Ares, G. and Lara, M.L. (2014) Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **23**.
- [25] Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Wang, J., Han, Z. and Sun, L. (2009) Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* **15**, 644-646.
- [26] Yang, W.-Z., Zhang, Y., Wu, F., Min, W.-P., Minev, B., Zhang, M., Luo, X.-L., Ramos, F., Ichim, T.E., Riordan, N.H. and Hu, X. (2010) Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. In: *Journal of Translational Medicine*, BioMed Central. pp 75-75.
- [27] Piltti, K.M., Avakian, S.N., Funes, G.M., Hu, A., Uchida, N., Anderson, A.J. and Cummings, B.J. (2015) Transplantation dose alters the dynamics of human neural stem cell engraftment, proliferation and migration after spinal cord injury. In: *Stem Cell Research*. pp 341-353.
- [28] Maia, L., da Cruz Landim-Alvarenga, F., Taffarel, M.O., de Moraes, C.N., Machado, G.F., Melo, G.D. and Amorim, R.M. (2015) Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC veterinary research* **11**, 63.
- [29] Cook, J.R., Jr. and DeNicola, D.B. (1988) Cerebrospinal fluid. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* **18**, 475-499.

- 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

ANEXOS

Anexo 1

Avaliação neurológica dos animais com sequelas neurológicas decorrente de MEP, tratados com CTM-TA

Animal 1

Anamnese

Histórico de ataxia severa em setembro de 2015, foi tratado com diclazuril, dimesol e acupuntura, melhorando 80%. Houve uma recidiva há 2 meses, foi tratado novamente com pouca melhora.

Avaliação inicial do animal antes do transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 3**.

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Déficit bem importante nos MPs, apresentando risco de quedas. Propriocepção diminuída nos quatro membros. Postura anormal dos membros quando parado. Paresia dos MPs, ataxia nos 4 membros, hipermetria nos MTs.

Andar e trotar em linha reta: ataxia nos 4 membros, passo curto com MPs, deslocamento lateral da garupa, abdução dos membros.

Afastar: muita dificuldade, arrasta os MPs.

Andar em círculos: abdução dos membros, pivô sob o membro.

Descer e subir rampas: abdução MPs, cruza os membros.

Obstáculos: hipermetria dos MTs.

Andar com pescoço estendido: muita dificuldade, hipermetria dos MTs, cruza os MPs.

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados (esquerdo e direito).

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Proprietário notou melhora na locomoção após 1 semana do transplante das CTM, relatou mais força nos membros pélvicos (MP).

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Não demonstra mais risco de quedas. Propriocepção diminuída no MAE. Mais força nos MPs, mantém postura normal dos membros quando parado. Melhora evidente no MPE, sem alteração em algumas manobras especiais. Apresenta déficit no MPD, abduzindo durante as manobras especiais. Paresia do MPD, ataxia nos 4 membros.

Andar e trotar em linha reta: abdução do MPD, MPE mais forte

Afastar: sem muita dificuldade, mas abduz os MPs

Andar em círculos: abdução dos membros

Descer e subir rampas: abdução somente do MPD, maior força no MPE

Obstáculos: hipermetria dos MTs

Andar com pescoço estendido: hipermetria e abdução dos MTs

Deslocamento garupa: deslocamento somente para lado direito, mostra força no lado esquerdo.

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2**

Proprietário relatou que o animal fica correndo no piquete, brinca com os outros animais.

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção normal nos 4 membros. Mais força nos MPs, não deixou pegar os MPs para realizar o exame de propriocepção, ficou dando coice. Mantém postura normal quando parado. Paresia do MPD.

Andar e trotar em linha reta: abdução dos MTs

Afastar: garupa um pouco para baixo

Andar em círculos: abdução do MP de fora do círculo, mais evidente quando MPD para fora.

Descer e subir rampas: abdução do MPD, deslocamento leve para direita com a garupa

Obstáculos: hipermetria nos MTs. Não tropeça.

Andar com pescoço estendido: sem muitas alterações, leve hipermetria

Deslocamento garupa: deslocamento lateral, mais evidente do lado esquerdo

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1-2**

Treinador notou mais força durante os exercícios.

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Mais força nos 4 membros, trotou na subida da rampa. Propriocepção um pouco diminuída nos MTs. Não deixou realizar propriocepção com os MPs (coice). Ainda um pouco de paresia e ataxia nos MPs.

Andar e trotar em linha reta: leve abdução MPD

Afastar: NDN

Andar em círculos: abdução menos exacerbada dos membros do lado de fora do círculo

Descer e subir rampas: leve abdução MPD. Trotou na subida.

Obstáculos: NDN

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: leve deslocamento para os dois lados

Animal 2

Anamnese

Animal foi mantido em baia durante alguns meses no ano de 2013, e quando retornou para a propriedade estava “bambo”. Foi tratado com Baycox® (toltrazurila) e DMSO apresentando melhora de 100%. Houve uma recidiva há 3 meses, foi tratado novamente com pouca melhora.

Avaliação inicial do animal antes do transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Treinador queixa de desequilíbrio durante o trote e fraqueza. Propriocepção diminuída nos 4 membros. Paresia e ataxia dos MPs. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: às vezes nota-se paresia nos MTs

Afastar: arrasta um pouco os MPs

Andar em círculos: abdução dos membros do lado de fora do círculo para os dois lados

Descer e subir rampas: deslocamento leve da garupa para o lado direito.

Fraqueza e leve abdução dos MPs

Obstáculos: tropeça com MTs

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: deslocamento mais exacerbado para o lado direito

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Treinador relatou que durante o trabalho está apresentando mais equilíbrio, mais força, trotando mais confiante, respeita a vara no chão. Propriocepção diminuída nos 4 membros. Postura anormal dos membros quando parado.

Ataxia dos MPs.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Afastar: arrasta um pouco MPs

Andar em círculos: abdução do membro do lado de fora do círculo dos dois lados

Descer e subir rampas: abdução MPD e leve deslocamento da garupa para o lado direito

Obstáculos: encostou MP no início do teste, depois nenhuma alteração

Andar com pescoço estendido: leve ataxia

Deslocamento garupa: deslocamento mais evidente para o lado direito

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos 4 membros. Postura anormal dos membros quando parado. Ataxia dos MPs.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Andar em círculos: abdução do membro de fora do círculo, pisou no membro oposto

Descer e subir rampas: ataxia MPs

Obstáculos: encostou um pouco MPs

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: mais perceptível do lado direito

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos 4 membros quando feito a abdução, porém normal quando os membros são colocados cruzados. Postura anormal dos membros quando parado. Ataxia e paresia dos MPs.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Afastar: fraqueza nos MPs

Andar em círculos: leve abdução do MPE

Descer e subir rampas: paresia e ataxia dos MPs

Obstáculos: NDN

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: deslocamento para o lado direito

Animal 3

Anamnese

Animal foi adquirido em 2012 com sinais brandos de incoordenação, foi tratado com ponazuril e DMSO apresentando melhora. Houve uma recidiva em

2013, foi tratado novamente com pouca melhora, ficando com sinais neurológicos desde então. Apresenta uma artrose grave em articulação do jarrete do MPD, e lesão no MAE, com claudicação bem evidente.

Avaliação inicial do animal antes do transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 3.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Permanece muito tempo deitada e apresenta um pouco de dificuldade para levantar. Propriocepção diminuída nos MPs. Paresia e ataxia dos MPs, quase cai ao retirar um dos MTs do chão. Postura anormal dos membros quando parado. Muita dificuldade para fazer curva.

Andar e trotar em linha reta: rotação dos MPs, abdução do MPD. Dificuldade em trotar, e quando trota é semelhante a coelho com os MPs.

Afastar: muita dificuldade. Atraso no movimento dos MPs, parece que vai cair

Andar em círculos: pivô com o MPD, ataxia

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados, mais evidente no lado esquerdo

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Proprietário notou mais força nos MPs. Propriocepção diminuída nos MPs. Não apresenta mais chance de queda durante os testes. Postura anormal dos membros quando parado. Ataxia e paresia dos MPs. Curva com passos curtos dos MTs.

Andar e trotar em linha reta: mais força nos MPs, rotação dos MPs durante passo e abdução durante trote

Afastar: arrasta MPs, passo curto, não aparenta que vai cair, MPs mais fortes

Andar em círculos: ataxia, base ampla dos MPs

Descer e subir rampas: ataxia, passo largo

Obstáculos: tropeça, MPD não faz a flexão

Deslocamento garupa: evidente do lado esquerdo

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Fazendo curva com mais facilidade. Propriocepção diminuída nos MPs.

Postura anormal dos MPs quando parado. Ataxia e paresia dos MPs.

Andar e trotar em linha reta: rotação apenas do MPD. Mais força no MPE.

Afastar: arrasta MPD (não flexiona o tarso – artrose)

Andar em círculos: Muito mais facilidade. Quando MPE no centro do círculo apresenta paresia.

Descer e subir rampas: abdução MPD

Obstáculos: tropeça com MPD

Deslocamento garupa: mais força, sem deslocar muito

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MPs. Ataxia e paresia dos MPs.

Andar e trotar em linha reta: abdução dos MPs ao trote

Afastar: dificuldade no MPD

Andar em círculos: pivô com MPE dentro do círculo, dificuldade para movimentar MPD quando fora do círculo

Descer e subir rampas: MPE com paresia

Obstáculos: NDN (dificuldade em flexionar o membro por causa da artrose)

Deslocamento garupa: leve deslocamento para esquerda

Animal 4

Anamnese

Há 5 anos foi notado atrofia da musculatura da garupa, que foi piorando com o tempo. Foi feito tratamento com dimesol e diclaizuril, apresentando

melhora. Teve 3 recidivas, ficando com sequela grave após a última. Possui uma escoliose muito grave e o MPE é rotacionado lateralmente.

Avaliação inicial do animal antes do transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 3.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Atrofia do MPE, arrasta o membro, espasticidade. Paresia MPD. Grande chance de cair ao tentar realizar as manobras especiais. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: deslocamento da garupa para direita (escoliose), às vezes anda de lado, e às vezes chega a rodar. Arrasta MPE. Não consegue trotar.

Afastar: muita dificuldade. Espasticidade MPE. Conforme afasta vai rotacionando o tronco para o lado direito (escoliose)

Andar em círculos: arrasta MPE quando dentro do círculo. Espasticidade dos MPs.

Descer e subir rampas: arrasta MPE e rotaciona o tronco para o lado direito

Deslocamento garupa: espasticidade MPE.

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Apresenta mais força nos MPs, algumas vezes fica com a escoliose bem menos evidente quando parado. Não apresenta risco de queda durante o exame. Paresia e ataxia dos MPD.

Andar e trotar em linha reta: arrasta o MPE. Garupa rotacionada para direita. Às vezes anda de lado.

Afastar: afasta com dificuldade, mas consegue dar 2 passos antes de rotacionar a garupa para a direita

Andar em círculos: dificuldade de girar para a direita (MPD no centro do círculo, espástico). Quando gira para esquerda faz pivô com o MPD.

Descer e subir rampas: desce com mais força no MPD, porém desce bem lateralizada para a direita.

Obstáculos: dificuldade por causa da espasticidade e escoliose

Deslocamento garupa: MPE espástico

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Quando parada está bem mais reta (menos escoliose). Mais força nos MPs, andando melhor. Propriocepção diminuída MPs, bem evidente no MPD.

Paresia MPD. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: MPE sem arrastar a maior parte do tempo, troca o passo, menos espástico. Ainda desequilibra a garupa para a direita.

Afastar: afasta com dificuldade, sem arrastar muito os MPs, mas rotaciona a garupa para a direita

Andar em círculos: círculo para a direita, com MPD no centro, sem fazer pivô e sem abduzir o MPE. Círculo para esquerda, faz pivô com MPE que está no centro do círculo.

Descer e subir rampas: ataxia MPs

Obstáculos: passou os obstáculos fazendo o movimento de flexão dos MPs

Deslocamento garupa: MPE menos espástico.

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MPs. Postura anormal dos membros quando parado. Ataxia e paresia dos MPs.

Andar e trotar em linha reta: escoliose, garupa se desloca para a direita. Menos espasticidade MPE.

Afastar: afasta com dificuldade, rotacional com a garupa para o lado direito

Andar em círculos: no círculo para a esquerda, faz pivô com o MPE

Descer e subir rampas: arrasta MPE, apresenta mais força no MPD

Obstáculos: encosta MPE no obstáculo, não flexiona muito

Deslocamento garupa: menos espasticidade MPE

Animal 5

Anamnese

Há 3 meses começou a arrastar a pinça dos 4 membros, sendo os MPs piores. Foi tratada com Hiprosil® (diclazuril), dimesol e banamine (flunixin meglumine) por 45 dias, apresentando melhora de 80%.

Avaliação inicial antes do primeiro transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos torácicos, MPs não deixa pegar (coice). Quando anda em terreno acidentado evidencia paresia dos 4 membros, arrasta pinça, fraqueza.

Andar e trotar em linha reta: paresia sutil MPE

Afastar: arrasta poucas vezes o MPE

Andar em círculos: MPE mais lento

Descer e subir rampas: paresia MPs

Obstáculos: paresia MPE

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: deslocamento para o lado esquerdo

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MTs na abdução dos membros. Mais força no MPE durante o deslocamento da garupa, mas ainda com um pouco de paresia.

Andar e trotar em linha reta: MPE um pouco mais lento ao passo

Afastar: NDN

Andar em círculos: MPE mais lento um pouco

Descer e subir rampas: arrasta MPs

Obstáculos: fraqueza leve do MPE

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: força no MPE. Quando puxada para o lado direito se irrita.

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MTs, não deixa realizar o exame com os MPs.

Apresenta mais força no MPE.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Afastar: NDN

Andar em círculos: paresia leve no MPE

Descer e subir rampas: paresia MPs

Obstáculos: paresia leve MPE, com um pouco de hipermetria

Deslocamento garupa: sem deslocamento para lado esquerdo. Quando deslocada para o lado direito, se irrita.

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 0-1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Animal está muito bem, ficou até chata não deixando realizar alguns exames, tentando morder, dando coice. Propriocepção normal.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Afastar: NDN

Andar em círculos: arrastou um pouco o MPD

Descer e subir rampas: NDN

Obstáculos: NDN

Deslocamento garupa: firmeza para os dois lados. Tentou dar coice com as duas patas.

Animal 6

Anamnese

Há 3 anos apresentou sinais de incoordenação, foi tratado com diclazuril e ficou bom. Em abril de 2016 teve uma recidiva, foi tratado novamente com diclazuril, apresentando melhora de 60%.

Avaliação inicial antes do primeiro transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Paresia, ataxia e hipermetria nos 4 membros, sendo mais evidente nos MPs.

Sem risco de quedas espontâneas. Postura anormal dos MPs quando parado.

Propriocepção normal nos MTs e ausente nos MPs, quando abduzidos.

Andar e trotar em linha reta: arrasta os MPs, abdução, deslocamento lateral da garupa, hipermetria

Afastar: arrasta os 4 membros e faz abdução dos MPs, um pouco de espasticidade

Andar em círculos: abdução e hipermetria do membro do lado de fora do círculo, arrasta os MPs

Descer e subir rampas: paresia dos 4 membros, mais severa nos MPs. Abduz MPs, espasticidade, emboleta

Obstáculos: hipermetria dos MPs, e tropeça com MTs

Andar com pescoço estendido: muita dificuldade, relutância em fazer o movimento

Deslocamento garupa: desloca pouco para a esquerda, apresenta espasticidade. Se desloca com facilidade para o lado direito

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Proprietário acha que os membros estão mais firmes, relata que o animal está tentando dar coice, brigando por ração. Propriocepção normal nos MTs, e

ausente nos MPs quando os membros estão abduzidos, e diminuída ao cruzar os membros. Não arrasta mais a pinça dos MTs. Menos espasticidade. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: espasticidade dos MPs, arrasta pinça dos MPs, abdução dos MPs

Afastar: espasticidade nos MPs, arrasta os 4 membros

Andar em círculos: abdução e hipermetria dos MPs, sendo o MPD pior

Descer e subir rampas: espasticidade, hipermetria, abdução e arrasta a ponta dos cascos dos MPs

Obstáculos: paresia dos MPs, tropeça mais com MPD

Andar com pescoço estendido: hipermetria, mas realizou o teste sem dificuldade

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados, mas mais fácil para a esquerda

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Mífase no casco do MPE, quando vai fazer curativo não aguenta se manter só em um MP. Propriocepção normal nos MTs e ausente nos MPs. Não arrasta mais as pinças ao caminhar.

Andar e trotar em linha reta: espasticidade e hipermetria no MPD acentuada ao fazer a curva. Abdução dos MPs ao trote

Afastar: arrasta menos os MTs, menos espasticidade. Afasta com os MPs abertos

Andar em círculos: pivô com MPD. Hipermetria com MP de fora do círculo

Descer e subir rampas: hipermetria e arrasta as pinças dos MPs

Obstáculos: sem hipermetria. Bateu casco em alguns passos

Deslocamento garupa: espasticidade MPD, deslocamento mais evidente para o lado esquerdo

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Consegue levantar o pé, se mantendo somente apoiado em um dos MP para fazer o curativo da ferida por miíase. Hipermetria somente em alguns movimentos, pouca espasticidade no MPD. Paresia nos membros.

Propriocepção dos MTs normal, nos MPs ausente quando abduzidos e diminuída ao cruzar. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: MPD com pouca espasticidade, paresia dos MPs, abdução mais em MPD durante trote

Afastar: arrasta os MPs

Andar em círculos: paresia mais evidente no MPD, abdução dos membros do lado de fora do círculo

Descer e subir rampas: hipermetria e espasticidade nos MPs

Obstáculos: paresia, bateu pinça

Andar com pescoço estendido: um pouco de hipermetria

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados, esquerda mais evidente

Animal 7

Anamnese

Apresentou os sinais de MEP em 2012, foi tratado com hiprosil e acupuntura por 60 dias, ficou bom. No início de 2016 começou a cair espontaneamente, foi tratado com diclazuril e acupuntura por 30 dias, apresentando melhora de 50%. Histórico de hiporexia. Animal muito magro.

Avaliação inicial antes do primeiro transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MTs e ausente nos MPs, pior no MPE. Paresia nos 4 membros. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: paresia e ataxia, passos curtos, pisa no membro oposto, arrasta pinça

Andar em círculos: pivô sobre os membros, pisa no membro oposto

Descer e subir rampas: paresia, arrasta pinça MPs, abdução dos MPs, fraqueza muscular

Obstáculos: paresia, tropeça

Andar com pescoço estendido: hipermetria dos MTs e paresia dos MPs

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Proprietário relata que o cavalo consegue se espojar, consegue deitar e levantar sozinho, está mais firme.

Propriocepção diminuída nos 4 membros. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: ataxia e paresia dos 4 membros, cruza os MTs às vezes

Afastar: arrasta os MTs e faz abdução dos MPs

Andar em círculos: pivô e demora para troca o passo. Pior com MPD no centro do círculo

Descer e subir rampas: paresia, arrasta e abduz os MPs

Obstáculos: paresia dos MPs, tropeça no obstáculo

Andar com pescoço estendido: hipermetria dos MTs

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Animal está apresentando tosse, mucosas hipocoradas e perdeu peso.

Mais força nos membros, não arrasta mais a pinça. Postura anormal dos membros quando parado. Propriocepção diminuída nos 4 membros.

Andar e trotar em linha reta: fraqueza muscular, sem arrastar a pinça

Afastar: arrasta um pouco os MTs

Andar em círculos: pivô com membro do lado interno do círculo, pior no MPD

Descer e subir rampas: fraqueza muscular, deslocamento da garupa

Obstáculos: tropeçando menos, mas bateu

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Animal continua apresentando muita tosse, bastante secreção pelas narinas, mucosas hipocoradas e perdeu peso.

Não arrasta mais a pinça. Postura anormal dos membros quando parado.

Realizando as manobras especiais com mais facilidade mas ainda com déficits.

Propriocepção diminuída nos 4 membros.

Andar e trotar em linha reta: fraqueza muscular

Afastar: não arrasta pinça

Andar em círculos: pivô com membro de dentro do círculo, pior no MAD

Descer e subir rampas: fraqueza dos MPs, arrasta pinça, desloca garupa

Obstáculos: fraqueza nos MPs, encostando no obstáculo

Andar com pescoço estendido: leve hipermetria e cruza os MTs poucas vezes

Deslocamento garupa: deslocamento para os dois lados

Animal 8

Anamnese

Os sinais de incoordenação iniciaram no início da doma. Foi tratado com dimesol e diclazuril por 60 dias. Ainda apresenta incoordenação.

Avaliação inicial antes do primeiro transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 3.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Postura anormal dos membros quando parado. Quando se estressa, perde a postura deslocando a garupa para trás (movimento de sentar). Pisa nos membros opostos. Propriocepção diminuída 4 membros.

Andar e trotar em linha reta: ataxia, cruza membros, pisa no membro

Afastar: fraqueza muscular, arrasta um pouco os membros

Andar em círculos: déficits mais evidentes girando para a direita. Abdução do membro de fora do círculo. Arrasta MTs um pouco

Descer e subir rampas: arrasta pinça dos MPs, mais evidente no MPE, fraqueza da garupa

Obstáculos: tocou o obstáculo com MTs, um pouco de hipermetria (animal com medo do obstáculo)

Andar com pescoço estendido: um pouco de dificuldade, jogou garupa para trás

Deslocamento garupa: deslocamento para esquerda mais evidente

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 2.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Postura anormal dos membros quando parado. Propriocepção diminuída nos 4 membros. Mais força nos MPs durante o deslocamento da garupa.

Andar e trotar em linha reta: ataxia, cruza um pouco MPs ao trote

Afastar: afastou com menos dificuldade. Arrasta MTs, fraqueza muscular do MPs, agachou no final

Andar em círculos: pivô com membros de dentro do círculo, arrasta um pouco os membros

Descer e subir rampas: fraqueza MPs, arrasta um pouco a pinça

Obstáculos: ataxia, um pouco de hipermetria no início

Deslocamento garupa: deslocamento leve para esquerda

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Andando e trotando bem melhor. Postura dos MTs normal quando parado.

Propriocepção um pouco lenta. Animal está bem mais dócil, tranquilo.

Andar e trotar em linha reta: sem dificuldade, NDN

Afastar: um pouco de fraqueza nos MPs, mas não arrasta mais o casco.

Afastou sem dificuldade

Andar em círculos: não fez pivô com o membro. Abdução do MPE quando pra fora do círculo

Descer e subir rampas: um pouco de hipermetria dos MTs e do MPE

Obstáculos: encostou só a ponta do casco poucas vezes

Andar com pescoço estendido: um pouco de hipermetria dos MTs e paresia

Deslocamento garupa: bem firme, desloca muito pouco

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Treinador relata mais força nos membros e equilíbrio, mesmo andando no redondel.

Mais força nos membros, não arrasta mais a pinça. Postura anormal dos membros quando parado.

Propriocepção diminuída nos MTs na abdução dos membros. Mais força no MPE durante o deslocamento da garupa, mas ainda com um pouco de paresia.

Andar e trotar em linha reta: andando bem, ao trote um pouco de abdução do MPD no final

Afastar: um pouco de fraqueza no fim do movimento

Andar em círculos: abduz um pouco MPE quando fora do círculo, arrasta um pouco MPE quando dentro do círculo

Descer e subir rampas: um pouco de fraqueza nos MPs, arrasta às vezes a pinça do MPE

Deslocamento garupa: bem firme, desloca só um pouco para o lado esquerdo

Animal 9

Anamnese

Apresentou sinais agudos de incoordenação quando bem nova, foi tratada com dimesol e diclazuril por 60 dias. Desde então continua com sinais de incoordenação.

Avaliação inicial antes do primeiro transplante de CTM (M0)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MTs e no MPE. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: paresia ao fazer a curva, abdução dos MPs

Afastar: arrasta o casco, mas sem muita dificuldade

Andar em círculos: ataxia, abdução dos MPs de fora do círculo

Descer e subir rampas: pouco de fraqueza muscular, evidenciado ao fazer a curva

Obstáculos: medo dos obstáculos, bateu casco algumas vezes

Andar com pescoço estendido: ataxia, cruza os MTs às vezes

Deslocamento garupa: deslocamento para esquerda

Avaliação 30 dias após o primeiro transplante de CTM (M30)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Propriocepção diminuída nos MAD e MPD. Postura anormal dos membros quando parado.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Afastar: arrasta bem pouco MPD

Andar em círculos: arrasta e abduz MPE quando fora do círculo, abduz um pouco o MPD

Descer e subir rampas: passos um pouco curtos com MPs

Obstáculos: com medo dos obstáculos, bateu os casco uma vez

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: deslocamento para esquerda maior que para a direita

Avaliação 30 dias após o segundo transplante de CTM (M60)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Postura anormal dos membros quando parado. Propriocepção normal a um pouco diminuída nos MTs, e diminuída no MPE.

Andar e trotar em linha reta: NDN

Afastar: não afastou

Andar em círculos: hiperflexão do MPD e abdução do MPE no círculo para direita, e abdução do MPD no círculo para esquerda

Descer e subir rampas: MPs um pouco espásticos, passos curtos

Obstáculos: NDN

Andar com pescoço estendido: NDN

Deslocamento garupa: pouco para esquerda e direita

Avaliação 30 dias após o terceiro transplante de CTM (M90)

Grau de locomoção e postura do equino com incoordenação motora: **Grau 1.**

Exame neurológico: nível de consciência normal, postura normal da cabeça, comportamento NDN, nervos cranianos normais.

Treinador relatou melhora no galope, antes galopava igual coelho, agora normal.

Postura anormal dos membros quando parado.

Propriocepção diminuída nos MTs. Não deixou realizar a propriocepção com MPs, ficou puxando os pés.

Andar e trotar em linha reta: NDN, abduz um pouco MP quando faz a curva trotando

Afastar: um pouco rígida, mas não sabe afastar

Andar em círculos: abduz membro de fora do círculo

Descer e subir rampas: um pouco de fraqueza, abdução leve do MPD

Obstáculos: NDN

Deslocamento garupa: desloca um pouco para esquerda e direita

Anexo 2

Normas de publicação da Revista “*Stem Cell Research & Therapy*”.

General formatting guidelines

- [Preparing main manuscript text](#)
- [Preparing illustrations and figures](#)
- [Preparing tables](#)
- [Preparing additional files](#)

Preparing main manuscript text

[Back to top](#)

Quick points:

- Use double line spacing
- Include line and page numbering
- Use SI units: Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF
- Do not use page breaks in your manuscript

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)

Please note: editable files are required for processing in production. If your manuscript contains any non-editable files (such as PDFs) you will be required to re-submit an editable file when you submit your revised manuscript, or after editorial acceptance in case no revision is necessary.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file. For more information, see [Preparing figures](#) below.

Additional information for TeX/LaTeX users

Please use BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile if you use TeX format. Submit your references using either a bib or bbl file. When submitting TeX submissions, please submit both your TeX file and your bib/bbl file as manuscript files. Please also convert your TeX file into a PDF (please do not use a DIV file) and submit this PDF as a supplementary file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by our production team as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

The Editorial Manager system checks for any errors in the Tex files. If an error is present then the system PDF will display LaTeX code and highlight and explain the error in a section beginning with an exclamation mark (!).

All relevant editable source files must be uploaded during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the production process.

TeX templates

[BioMedCentral_article](#) (ZIP format) - preferred template

[Springer_article](#) svjour3 (ZIP format)

[birkjour](#) (Birkhäuser, ZIP format)

[article](#) (part of the [standard TeX distribution](#))

[amsart](#) (part of the [standard TeX distribution](#))

Style and language

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Visiting the [English language tutorial](#) which covers the common mistakes when writing in English.
- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates [Nature Research Editing Service](#) and [American Journal Experts](#).

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in the journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

Data and materials

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spread sheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the list of recommended repositories in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Instructions for Authors for the relevant journal and article type for journal specific policies.

For all manuscripts, information about data availability should be detailed in an 'Availability of data and materials' section. For more information on the content of this section, please see the Declarations section of the relevant journal's Instruction for Authors. For more information on BioMed Centrals policies on data availability, please see our [editorial policies].

Formatting the 'Availability of data and materials' section of your manuscript

The following format for the 'Availability of data and materials' section of your manuscript should be used:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http:// format]."

The following format is required when data are included as additional files:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) included within the article (and its additional file(s))."

BioMed Central endorses the Force 11 Data Citation Principles and requires that all publicly available datasets be fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI.

For databases, this section should state the web/ftp address at which the database is available and any restrictions to its use by non-academics.

For software, this section should include:

- Project name: e.g. My bioinformatics project
- Project home page: e.g. <http://sourceforge.net/projects/mged>
- Archived version: DOI or unique identifier of archived software or code in repository (e.g. enodo)
- Operating system(s): e.g. Platform independent
- Programming language: e.g. Java
- Other requirements: e.g. Java 1.3.1 or higher, Tomcat 4.0 or higher
- License: e.g. GNU GPL, FreeBSD etc.
- Any restrictions to use by non-academics: e.g. licence needed

Information on available repositories for other types of scientific data, including clinical data, can be found in our [editorial policies](#).

References

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice.

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission. For further information including example references please read our reference preparation guidelines.

What should be cited?

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited.

Unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE.

Any in press articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

How to format your references

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style, they may need to be retyped and carefully proofread.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med*. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007.

doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing figures

[Back to top](#)

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.

- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file that fits on a single page in portrait format.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figures should be uploaded in the correct orientation.
- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** In order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Figure file types

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)

- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

For information and suggestions of suitable file formats for specific figure types, please see our [author academy](#).

Figure size and resolution

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure
- width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

Figure file compression

- Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.
- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.
- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

If you have any questions or are experiencing a problem with figures, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

Preparing tables

[Back to top](#)

When preparing tables, please follow the formatting instructions below.

- Tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.).
- Tables less than one A4 or Letter page in length can be placed in the appropriate location within the manuscript.
- Tables larger than one A4 or Letter page in length can be placed at the end of the document text file. Please cite and indicate where the table should appear at the relevant location in the text file so that the table can be added in the correct place during production.
- Larger datasets, or tables too wide for A4 or Letter landscape page can be uploaded as additional files. Please see [below] for more information.
- Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). Please use the standard file extensions.
- Table titles (max 15 words) should be included above the table, and legends (max 300 words) should be included underneath the table.
- Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using 'Table object' function in your word processing program.
- Color and shading may not be used. Parts of the table can be highlighted using superscript, numbering, lettering, symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend.
- Commas should not be used to indicate numerical values.

If you have any questions or are experiencing a problem with tables, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

Preparing additional files

[Back to top](#)

As the length and quantity of data is not restricted for many article types, authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

All Additional files will be published along with the accepted article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files, if requested, should be sent by email to the journal's editorial email address, quoting the manuscript reference number. Please do not send patient consent forms unless requested.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" should be included as additional files. Since many web links and URLs rapidly become broken, BioMed Central requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. Do not include any individual participant details. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

For further guidance on how to use Additional files or recommendations on how to present particular types of data or information, please see [How to use additional files](#).

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the CONSORT extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons.

Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses

- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests

- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections. If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer.

You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement.

Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated

during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#). BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow

journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in

the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database.

<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In:

Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007.

doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998.

<http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999).

Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999).

Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006).

Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database.

2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Figures, tables additional files

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.

Anexo 3

Normas de publicação da Revista “*Equine Veterinary Journal*”.

EQUINE VETERINARY JOURNAL

AUTHOR GUIDELINES

1. GENERAL INTRODUCTION

Equine Veterinary Journal (EVJ) publishes and promotes high quality research focused on equids that informs veterinary science and improves clinical practice. This unrivalled international scientific journal is published 6 times per year with around 128 pages per issue, containing articles with original and potentially important findings. Contributions are received from sources worldwide.

EVJ publishes original articles and reviews on all aspects of equine veterinary science. Categories include General Articles, Technical Notes, Retrospective Case Series and Case Reports, Review Articles and Correspondence (see Section 3). They present new developments in research being carried out both by researchers in institutes and from clinicians in practice devoted to all aspects of equine and/or comparative veterinary sciences.

Original Manuscripts first undergo an Internal Editorial Assessment to ensure that the manuscript content is of interest to our readership, of high scientific quality and the manuscript format conforms to our guidelines described below. If deemed appropriate, manuscripts are sent for peer review and our review process is double-blinded (i.e. the reviewers are not identified to the authors and vice versa, see Marr, C.M. (2011) Masking the peer review process: better or worse? *Equine Vet J*, **43**, 249). Before being accepted for publication, at least two experts are consulted and many manuscripts also undergo assessment by an individual with expertise in study design and data analysis. Our median time for completing the review process for original submission is around 5 weeks. Accepted manuscripts are pre-published and submitted for indexing within a few days of acceptance.

Please read the instructions below carefully for details on format and submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as for information concerning the procedure after a manuscript has been accepted

for publication in *EVJ*. Authors are encouraged to visit [Wiley Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

2.1 Previous publications

Authors submitting an article do so with the understanding that the work and its essential substance have not been published in full before and is not being considered for publication elsewhere. If abstracts have been published, in print or online, full papers will be considered only if the published abstract was less than 1000 words and did not contain figures or tables. A copy of the abstract should be uploaded to ScholarOne at the time of submission as a supporting file (see Section 5.4). *EVJ* accepts material that has been presented orally at conferences that include web-based distribution of video or audio recording of presentations. Manuscripts are screened with software designed to detect plagiarism.

2.2 Authorship

2.2.i Responsibilities of authors

Corresponding authors should ensure that all authors are entered as co-authors when uploading the manuscript to ScholarOne. *EVJ* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors. Authors are expected to declare their specific contributions and editors may request further information and reserve the right to reject a manuscript if they feel excessive numbers of authors are included and/or ICMJE authorship criteria are not fulfilled. A statement of each author's contribution to study design, data collection and study execution, data analysis and interpretation, and preparation of the manuscript will be published. Authors should use the affiliation they held at the time the work described in the

manuscript was performed. First and/or corresponding authors may also list an additional, current address but this will not normally be included for co-authors. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under **Acknowledgements**.

For more extensive guidance on authorship, please go to www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html

2.2.ii Group Authorship

Formation of a group name for the article byline is a useful solution where a large number of authors meet the ICMJE criteria for authorship. When a large multi-author group has conducted the work, the group ideally should decide who will be an author before the work is started and confirm who is an author before submitting the manuscript for publication. All members of the group named as authors should meet all four criteria for authorship, including approval of the final manuscript, and they should be able to take public responsibility for the work and should have full confidence in the accuracy and integrity of the work of the other group authors. At the time of submission, EVJ expects that potential competing interests are declared for all members.

When submitting a manuscript authored by a group, the corresponding author should specify the group name if one exists, and clearly identify contributions of the group members.

The byline of the article identifies who is directly responsible for the manuscript, and MEDLINE lists as authors whichever names appear on the byline. If the byline includes a group name, MEDLINE will list the names of individual group members who are authors or who are collaborators, sometimes called non-author contributors, if there is a note associated with the byline clearly stating that the individual names are elsewhere in the paper and whether those names are authors or collaborators.

EVJ will publish the full list of author names as a supplementary (online only) item.

Further information on group authorship can be found from [Medline guidance](#) and from [ICMJE](#).

2.3. Ethical use of data from animals and humans in research

EVJ will reject manuscripts if the editors are not satisfied with the standards of ethical use of animals or data from humans in research. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used and also to insist that information is provided in the text as to the measures taken to protect the welfare of subjects and the outcome of procedures undertaken in respect to any pain or suffering caused. We prioritise owner informed consent regardless of whether it is a national or institutional requirement or not.

All research involving either experimental or clinical research on animals described in manuscripts submitted to *EVJ* must follow international, national, and/or institutional guidelines for humane animal treatment and complies with relevant legislation in the country in which the study was conducted. This normally involves review and oversight of the use and care of experimental animals by an institutional ethics committee. In some countries, review and oversight by an institutional or hospital ethics committee is also mandatory for clinical research. Where such a regulation is not in place, *EVJ* strongly encourages researchers to seek informal appraisal of their study protocols prior to undertaking any research on client-owned animals as we believe that this will improve the quality of the research, increase the likelihood that the planned outcomes will be achieved and help in the identification and management of adverse effects for the animals involved. The *EVJ* editors reserve the right to examine copies of signed owner informed consent forms on request and may approach institutional ethical committees where we wish to seek further information on local policies, procedures and regulations. Irrespective of whether the study has institutional ethical committee approval or not, authors are expected to satisfy the editors that they have conducted their research in an ethical manner.

EVJ regularly publishes editorial pieces outlining our position on the use of animals in research and authors are encouraged to ensure that they are familiar with these. More details of *EVJ*'s current and future policies regarding the use of animals in research can be found

at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.12390/full>.

2.3.i Experimental animals

EVJ endorses the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines) . Manuscripts describing studies involving experimental animals will be considered for publication only if the work:

- Demonstrates sufficient justification and merit for the in vivo approach employed.
- Provides details that adequate measures were taken to monitor and address the welfare of the animals involved, to provide pain control, and to manage any adverse effects.
- The outcomes for the experimental subjects must be described explicitly.

2.3.ii. Client-owned animals

Manuscripts describing research using client-owned animals will be considered for publication only if the work:

- Involves informed client consent for inclusion in the study for all prospective research and informed client consent may be required for some retrospective studies.
- EVJ accepts that informed client consent may be given by the horses' caretakers providing these individuals have the owners' authority to act as agents for the owner in relation to veterinary matters.
- Demonstrates a high standard of veterinary care.
- Client confidentiality must be maintained and authors should select photographs and video material with care to ensure that humans cannot be identified specifically (see section 2.3.iii).

2.3.iii. Materials derived from veterinary or post-mortem examinations

Research using tissues, fluids or cells that are collected during clinical procedures and are not specific to a patient group (i.e. any other horse could have been substituted) may be used for research provided that the owner has been made aware that these tissues may be retained for research purposes as part of the general consent for the clinical procedure and has been given the opportunity to opt out of research in general. Where archived material from specific groups of patients (whether defined by age, breed, sex, disease status or any other specific feature) is being studied, owner informed consent is required.

Normally, this requirement will be waived for research on samples archived as a result of clinical activities prior to 1 January 2017. For samples collected after

that date, authors may be asked to provide evidence that owner informed consent has been obtained. The *EVJ* editors also recognise that some studies include samples from unusual individuals that have been stored for many years and are prepared to discuss exemptions to the requirements for owner informed consent where historical samples are used. Authors should write to the editor setting out their specific concerns.

2.3.iv. Materials derived from abattoir material and veterinary or post-mortem examinations

Research using tissues, fluids or cells that are derived from commercial abattoirs do not require any form of consent from the previous owner but, if the specific abattoir is identified, the owner must give permission for publication of the abattoir identity.

2.3.v. Equine genetic research

Manuscripts describing research involving genetic profiling of horses, regardless of the origin of the material which was used for the research, will only be considered for publication if the work involves informed client consent for inclusion in the study.

This requirement is waived for genetic research involving historical samples such as bones obtained from museums etc. Authors may be asked to provide evidence that owner informed consent has been obtained.

2.3.vi. Data in the public domain and research on animals derived from Sporting Authorities

Manuscripts describing research including data on animals or humans that are derived from public archives, such as racing result websites, do not require owner informed consent or the consent of Sporting Authorities.

Research using tissues, fluids, cells, clinical records, images and any other data provided by Sporting Authorities does not require owner informed consent, provided that the relevant Authority has collected the material or data as part of their regulatory activity and that the authors can provide explicit evidence that the Sporting Authority has given permission for the study to be conducted and published.

When the research involves the analysis of genetic material from horses which has been obtained via Sporting Authorities' mandatory or regulatory activities, *EVJ* advises researchers that they should obtain owner informed

consent for genetic analysis, except where the researchers can provide explicit evidence that the Sporting Authority has informed horse owners that genetic material may be collected for research purposes and owner agreement to this requirement is implicit by participation in the sport.

2.3.vii. Data from humans

Manuscripts describing research including data on human demographics, attitudes and health related issues experienced by people in contact with horses will be considered for publication only if the work:

- Follows national, and/or institutional guidelines for research involving human subjects.
- Involves informed consent from the humans described in the study or legal guardian or executor, if appropriate.
- Written consent must be obtained from the patient (legal guardian or executor, if appropriate) for publication of any detail, video or photograph that might identify an individual. Submit evidence of such consent with the manuscript. For photographs or videos which have been taken by a third party for a different purpose, the authors should provide warranty that the copyright owner has obtained the necessary permissions.
- Where telephone or online questionnaires are completed as part of the research, *EVJ* accepts that consent is implicit by completion of the questionnaire, provided that the aims of the study and the researchers' intention to publish the results are clearly set out at the beginning of the questionnaire. Copies of the questionnaire instrument (translated into English if appropriate) must be uploaded with the manuscript for peer review and will be published, normally as a supplementary online item.
- Unstructured telephone discussions on clinical outcomes must be described as such and the term 'telephone questionnaire' must only be used where a formal script was followed and made available for peer review.

2.3.viii. Transparency and declarations

Our manuscript submission form contains a section in which information on legal and ethical issues must be provided. The editors may request additional information. This information will be included in the Declarations Section of the published article. Please also include this information under the separate

heading of 'Ethical Animal Research' in the 'Title page' document (see Section 4.2).

2.4 Antimicrobial Stewardship policy

Authors should consider WHO's risk management strategies for the containment of antimicrobial resistance in humans due to non-human use of antimicrobials. In particular, where quinolones, extended spectrum beta-lactam antimicrobials (such as 3rd/4th generation cephalosporins) or macrolides not labelled for use in horses in the country from which the report originates have been used as part of the treatment regimen, or are being evaluated for potential use in equine patients, the reasons underlying these choices must be robustly defended. Information on Critically Important Antimicrobials for Human Medicine can be found

at http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf.

Further discussion of *EVJ*'s Antimicrobial Stewardship Policy can be found in Bowen, Equine Veterinary Journal, Volume 45, Issue

2 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.12041/abstract>. *EVJ*'s

Antimicrobial Stewardship policy is, in part, a self-certifying process. In many clinical studies, for example those describing large retrospective series relating to surgical procedures, it may not be necessary or appropriate to list extensive details of antimicrobials given to the horses in the study. At the time of submission, authors will be asked if Critically Important Antimicrobials have been used and, if Critically Important Antimicrobials have been used, authors are expected to give specific details and to discuss and justify their use explicitly, including proposing alternative options in future if appropriate. When the cephalosporins licensed for use in the horse in the country of origin of the study described are used (such as ceftiofur and cephquinome), it is necessary to discuss this explicitly except where the specific indication differs from those licensed (ie. off label use). Where Critically Important Antimicrobials have not been used, it is often appropriate to include statements such as 'horses were given perioperative antimicrobials' without expanding further.

2.5 Competing interests

Authors are required to disclose any competing interests. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fees). Employment with commercial companies whose

products are used in the study should be stated and intention to apply for a patent by an individual or company in any way related to the authors must be declared. If the author does not include a competing interest statement in the submission form, then the following statement will be included by default: 'The authors have declared no competing interests'. Please also include this information under the separate heading of 'Competing interests' in the 'Title page' document (see Section 4.2).

Details of *EVJ*'s requirements for authors of sponsored editorial and workshop reports can be obtained on request from the Editor.

2.6 Source of funding

Authors are required to specify the source of institutional, private and corporate financial support for their research when submitting a paper. Please include this information under the separate heading of "Source of Funding" in the "Title page" document (see Section 4.2).

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers. If material is used that has been published elsewhere or is given as a personal communication, it is the author's responsibility to obtain permission from the publisher and author.

2.8 Appeal of decision

Authors who wish to appeal the Editors' decision on their submitted manuscript may do so by e-mailing Editor@evj.co.uk with a detailed explanation of their rationale for appealing the decision.

2.9 Copyright

The submission of the manuscript by the authors means that the authors agree to sign a Copyright Transfer Agreement form when the manuscript is accepted for publication. When the manuscript is accepted for publication, the copyright becomes the property of EVJ Ltd.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement: If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. Please ensure you read the details of the copyright agreement thoroughly and carefully to ensure that you are able to fully comply with the terms. The terms and conditions can be previewed in the sample associated with the copyright FAQs below:

CTA terms and

conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

For authors choosing OnlineOpen: If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

3. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

3.1 General Articles

Authors are encouraged to consult Wiley's Free Online Guide: [Writing for Publication in Veterinary Medicine](#).

General Articles should describe experimental or clinical studies, including systematic reviews. To minimise publication bias, *EVJ* encourages authors to publish negative results, providing authors can demonstrate that the study had adequate power to detect differences and study design is sufficiently robust.

Studies reporting negative results (i.e. null hypothesis cannot be rejected) will also be considered, providing study design is sufficiently robust.

General Articles should normally be around 4000 words including figure legends, table legends and references, with up to 3 tables and 6 figures.

Manuscripts exceeding 5000 words will not be sent to external peer reviewers.

Each figure can consist of 4 sub-panels. Figures must be selected carefully and each must enhance the article. Our reviewers and editors will assess the value of each and where individual figures are not considered essential they may be deleted or moved to online only. In all but exceptional circumstances, we are unlikely to publish 6 x 4 sub-panels in print. Our typesetters may choose to set out larger and composite figures across 2 columns but the author must consider the size of the resultant print images particularly where diagnostic images are included in sub-panels. Images will be scaled to fit the page layout by the typesetter. Details of specific formats and requirements are given in Section 4.11.

A summary, no more than 300 words in total, should be provided with the following headings.

- **Background:** The background behind the decision to choose this subject to study.
- **Objectives:** The statement that is being tested, and is testable by the methods (below); or the original aims and study deliverables.
- **Study Design:** Concise statement of the study design.
- **Methods:** Brief description of materials and methods and methods of testing hypotheses.
- **Results:** Brief highlights of the results obtained.
- **Main Limitations:** Concise statement of limitations and source of bias.
- **Conclusions:** Conclusions drawn from results.

For concise definitions of study designs, particularly those used for clinical research see http://phprimer.afmc.ca/inner/primer_contents_.

The introduction should be limited to 400 words. The introduction should be succinct (approximately two paragraphs), conveying why the subject is important and briefly describing what information is known. Bear in mind that many *EVJ* readers have a comprehensive knowledge of equine disease and avoid statements of an extremely basic nature. Do not provide a comprehensive

review of the literature but do state clearly the rationale for your study along with your hypothesis or research question and specific objectives. Add a sentence summarising how your approach will help fill the gaps in information previously stated. Do not summarise the study findings here and do not use excessive numbers of references to generally accepted introductory statements. It is not necessary to reference widely accepted clinical practices or knowledge.

The remainder of the manuscript should be presented in the following sections; Materials and Methods, Results, and Discussion, with subheadings, including data analysis, as appropriate. Additional tables, figures, video material or text describing further details of methods or results can be submitted as Supporting Information Items (see below). Where questionnaires or other similar instruments have been used to collect data a copy of these must be included for online publication translated into English if appropriate. All quantitative results should be analysed by appropriate statistical methods.

To minimise publication bias, *EVJ* encourages authors to publish negative results, providing authors can demonstrate that the study had adequate power to detect differences.

Pairs or larger sets of papers that must be reviewed, and subsequently read, together are not accepted and articles must describe discrete studies, using references where appropriate to make methods sections concise. If appropriate, authors can upload in press articles with identifying details removed, for reviewers' use.

Additionally, although no substitute for obtaining advice on study design and data analysis at the time of planning their work, prior to submission authors should as far as possible address and include the points in the [EVJ Statistical guidelines](#). Authors may find it helpful to use this [checklist](#) when assessing their manuscripts prior to submission.

Clinical research studies should:

- Address a clearly defined clinical question.
- Describe a study, based on naturally occurring disease that provides strong clinical evidence to define outcomes relating to specific therapeutic or diagnostic interventions, and/or to refine prognostic indicators.

- Provide objective and unambiguous definition criteria that are rigorously applied and explicitly reported.
- Evaluate clearly defined clinical outcomes that are rigorously applied and explicitly reported.

3.2 Retrospective case series and case reports

Larger retrospective case series should conform to the guidelines for General Articles. Smaller Case series (target word count 4000 words for up to 5-20 cases and up to 4 figures and 2 tables; 3000 words for 1-5 cases and up to 3 figures and 2 tables) with a short structured summary in our usual format (see Section 3.1), will normally be considered if their content addresses **at least one** of the following aims:

- Evidence of an hitherto unrecognised syndrome or disease.
- Evidence of emerging diseases in a previously unaffected country or region.
- Unreported or unusual side effects or adverse reactions involving medications, surgical or other veterinary procedures.
- Findings that shed new light on the possible pathogenesis of a disease.
- Findings that document a new diagnostic technique or novel application of existing technology.

Reports of novel treatments or invasive diagnostic techniques are unlikely to be considered unless a sufficiently large number of patients have been included to have reasonable insight in effectiveness and possible harms. Likewise, descriptions of congenital anomalies that have been well characterised in other species are unlikely to be of interest, except where the report fulfils other aims listed above. Authors should note that fewer than 10% of small case reports are accepted.

3.3 Brief Reports

3.3.a Technical Notes

A technical note is a short article giving a brief description of a specific development, technique or procedure, or it may describe a modification of an existing technique, procedure or device applicable to equine veterinary medicine (clinical or in a research setting). The technique, procedure or device described should have practical value and should contribute to clinical diagnosis or management, or be applicable in research. It could also present a software

tool, or an experimental or computational method. The article must describe a demonstrable advance on what is currently available. The main criteria for publication will be the novelty of concepts involved, the validity of the technique and its potential for clinical or research applications. The method needs to have been well tested in terms of accuracy, repeatability and safety, and ideally, but not necessarily, used in a way that proves its value.

Technical notes should be around 2500 words in length and should contain no more than 2 figures and 2 tables, with a short structured summary in our usual format (see Section 3.1).

3.3.b Short Communications

Equine Veterinary Journal no longer accepts Short Communications.

3.4 Review Articles

Review articles should normally address important topics relevant to equine veterinary medicine and synthesise results in areas in which there have been a large number of recent publications. Review articles are encouraged, however a preliminary discussion with the Editor regarding subject and length of the article is advisable before submission. Please include a list of the main points that the review will cover and a list of approximately 20 key references that you plan to cite. The word count for review articles should be around ≤ 6000 with no more than 6 figures and 2 tables.

3.5 Correspondence

We encourage readers to write letters to the editor for publication. These should usually address one main theme and, if they relate to a specific *EVJ* article the authors of that article will automatically be given the opportunity to write a response. Appraisals of published work must be measured in tone and ideally supported with specific evidence of weaknesses in the study design, methods, analysis of data or conclusions drawn from the results. Correspondence on general issues important to equine veterinary medicine is also welcomed. Correspondence is peer reviewed by at least 2 individuals and normally these will be *EVJ* editors and/or members of our Editorial Consultant Board.

3.6 Editorial

EVJ's editorial material is all commissioned and typically encompasses opinions on issues of current importance in equine veterinary sciences together with pieces expanding on studies published within the same *EVJ* issue. We are also

interested in including reports of conferences and workshops and short overviews of work that has recently been published in basic science journals that may be of interest to *EVJ* readers. Editorials in these last two categories are usually described as “Science-in-brief”. Conference organisers and scientists wishing to draw readers’ attention to relevant basic science studies are encouraged to contact the Editor to discuss their suggestion (Editor@evj.co.uk). Editorial is not peer-reviewed but is assessed by one or more of the *EVJ* editors prior to acceptance.

4. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE (A checklist is available at Section 7).

4.1. Manuscript file format

Manuscripts should be submitted as Word documents in double spacing on A4 page size, the pages should be numbered and there should be line numbers continuously throughout the document. Division of the paper should be indicated clearly by major headings, subheadings and sub-subheadings. Manuscript text must be uploaded as Word (.doc) (**not** write-protected). The text file must contain the manuscript including summary, text, references, tables and figure legends but no embedded figures. Figure tags should be included in the file. A word count for the entire text including figure and table legends and references (but not including Supplementary Information) should be provided. Figures should be provided in separate files (see below for details of format).

4.2 Authors’ identity and declarations

Authors’ names, institutes, affiliations and declarations should not be included within the manuscript in order to facilitate double blinded review. To ensure the integrity of this process, authors must create a separate Word document and upload this separately as the “Title page” document. This document should contain Ethical Considerations, Competing Interests, Sources of Funding, Acknowledgements and Authorship. Also list here any other details included in the Materials and Methods which might allow the reviewer to identify the authors or host institute, for example, reference to “in press” publications. In their place, within the main manuscript, state “masked for review” and highlight this. All such details must be included in the “Title Page” document, with reference to the appropriate line number. With all revisions, authors must re-

insert such details into a clean, unblinded version of their manuscript that should be uploaded in addition to the blinded version with revisions marked. Copies of “in press” publications, with relevant identifying details removed, should be uploaded as “supporting information” for reviewers’ use.

4.3 Keywords for publication

Authors can provide up to six keywords for publication immediately below the title which may help readers find the article in various search engines. These should be different from those used in the title and reflect the manuscript content and should usually include the word 'horse' or similar but not 'Equine' or 'Veterinary' as these terms will be included in most Search Engines as being within the journal's title. Keywords for publication should be listed within the 'Title Page' document immediately below the authors' names and addresses. Note during the submission process, you will also be required to choose ScholarOne keywords which facilitate the review process – see Section 5.6.

4.4 Language

The language of publication is English. Manuscripts in which the quality of English is insufficient may be rejected without peer review. Authors for whom English is a second language should consider having their manuscript professionally edited before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

EVJ provides Chinese translations of selected article summaries online within the Supporting Information section. Authors are welcome to include foreign language translations of their summary as supplementary items for online only publication. Such items should be entitled “Supplementary Item: Summary in French” etc. If appropriate, start numbering any additional supplementary items from 1.

4.5 Abbreviations, symbols and nomenclature

Doses and measurements should be given in metric (SI) units with /kg bwt added where appropriate. Abbreviations are discouraged. Where possible, only abbreviations that are in common use within the relevant field or discipline should be used. Authors must avoid inventing their own abbreviations for

anatomical terms and techniques. Where they are unavoidable, abbreviations must be explained in both the summary and main text. Spelling should conform to the Oxford English Dictionary, medical terminology to Dorlands Medical Dictionary and units, symbols and abbreviations should conform to the International System of Units defined by Baron, D.N. and Mc Kenzie Clarke, H (Eds) (2008) '*Units, Symbols, and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*, 6th edn.' Royal Society of Medicine Press, London. Authors should adhere to EVJ's preferred abbreviations for diagnostic imaging and preferred terminology and abbreviations for equine upper airways disorders and for equine echocardiography.

4.6 Drug names and manufacturers' details

The generic name of drugs, equipment or other materials should be given in the text, with product name in brackets. Recommended International Non-Proprietary Names

(rINNs) <http://www.mhra.gov.uk/Howweregulate/Medicines/Namingofmedicines/ChangestomedicinesnamesBANstorINNs/index.htm> should be used. The manufacturer's details (company name, town/city, state/county and country) should then be listed under a "Manufacturers' details" heading at the end of the article before the Reference section. References to this list should be indicated as superscript letters throughout the text. Brand or trade names should not be used in the title and must be in brackets throughout the text.

4.7 Optimising your article for search engines

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimising your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximise the web-friendliness of the most public part of your article (authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp).

4.8 References

It is the responsibility of the authors to ensure that all reference details are accurate. References are indicated throughout the text as numbers within square brackets [1, 2, 3 etc] and the final list of references must correspond with the order in which they appear in the main body of the text.

The format in the reference list is as follows: author(s) name(s) and initials, year of publication in parentheses, full title of article, journal title (in italics) as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals, volume number (in bold) and page numbers: e.g. Foster, B.W., Codd, J. and Smith, R. (1992) Effect of stress on ulcers in foals. *Equine Vet J* **35**, 43-52.

References to book articles should be set out as follows: author(s) name(s) and initials, date of publication in parentheses, title of chapter or article, full title of book, edition, name(s) of editor(s) if relevant, publisher, place of publication and pages referred to: e.g. Robin, C. (1991) Calcium in plants eaten by horses. In: *Dietary Calcium*, 2nd edn., Ed: J. Chalk, Blackwells Scientific, London. pp 195-201.

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see www.doi.org/ for more information. If an author cites work that does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for

here: www.endnote.com/support/enstyles.asp

Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

4.9 Table and figure Legends

Legends should be short as appropriate but should be intelligible to the reader without reference to the text. Legends should also cite references if appropriate. A list of figure legends should be placed at the end of the manuscript (before references).

4.10 Tables

Tables should be referenced in the appropriate place in the text but should be placed at the end of the text (before references) accompanied by appropriate legends. Duplication of data in tables, figures and text must be avoided.

4.11 Figures

Illustrations should be provided when necessary to clarify the text. Figures should be referred to in the text. Authors are encouraged to use colour in graphs, line drawing and other figures.

Photomicrographs must state magnification, preferably with a scale bar, and staining technique. Line drawings should be original diagrams on clean white paper or board and must be submitted in digital form (see below). Symbols and lines should be standard and not drawn by hand. Do not include a “chart title” when creating graphs and charts.

Print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. Do not use pixel-oriented programs. Scans (TIFF or JPG) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs and diagnostic imaging): >300 dpi; Larger images should be 174 mm wide at 300 dpi. Smaller sub-panel should be 84 mm wide at 300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> Check your electronic artwork before submitting it: <https://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

4.12 Supplementary Information

Supplementary Information is material that is not essential to the article but provides greater depth and background such as data sets or additional figures, tables or video files. It will not be published in the print edition of the journal, but will be viewable via the online edition. There is no limit to the number of supplementary items that can be included. Supplementary Information Items are subject to the peer review process and to ensure that the peer review process is blinded, it may be necessary for authors to upload 2 copies of some items, one of which is masked for peer review. The items should be referred to in the main body of the text of the article where appropriate. The availability of Supplementary Information should be indicated in the main manuscript by a list, to appear after the References, headed "Supplementary Information Items" and providing titles of figures, tables, etc. See Section 5.4 for details of how to upload these files.

Items submitted for inclusion online as Supplementary Information do not undergo copyediting or typesetting, rather they appear largely as the authors have submitted them with minor corrections being made by the Editors only. Therefore, supplementary items are not sent back to authors at the proof correction stage.

Supplementary Information items must be prepared as follows:

1. Submit each item as a separate file.
2. Text: Word (.doc) only; A4, page set up portrait, double spaced, top and bottom margins 3.17 cm; left and right margins 2.54 cm, continuous line numbers, page numbers, font – Arial size 10.
3. Figures: GIF, TIFF, EPS, PNG, JPEG, BMP, PDF; labelling Arial font, with size selected as appropriate for figure.
4. Tables: Word (.doc) only; A4, Page set up can be as portrait or landscape as appropriate; top and bottom margins 3.17 cm; left and right margins 2.54 cm, continuous line numbers, page numbers, font – Arial, size as appropriate.
5. Movies: MPEG, AVI or quicktime movie format. Any labelling should be should be in Arial font, with size selected as appropriate. Several small clips are preferable to one large movie.
6. A generous allowance is available for supplementary video but authors are encouraged to upload several smaller videos rather than use large ones which some readers may have difficulty downloading. The optimal maximum size of each individual supplementary item is around 10Mb.

4.13

The addition of a video abstract can increase the impact of articles. EVJ offers authors of accepted articles the opportunity to add a video abstract and further details of how to produce a video abstract will be provided shortly after acceptance.

5. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

5.1 ScholarOne manuscripts

EVJ uses ScholarOne Manuscripts for online manuscript submission and peer review found at <http://mc.manuscriptcentral.com/evj>. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. If you require assistance then click the **Get Help Now** link that appears at the top right of every ScholarOne Manuscripts page. EVJ requires

the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting his or her manuscript.

5.2 Covering letter

Submissions should include a covering letter stating that the paper is original, has not been submitted or published elsewhere, and has the approval of all authors.

5.3 Submission fee

There is a submission fee of £67.00 for every paper that goes through the peer review process. When a manuscript has been submitted to *EVJ* via ScholarOne, the corresponding author will receive an email with a submission fee form attached. The form can be filled in with credit card details and returned to the Editorial Office. If you prefer to pay by another method contact our Editorial Office (jane@evj.co.uk). This fee is waived if, during the Internal Editorial Assessment, it is decided the paper will not undergo further peer review.

5.4 Submission process

To allow double-blinded review, please upload your manuscript in the following manner:

1. Title page (including authors' names and affiliations, corresponding author's email address, keywords for publication, acknowledgements, conflicts of interest, source(s) of funding, word count and any details "masked for review") should be uploaded under the file designation "Title Page". Documents uploaded as "Title Page" will not be viewable in the HTML and PDF format you are asked to review at the end of the submission process.
2. Your manuscript, without a title page, under the file designation "Main Document"
3. Figure files under the file designation "Figure"
4. Tables under the file designation "Table"
5. Supplementary items under the file designation "Files for online publication only"
6. Supporting information (e.g. copies of previously published abstracts or "in press" publications, with identifying information removed for use by editors and reviewers) under the file designation "Supporting Information"

5.5 Suggesting a reviewer

In order to facilitate the review process, EVJ is prepared to receive suggestions from authors as to appropriate peer reviewers (with e-mail addresses) but these will be followed at the editors' discretion.

5.6 ScholarOne keywords

During the submission process, you will be required to select keywords describing the discipline(s) and body system/disease(s) that most closely relate to the content of your article from prescribed lists. These are used by the Editorial Office to match your article with appropriate reviewers. Note: these words can also be used as the "Keywords for Publication", but this is not obligatory – see Section 4.3.

5.7 Suspension of submission mid-way in the submission process

You may suspend a submission at any phase before clicking the "Submit" button and save it to submit later. The manuscript can then be located under "Unsubmitted Manuscripts" and you can click on "Continue Submission" to continue your submission when you choose to.

5.8 Confirmation of submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct, please contact your IT department. The error may be caused by spam filtering software on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

5.9 Manuscript status

You can access ScholarOne at any time to check your "Author Centre" for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

5.10 Submission of revised manuscripts

Revised manuscripts must be uploaded within 12 weeks of authors being notified that they are invited to submit a revision. Locate your manuscript under "Revised Manuscripts in Draft" and click on "Continue Submission" to submit your revised manuscript. If, however, it is not possible to resubmit within this time frame, please contact the Editorial Office (jane@evj.co.uk). It is essential that you provide a point-by-point response to each of the reviewers' comments.

All revised articles must be uploaded with:

(i) a main document containing a version which does not have a title page and is blinded and in which all changes are highlighted using 'track changes' mode. This version will be sent out to reviewers.

(ii) a document containing a version which includes the title page and in which blinding details have been re-inserted and changes are not marked. This should be uploaded with the file designation 'Clean Non-Blinded Copy'. If your manuscript is accepted, this version will be uploaded to our Accepted Articles section.

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Pre-publishing of Accepted Articles

EVJ pre-publishes accepted articles online within a few days of acceptance. This service is not available with editorial material or for some supplements. Accepted articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. Information about accepted articles is submitted to indexing services as soon as they appear online.

6.2 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article, once it has been accepted, through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript.

Visit <http://www.authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more. For more substantial information on the services provided for authors, please see [Wiley Blackwell Publishing Author Services](#).

6.3 Proof corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file

(www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Wiley Blackwell Production Editor within three days of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process and thus you must check your proofs carefully.

6.4 EarlyView (Online Publication Prior to Print)

EarlyView articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. EarlyView articles are the version of record and are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. As they are in final form, no changes can be made after online publication.

EarlyView articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.5 Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.6 Offprints and Extra Copies

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may only be distributed subject to the Publisher's terms and conditions, as described in the [Copyright Transfer Agreement](#).

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required

fields: offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG. If you have queries about offprints please e-mail offprint@cosprinters.com

6.7 Kudos: New Author Benefit to Increase Readership and Impact

Kudos is a web-based service that helps authors explain, enrich, and share their published work for greater readership and impact. It also provides direct access to a publication dashboard so authors can measure the effect of their actions across a wide range of metrics.

Wiley's partnership with Kudos makes the service free for all Wiley authors.

However, those who have registered with Wiley Author Services and opted into the mailing list will receive the most streamlined experience. The notification emails sent to those who are registered with Wiley Author Services contain a direct link to claim their article in Kudos. Authors who are unregistered or published prior to 2014 can claim authorship in Kudos by searching for articles by DOI, article title, or author name.

Once authors have claimed their articles, they are led through the following steps:

- Explain articles by adding lay summaries and highlighting what makes the work important.
- Enrich articles by adding links to related resources that put the research into context.
- Share via email and social media, while Kudos links across search engines and subject indexes.
- Access the dashboard area to view usage, citations, and altmetrics for the publications.

What are the benefits for authors?

- Discoverability and Impact - Increases the likelihood of their articles being found, read, and cited.
- Publication Metrics – Provides direct access to usage, citations, and altmetrics for their articles.
- Networking – Encourages interactions that build relationships and visibility within their communities.

Please also see this [introductory video](#) and [blog post](#) on Wiley Exchanges for more information.