



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
Emiliano Neves Vialle

ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
HUMANAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE NO TRAUMA RAQUIMEDULAR EXPERIMENTAL EM
RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, como requisito à obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Coorientadora: Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi
Rebelatto

CURITIBA

2023

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
HUMANAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NO TRAUMA RAQUIMEDULAR EXPERIMENTAL EM
RATOS

Aluno: Emiliano Neves Vialle
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Coorientadora: Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto

Curitiba, Agosto/2023

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Sônia Maria Magalhães da Silva – CRB 9/1191

V612a
2023

Vialle, Emiliano Neves

Análise histológica e imunohistoquímica da administração de células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo no trauma raquimedular experimental em ratos / Emiliano Neves Vialle ; orientador: Paulo Roberto Slud Brofman ; coorientadora: Carmen Lúcia Kunivoshi Rebelatto. – 2023.
68, [14] f. ; il. : 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2023
Bibliografia: f. 58-68

1. Medula espinhal – Ferimentos e lesões. 2. Células tronco – Mesenquimais. 3. Reabilitação neurológica. 5. Tecido adiposo. 6. Terapia celular. 7. Cirurgia experimental. 8. Rato. 9. Ciências médicas. I. Brofman, Paulo Roberto Slud. II. Rebelatto, Carmen Lúcia Kuniyoshi. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD. 20. ed. – 610

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
HUMANAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE NO TRAUMA RAQUIMEDULAR EXPERIMENTAL EM
RATOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Ciências da Saúde como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Coorientadora: Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi
Rebelatto

Curitiba, Agosto/2023

Aos portadores de lesão medular, fonte inesgotável de esperança e incentivo na busca de
uma cura para suas limitações.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e seus Professores, por superarem as expectativas educacionais através de sua dedicação e comprometimento.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman e Profa. Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, pelo apoio incondicional na realização deste projeto.

Às equipes do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, Anatomia Patológica e Cirurgia Experimental, por darem sentido ao conceito de Universidade, através de suas sugestões, ensinamentos e colaboração.

Aos alunos/colegas André Arruda, Joana Guasque e Cristiano Simões, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos meus pais, Luiz Roberto Vialle e Elizabeth Vialle, pelo esforço em oferecer a melhor educação possível a seus filhos.

À Carolina Vialle, Bernardo Vialle e Henrique Vialle, pela motivação e carinho dedicados durante este período.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 11 dias do mês de agosto de 2023 às 14:00, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese “ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO NO TRAUMA RAQUIMEDULAR EXPERIMENTAL EM RATOS” apresentado por **Emiliano Neves Vialle** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman - Presidente	
Profa. Dra. Lucia de Noronha – (PUCPR)	
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni – (PUCPR)	
Prof. Dr. Nelson Bergonse Neto – (UFPR)	
Profa. Dra. Carina Cohen Grynbaum - (UNIFESP)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Profa. Dra. Lucia de Noronha
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni
Prof. Dr. Nelson Bergonse Neto
Profa. Dra. Carina Cohen Grynbaum

Conceito: **APROVADO**
Conceito: **APROVADO**
Conceito: **4 aprovado**
Conceito: **APROVADO**
Conceito: **aprovado**

Parecer Final: **APROVADO**

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

A tese foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório Experimental de Cultivo Celular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR em colaboração com a Dr^a Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto e sua equipe. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente tese.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Organograma – uso de animais	31
Figura 2	Procedimento cirúrgico de lesão medular padronizada	32
Figura 3	Imagem da medula espinhal removida, com esquematização da área submetida a análise histológica	38
Figura 4	Perfil de expressão das CTDA	41
Figura 5	Diferenciação das CTDA	42
Figura 6	Avaliação <i>in vitro</i> da bioluminescência das CTDA	51
Figura 7	Avaliação <i>in vivo</i> da bioluminescência das CTDA	52
Gráfico 1	Histomorfometria - comparação dos grupos em relação aos valores absolutos de mielina.	44
Gráfico 2	Comparação dos grupos em relação à presença de neurônios identificados por meio da histomorfometria	46
Gráfico 3	Imunohistoquímica da área ocupada por astrócitos - área dividida em quadrantes	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos experimentais envolvendo CTDA	19
Tabela 2	Estudos clínicos envolvendo terapia celular para trauma raquimedular (apêndice)	22
Tabela 3	Avaliação histomorfométrica da área de mielina	43
Tabela 4	Comparação da área de mielina entre os grupos	43
Tabela 5	Avaliação dos corpos neuronais entre os grupos experimentais e controle	45
Tabela 6	Comparação quanto à presença de neurônios entre os grupos	46
Tabela 7	Descrição da área astrocitária em quadrantes, comparando-se os grupos experimentais	48
Tabela 8	Área ocupada por astrócitos - comparação entre os grupos experimentais	49

LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS

TRM	Trauma raquimedular	16
CT	Células-tronco	17
CTM	Células-tronco mesenquimais	17
CTDA	Células-tronco derivadas do tecido adiposo	17
GE	Grupo experimental	32
GC	Grupo controle	32
PUCPR	Pontificia Universidade Católica do Paraná	32
ISCT	International Society for Cell Therapy	33
PBS	Solução tampão salina fosfatada	35
DMEM-F12	Meio de Eagle modificado por Dulbecco e F12	35
SBF	Soro bovino fetal	35
HE	Hematoxilina-eosina	40
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência	40
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	40

RESUMO

Introdução: A lesão medular traumática gera grande incapacidade em uma população jovem e produtiva, e atualmente não há tratamento eficaz que seja capaz de reverter o dano causado ao tecido neural. As terapias celulares são uma opção dentre as estratégias terapêuticas na pesquisa da regeneração neuronal.

Objetivo: Avaliar o efeito da administração das células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo humano (CTDA), infundidas através da cauda equina, sobre a celularidade da medula espinhal, em ratos submetidos a trauma raquimedular (TRM) contuso experimental padronizado. Material e

Métodos: As CTDA foram expandidas e caracterizadas quanto a expressão de marcadores de superfície celular e o potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos.

Quarenta ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos - dois experimentais e dois controle.

Realizou-se o TRM ao nível de décima vértebra torácica (T10) por meio do “*Impactor Rutgers*”.

Um grupo experimental recebeu uma infusão de CTDA (1×10^6 células) no saco dural, enquanto o outro, duas infusões, com intervalo de sete dias. Os controles foram submetidos aos mesmos procedimentos e foi realizada a infusão de meio de cultura. CTDA transduzidas com o gene *green fluorescent protein*, foram infundidas em três animais de cada grupo para a rastreabilidade celular.

Após 40 dias do TRM, os animais foram submetidos a eutanásia seguida de avaliação histológica e imuno-histoquímica. Para avaliação estatística foram utilizados os testes t Student, e de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

Resultados: As CTDA apresentaram o perfil de expressão dos marcadores de superfície e potencial de diferenciação celular de acordo com os critérios estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) para células mesenquimais. Na análise histológica, não foi observada diferença entre os grupos em relação a área de mielina e a área ocupada pelos astrócitos. O número

absoluto de neurônios foi maior nos grupos que receberam a infusão de células, sem diferença entre os grupos experimentais. Na avaliação da rastreabilidade celular, foi observado que as células infundidas na cauda equina migram para o local da lesão, porém após 40 dias, não foi possível observar as células infundidas no tecido.

Conclusão: A terapia celular experimental com CTDA aplicada à distância em TRM contuso foi capaz de exercer efeitos benéficos no modelo animal padronizado.

PALAVRAS-CHAVE: traumatismo da medula espinhal; células-tronco mesenquimais; reabilitação neurológica; ratos; tecido adiposo; terapia celular; cirurgia experimental.

ABSTRACT

Introduction: Traumatic spinal cord injury is a devastating injury that affects a young and productive population, and currently there is not an effective therapy for reverting the neuronal damage to the spinal cord. Cellular therapies are among the current promising treatment strategies for neuronal regeneration.

Objectives: To evaluate the influence of the administration of adipose tissue derived adult mesenchymal stem cells (ADSC), infused through the cauda equina, on the spinal cord cellularity after experimental spinal cord injury in rats.

Material and Methods: The ADSC were expanded and characterized according to surface markers and differentiation potential into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. 40 *Wistar* rats were divided in four groups – two experimental and two control. The animals underwent a blunt spinal cord injury at T10 level, using the Rutgers Impactor device. One experimental group received one injection of ADSC (1×10^6 cells) immediately after the injury, while the other group received two injections, being the second seven days after the injury. The controls underwent the same procedure with placebo injection. ADSC with GFP gene transduction were injected in three animals for cellular tracking. Forty days after the injury, the spinal cords were removed for histological and immunohistochemical analysis. Data was statistically evaluated using Student's T-test, Mann-Whitney test, and the Bonferroni correlation.

Results: ADSC showed surface markers and differentiation potential according to the International Society for Cellular Therapy (ISCT) for mesenchymal cells. During histological analysis there was no difference regarding both myelin and astrocyte area. The absolute number of neuronal cells was superior in the experimental group, without difference between one and two injections. Cellular

tracking showed cellular migration towards the injury site, and after 40 days these cells were no longer identifiable.

Conclusion: The injection of ADSC after experimental spinal cord injury had a beneficial effect on the cellularity of the injured spinal cord.

Keywords: spinal cord injury; mesenchimal stem cells; stem cell transplantation; adipose tissue; neurological rehabilitation; experimental surgery; rats.

RESUMO POPULAR

A lesão medular traumática gera grande incapacidade em uma população jovem e produtiva, e atualmente não há tratamento eficaz que seja capaz de reverter o dano causado ao tecido neural. As terapias celulares são uma opção dentre as estratégias terapêuticas na pesquisa da regeneração neuronal. Este estudo avaliou o efeito da administração das células-tronco adultas humanas extraídas de tecido adiposo, no tecido medular de animais submetidos a trauma raquimedular contuso. Os animais foram divididos em quatro grupos, dois foram controles, que não receberam infusões de células-tronco, e os outros dois (grupo experimental), receberam uma ou duas infusões de células-tronco, após a lesão medular. A infusão das células foi no líquido cefalorraquidiano, distante do local da lesão. Os resultados foram medidos por meio de análise microscópica tecidual da medula, avaliando as células do sistema nervoso. Verificou-se que após a infusão, as células-tronco derivadas de tecido adiposo humano migram para o local da lesão e o número de neurônios foi maior no grupo de animais tratado com as células. Os resultados observados podem contribuir com a eficácia para o tratamento da lesão medular.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSSÃO	53
8. CONCLUSÃO	57
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
11. ANEXO 1	69

1. INTRODUÇÃO

O trauma raquimedular (TRM) apresenta-se em nossa sociedade como responsável por elevados índices de morbimortalidade, acometendo significativa parcela da população economicamente ativa em nosso meio e acarretando impactos socioeconômicos expressivos (CRIPPS; LEE; WING; WEERTS *et al.*, 2011; NOONAN; FINGAS; FARRY; BAXTER *et al.*, 2012). Acidentes automobilísticos, quedas de altura, acidentes por mergulhos em águas rasas e ferimentos por armas de fogo são as principais causas, seguidos de alterações secundárias à degeneração discal e lesões tumorais (NEW; FARRY; BAXTER; NOONAN, 2013; CHEN; HE; DEVIVO, 2016).

Em relação à fisiopatologia do TRM, após o fator desencadeante inicial da lesão, segue-se uma complexa e intrincada sequência de eventos que tem como resultado a morte neuronal e perda funcional abaixo do nível acometido, ocorrendo interrupção dos circuitos formados pelas fibras sensitivas aferentes e motoras eferentes que fazem a comunicação do córtex cerebral com o restante do corpo (CHOO; LIU; LAM; DVORAK *et al.*, 2007; LAPLACA; SIMON; PRADO; CULLEN, 2007). O TRM divide-se em duas fases: lesão primária – mecânica, aguda, com lesão direta e compressão dos elementos neurais; e secundária – isquêmica, relacionada a cascata bioquímica reativa com alteração de perfusão e fluxo sanguíneo local, influxo de cálcio, peroxidação lipídica e necrose tecidual, ocorrendo de forma proximal e distal à lesão primária e afetando principalmente neurônios e oligodendrócitos (HAUSMANN, 2003; KWON; TETZLAFF; GRAUER; BEINER *et al.*, 2004; FEHLINGS; PERRIN, 2005).

Diversas estratégias terapêuticas foram propostas a fim de tratar ou minimizar os danos causados pelo TRM. Os procedimentos cirúrgicos não são capazes de atuar nos processos bioquímicos de lesão secundária ou mesmo proporcionar algum estímulo à regeneração (FEHLINGS; PERRIN, 2005). Outras opções envolvendo medicamentos (corticoides, riluzole, hormônios, bloqueadores de canal de cálcio, entre outros) e proteínas específicas figuram nesse campo, cada qual com suas respectivas relações custo-benefício, não havendo até o momento nenhuma opção considerada como eficaz no tratamento do TRM (KWON; TETZLAFF; GRAUER; BEINER *et al.*, 2004; CHEN; ZENG; FU; GAO *et al.*, 2015; AHUJA; MARTIN; FEHLINGS, 2016; ANJUM, A.; YAZID, M. D.; FAUZI

DAUD, M.; IDRIS, J. *et al.*, 2020). A administração de células-tronco (CT) apresenta-se como uma opção promissora frente a essa realidade, uma vez que potencialmente, é capaz tanto de atuar na interrupção ou minimização da cascata de eventos fisiopatológicos, quanto proporcionar um ambiente favorável à regeneração tecidual especializada e funcional, com possível correlação clínica positiva (CARVALHO; CUNHA; VIALLE; OSIECKI *et al.*, 2008; KIM; HA; MOLON; KIM, 2013; FONSECA; SCHEFFER; GIRALDI-GUIMARÃES; COELHO *et al.*, 2017; LV; ZHANG; LI; GAO, 2020). As células-tronco adultas, como as células-tronco mesenquimais (CTM), são frequentemente utilizadas na pesquisa clínica por seu potencial imunomodulador e sua capacidade de dar origem a uma série de tipos celulares diferenciados (CAPLAN, 2009; CHEN; ZENG; FU; GAO *et al.*, 2015). As principais funções das CTM são a manutenção e renovação de tecidos mesenquimais adultos (CAPLAN, 2009; ALVITES; BRANQUINHO; SOUSA; LOPES *et al.*, 2022). Estas células liberam fatores bioativos que reparam o tecido danificado, assim como os efeitos anti-apoptóticos, inibidores da cicatriz e angiogênicos (CAPLAN, 2009). São células pouco imunogênicas permitindo com que não haja a necessidade da utilização de imunossupressores após um transplante alogênico ou xenotransplante (BYDLOWSKI; DEBES; MASELLI; JANZ, 2009).

As CTM têm papel imunomodulador sobre células do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo, tais como células dendríticas, células *natural killer*, neutrófilos, linfócitos T e B, e células T regulatórias. A imunossupressão mediada pelas CTM decorre do contato célula-célula (essencial para a sua função inibidora) e da liberação de fatores solúveis como fatores de crescimento celular, prostaglandinas, enzimas inibidoras da oxidação, entre outros (DI NICOLA; CARLO-STELLA; MAGNI; MILANESI *et al.*, 2002; MEISEL; ZIBERT; LARYEA; GÖBEL *et al.*, 2004; PITTENGER; MARTIN, 2004; AGGARWAL; PITTENGER, 2005; SATO; OZAKI; OH; MEGURO *et al.*, 2007; SELMANI; NAJI; ZIDI; FAVIER *et al.*, 2008; GHANNAM; BOUFFI; DJOUAD; JORGENSEN *et al.*, 2010). A supressão da proliferação de células do sistema imune leva uma alteração no perfil da resposta imune de pró-inflamatório para anti-inflamatório (NAUTA; WESTERHUIS; KRUISSELBRINK; LURVINK *et al.*, 2006; BULATI; MICELI; GALLO; AMICO *et al.*, 2020).

Uma das maiores fontes de CTM é o tecido adiposo, com cerca de 0,5% de células-tronco mesenquimais (ZUK; ZHU; ASHJIAN; DE UGARTE *et al.*, 2002; FRASER; WULUR; ALFONSO; HEDRICK, 2006; FANG; SONG; ZHAO; HAN *et al.*, 2007). As células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) são de fácil obtenção, por meio de lipoaspiração ou através de doadores submetidos a cirurgia plástica, fazendo com que esta fonte tenha um grande potencial para a terapia com células-tronco (FANG; SONG; ZHAO; HAN *et al.*, 2007; TRIVEDI; VANIKAR; THAKKER; FIROZE *et al.*, 2008; GARCIA-OLMO; HERREROS; PASCUAL; PASCUAL *et al.*, 2009; BAER; GEIGER, 2012).

Considerando a complexidade do TRM e os diferentes mecanismos de ação das CT, a utilização de modelo animal padronizado ganha força científica por permitir o controle de diversos aspectos envolvendo a lesão e subsequentes avaliações dos possíveis efeitos das CT administradas (VIALLE; VIALLE; RASERA; CECHINEL *et al.*, 2002).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A literatura sobre o uso de CT em portadores de TRM mostra uma ampla variação de protocolos de obtenção, preparo e aplicação o que limita a compreensão e tomada de decisão quanto à melhor escolha terapêutica. Outro fator limitante é a variação quanto ao momento da aplicação das CTM e do método de avaliação da eficácia terapêutica. Como parte desta tese, realizou-se uma revisão sistemática da literatura sobre o tema, resumida nas Tabelas 1 (estudos pré-clínicos) e 2 (estudos clínicos).

Tabela 1: Estudos pré-clínicos utilizando CTDA para tratamento do TRM

Referência (autores, ano)	Espécie	Lesão	Local da aplicação	Terapia associada	Resultado
(OH; HA; AN; KHAN <i>et al.</i>, 2010)	rato	clip	intralesional	pre tratamento com hipóxia	maior sobrevida do transplante
(OH; KIM; AN; PENNANT <i>et al.</i>, 2011)	rato	clip	intralesional	células mesenquimais	maior sobrevida do transplante
(PARK; LEE; LEE; LEE <i>et al.</i>, 2012)	cão	balão	carreador	matrigel	maior efeito anti-inflamatório
(RYU; KANG; PARK; KIM <i>et al.</i>, 2012)	cão	balão	carreador	matrigel	reduz a formação de cavidade na lesão
(ZHOU; CHEN; ZHANG; MIN <i>et al.</i>, 2013)	rato	compressão	intralesional		maior capacidade proliferativa
(CHUNG; FUJITA; KAWAHARA; YUI <i>et al.</i>, 2013)	cão	compressão	carreador	neuroesferas	maior expressão de fatores neurotróficos
(ZAMINY; SHOKRGOZAR; SADEGHI; NOROUZIAN <i>et al.</i>, 2013)	rato	hemi-seção	carreador	célula de Schwan	maior potencial de diferenciação
(ZHAO; JIANG; LIU; CHEN <i>et al.</i>, 2015)	camundongo	compressão	intralesional	neurogen	maior colonização celular
(MENEZES; NASCIMENTO; GONÇALVES; CRUZ <i>et al.</i>, 2014)	rato	balão	intralesional		proliferação vascular organizada
(TANG; LU; ZHU; QIAN <i>et al.</i>, 2016)	rato	compressão	intralesional	neurogenin2	melhor recuperação motora e celularidade

(KIM; JO; KIM; KWEON, 2015)	cão	balão	endovenoso	corticóide	melhor recuperação, mais complicações
(ARAS; SABANCI; KABATAS; DURUKSU <i>et al.</i> , 2016)	rato	clip	intralesional		melhores resultados no grupo subagudo
(KIM; LEE; KIM; KWEON, 2016)	cão	lesão crônica	intralesional		melhor recuperação funcional
(BLECKER; ELASHRY; HEIMANN; WENISCH <i>et al.</i> , 2017)	cão	balão	intralesional	diferenciação neuronal	maior diferenciação neuronal
(ESCALHÃO; RAMOS; HOCHMAN-MENDEZ; BRUNSWICK <i>et al.</i> , 2017)	cão	lesão crônica	intralesional		sem conclusão terapêutica, via de aplicação segura
(KHAN; YOON; KIM; JO <i>et al.</i> , 2018)	cão	balão	intralesional	Fator de crescimento derivado do cérebro	favorece neuroregeneração
(TAKAHASHI; NAKAJIMA; UCHIDA; TAKEURA <i>et al.</i> , 2018)	camundongo	compressão	intralesional		maior proliferação e sobrevida
(OHTA; TAKENAGA; HAMAGUCHI; OOTAKI <i>et al.</i> , 2018)	rato	compressão	endovenoso		viabilidade da criopreservação do tecido adiposo
(VILLANOVA <i>et al.</i> 2020)	rato	balão	epidural	metilpredisolona	melhora motora e urinária

A Tabela 1 apresenta estudos pré-clínicos que seguiram regras de produção de lesão e da avaliação de recuperação. Mesmo dentro de um grupo seletivo de estudos, fica evidente a variação na escolha do modelo animal, da localização do TRM, das características do tratamento e do método de avaliação. A diferença entre os métodos de produção de lesão impede que uma metaanálise adequada seja feita, reduzindo o valor dos estudos, que geralmente apresentam limitações quanto ao número de animais utilizados. Enquanto o método de compressão preserva o suprimento vascular e a integridade dural, métodos como clip de aneurisma e balão vascular produzem isquemia e necrose tecidual circunferencial, diferente do encontrado no trauma raquimedular. O método de hemissecção rompe a dura mater e gera esmagamento da medula (VIALLE, L. R. G.; FISCHER, S.; MARCON, J. C.; VIALLE, E. *et al.* 1999).

A principal limitação é a associação de terapias ao tratamento principal, fazendo com que apenas estudos do mesmo grupo de pesquisadores tenham características similares. Algumas tecnologias patenteadas, como o matrigel (arcabouço de laminina), neurogen e neurogenin2 (estimuladores da diferenciação neural) não tiveram seus resultados confirmados por outros autores, principalmente por limitações na descrição de metodologia.

Em relação aos ensaios clínicos 21 estudos utilizaram CT derivadas da medula óssea, cinco de cordão umbilical, dois de tecido adiposo, dois utilizaram células da mucosa olfatória e outros estudos utilizaram progenitores neurais e sangue periférico (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos clínicos com terapia celular para trauma raquimedular.

Referências (Autores, ano)	Célula	Local / terapia associada	Casos	Controle	Randomi- zado	Tempo	Local	Follow-up (meses)
(HUANG; CHEN; WANG; XIU <i>et al.</i> , 2003)	olfatória	intralesional	171	0	não	>6m	c,t,l	2
(SYKOVÁ; JENDELOVÁ; URDZÍKOVÁ; LESNÝ <i>et al.</i> , 2006)	medula óssea	endovenoso	20	0	não	<6m, >6m, >1	c,t,l	12
(CALLERA; DE MELO, 2007)	medula óssea	punção lombar	10	6	não	>1	c,t,l	24
(YOON; SHIM; PARK; CHUNG <i>et al.</i> , 2007)	medula óssea	intralesional/ fator de crescimento macrofágico	35	13	não	<6m	c,t	10
(CHERNYKH; STUPAK; MURADOV; SIZIKOV <i>et al.</i> , 2007)	medula óssea	intralesional e endovenoso	18	18	não	>1	c,t,l	9,4
(KUMAR; KUMAR; NARAYANAN; ARUL <i>et al.</i> , 2009)	medula óssea	lombar	297	0	não	>1	c,t,l	19
(CRISTANTE; BARROS-FILHO; TATSUI; MENDRONE <i>et al.</i> , 2009)	medula óssea	endovenoso/ fator de crescimento macrofágico	39	0	não	>1	c,t	30
(PAL; VENKATARAMANA; BANSAL; BALARAJU <i>et al.</i> , 2009)	medula óssea	lombar	20	10	não	<6m, >6m	c,t	12

(LIMA; ESCADA; PRATAS-VITAL; BRANCO <i>et al.</i>, 2010)	olfatória	intralesional	20	0	não	>1	c,t	27
(KISHK; GABR; HAMDY; AFIFI <i>et al.</i>, 2010)	medula óssea	lombar/ aplicações seriadas	44	20	não	>1	c,t	6
(BHANOT; RAO; GHOSH; BALARAJU <i>et al.</i>, 2011)	medula óssea	intralesional	13	0	não	<6m, >6m, >1	c,t	13
(HAMMADI; MARINO; FARHAN, 2012)	sangue periférico	lombar/ fator de crescimento macrofágico	277	0	não	>6m, >1	c,t,l	12
(PARK; JUNG; HAN, 2012)	medula óssea	intralesional	10	0	não	<6m, >6m, >1	c	36
(FROLOV; BRYUKHOVETSKIY, 2012)	medula óssea	intratecal/ fator de crescimento macrofágico	20	10	não	>1	c	48
(KARAMOUZIAN; NEMATOLLAHI- MAHANI; NAKHAEI; ESKANDARY, 2012)	medula óssea	intralesional e intratecal	20	11	não	<6m	c	33
(DAI; LIU; ZHANG; YANG <i>et al.</i>, 2013)	medula óssea	intralesional	20	20	sim	>1	c	6
(JIANG; XIONG; WANG; MA <i>et al.</i>, 2013)	medula óssea	intralesional	20	0	não	<6m, >6m, >1	c,t,l	1
(AMR; GOUDA; KOPTAN; GALAL <i>et al.</i>, 2014)	medula óssea	intralesional/ enxerto neural	12	0	não	<6m, >6m, >1	c,t	24

(LIU; HAN; WANG; XUE <i>et al.</i>, 2013)	cordão umbilical	intralesional	22	0	não	<6m, >6m, >1	c,t,l	12
(YAO; HE; ZHAO; WANG <i>et al.</i>, 2013)	cordão umbilical	intralesional e endovenoso	25	25	não	>1	c,t,l	12
(EL-KHEIR; GABR; AWAD; GHANNAM <i>et al.</i>, 2014)	medula óssea	intralesional e endovenoso	50	20	sim	>1	c,t	18
(CHENG; LIU; HUA; DAI <i>et al.</i>, 2014)	cordão umbilical	intralesional	10	24	sim	>1	c,t	6
(MENDONÇA; LAROCCA; DE FREITAS SOUZA; VILLARREAL <i>et al.</i>, 2014)	medula óssea	intralesional	14	0	não	>1	c,t	6
(AL-ZOUBI; JAFAR; JAMOUS; AL-TWAL <i>et al.</i>, 2014)	medula óssea	intralesional/ fator de crescimento macrofágico	19	0	não	>1	t	60
(OH; CHOI; YOO; KIM <i>et al.</i>, 2016)	medula óssea	intralesional	16	0	não	>1	c	6
(SHIN; KIM; YOO; KIM <i>et al.</i>, 2015)	precursor neural	intralesional	19	15	não	<6m, >6m, >1	c	12

(VAQUERO; ZURITA; RICO; BONILLA <i>et al.</i> , 2016)	medula óssea	intralesional e intratecal	12	0	não	>1	t	12
(HUR; CHO; PARK; LEE <i>et al.</i> , 2016)	tecido adiposo	intratecal	14	0	não	<6m, >6m, >1	c,t,l	8
(THAKKAR; VANIKAR; TRIVEDI; SHAH <i>et al.</i> , 2016)	tecido adiposo	intratecal/ medula óssea	10	0	não	>1	t,l	24
(ZHU; POON; LIU; LEUNG <i>et al.</i> , 2016)	cordão umbilical	intralesional/ metilprednisolona	28	0	não	>1	c,t	12
(VAQUERO; ZURITA; RICO; BONILLA <i>et al.</i> , 2017)	medula óssea	intratecal	10	0	não	>1	c,t	12

Legenda da Tabela 2: <6m= até seis meses da lesão; >6m= entre seis meses e um ano da lesão; >1= mais de um ano da lesão. Abreviaturas: c= cervical; t= torácica; l=lombar.

A via de aplicação das CT também variou significativamente, incluindo aplicação no local da lesão (19 estudos), aplicação intra-dural extralesional (10 estudos), e aplicação endovenosa (2 estudos). Ainda, quatro estudos utilizaram mais de uma via de aplicação, e dois estudos compararam vias de aplicação distintas.

Alguns estudos utilizaram terapias combinadas à aplicação das CT, gerando mais uma variável que limitou a comparação dos resultados. Cinco estudos utilizaram fatores neurotróficos, um utilizou corticoterapia em bolo, um estudo utilizou enxerto neural, um estudo combinou tipos celulares diferentes e um estudo realizou aplicações repetidas.

O tempo de seguimento variou de modo importante, não somente entre os estudos, mas dentro deles mesmo (de duas a 60 semanas). Levando-se em conta o tempo de seguimento médio, encontramos oito estudos com menos de seis meses, 12 entre seis e 12 meses e 12 com mais de um ano de seguimento.

Doze estudos apresentaram grupo controle, sendo que alguns eram grupos controle históricos. Apenas três estudos apresentaram randomização na seleção de candidatos, envolvendo pacientes com lesão crônica (mais de um ano) e com seguimento relativamente curto.

Em relação aos resultados, a maioria dos estudos não conseguiu demonstrar que a melhora neurológica, tanto clínica como neurofisiológica, foi superior à história natural de uma lesão medular incompleta.

A segurança destas terapias está comprovada, apesar de que nem todos os estudos documentam objetivamente as possíveis complicações da terapia celular (cinco estudos). Além de febre e reações temporárias decorrentes da administração das CT, principalmente por via endovenosa, três estudos relatam aumento de espasticidade e dor neuropática após aplicação por via intralesional. Não há relatos de formação de tumor ou casos de infecção, nem de piora neurológica na literatura avaliada. Coloca-se a existência de alguns estudos clínicos prospectivos em humanos a fim de avaliar a eficácia e o resultado da terapia celular em diferentes contextos (ARAÚJO; MACÊDO; DAMASCENO; DAS NEVES Í *et al.*, 2022), havendo registros de diferentes tipos celulares aplicados, com maior frequência para células mesenquimais e destaque à necessidade de publicação de mais estudos prospectivos randomizados robustos.

Esse trabalho propõe avaliar o efeito da administração das CTDA em animais com TRM contuso. Destaca-se o caráter inovador dessa metodologia, não havendo até o momento, publicações com o mesmo protocolo, considerando o tipo celular, marcação e rastreamento *in vivo*, via de transplante e os períodos após a lesão para injeção das CTDA.

3. JUSTIFICATIVA

Este estudo segue uma linha de pesquisa desta Instituição que se iniciou há 20 anos (VIALLE; FISCHER; MARCON; VIALLE *et al.*, 1999). Iniciou-se com a padronização da lesão medular em modelo pré-clínico, seguida de estudos de fisiopatologia da lesão medular e de pesquisas envolvendo não apenas o aparelho locomotor, mas aparelho digestivo, pele, sistema gênito-urinário e projetos de reabilitação motora, mostrando o potencial multidisciplinar, disseminador de conhecimentos e incentivador da pesquisa em diversos níveis de conhecimento.

Em uma segunda fase, estudou-se o efeito de medicamentos sobre a fase secundária do TRM, passando-se então a buscar terapias que pudessem auxiliar no processo de cicatrização, seja por modulação ou por regeneração tecidual. Estudos iniciais com células mononucleares obtidas da medula óssea demonstraram um efeito modulador sobre a expansão da lesão, além de auxiliar para a definição da aplicação das CT no TRM, como o melhor momento da infusão, o local, e o número de infusões.

O uso das CTDA humanas constituiu um avanço importante, pois são células provenientes de material biológico que seria descartado, facilmente expandidas em cultura, além da experiência institucional com este tipo de células.

O projeto atual segue esta linha evolutiva de raciocínio, modificando o local de aplicação para a cauda equina do animal, utilizando dois momentos de infusão celular, e ampliando a gama de informações histológicas sobre o efeito da administração das CTDA para tratamento do TRM experimental em ratos. A opção pela aplicação distal à lesão deu-se em virtude dos resultados negativos obtidos nos estudos prévios com aplicação intralesional. Nesta mesma linha de pesquisa, a opção por duas infusões de CT se mostrou promissora do ponto de vista de recuperação motora.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração das CTDA humanas na cauda equina de ratos submetidos a TRM experimental, por meio do estudo histológico da medula espinhal.

4.2 Objetivos específicos

Quantificar alterações de celularidade da medula espinhal por meio da análise imunohistoquímica e histomorfométrica.

Realizar a rastreabilidade celular *in vivo* e no tecido após eutanásia, 40 dias após a lesão.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Estudo experimental, longitudinal, prospectivo randomizado, controlado. Em todos os animais do estudo ($n = 45$, sendo que cinco foram excluídos por complicações do procedimento) foi induzido o trauma raquimedular (TRM). Os animais foram divididos em grupos experimentais, os quais receberam infusão de CTDA (GE, $n = 20$) e grupos controle, com infusão de meio de cultura (GC, $n = 20$).

O grupo experimental foi dividido de acordo com a quantidade de infusões realizadas: uma infusão, diretamente após o trauma raquimedular induzido (GE1, $n = 10$) ou duas infusões, sendo a segunda aplicação uma semana após o trauma (GE2, $n = 10$); cada GE teve seu correspondente GC, que recebeu infusões apenas com meio de cultura, sendo GC1 ($n = 10$) e GC2 ($n = 10$).

O seguimento dos animais foi de 40 dias após o último procedimento que foram submetidos, sendo eutanasiados para estudos complementares.

Após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), nº 769, bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos, CAAE 12723713.3.0000.0020, deu-se início ao estudo experimental. Para obtenção da CTDA, foram utilizadas três amostras biológicas de doadores de tecido adiposo provenientes de cirurgia bariátrica realizadas no Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná. Para o ensaio pré-clínico foram utilizados 45 ratos Wistar, *Rattus norvegicus*, adultos jovens, com média de 20 semanas de idade, com peso entre 300 e 350 gramas, do sexo feminino. Durante o período do estudo, todos os animais receberam água e ração *ad libitum*, e estiveram sob controle de luz (ciclos claro-escuro de 12 horas) e em temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Antes da randomização, cinco animais foram excluídos do estudo: quatro foram a óbito –três durante o período anestésico de indução e manutenção prolongada para realização da cirurgia e avaliação de rastreabilidade celular *in vivo*, provavelmente por reações idiossincrásicas; um durante o período de manutenção tardia, provavelmente relacionado a complicações decorrentes e inerentes à perda de controle e função neurológica vesical; um animal não apresentou lesão medular completa (Figura 1).

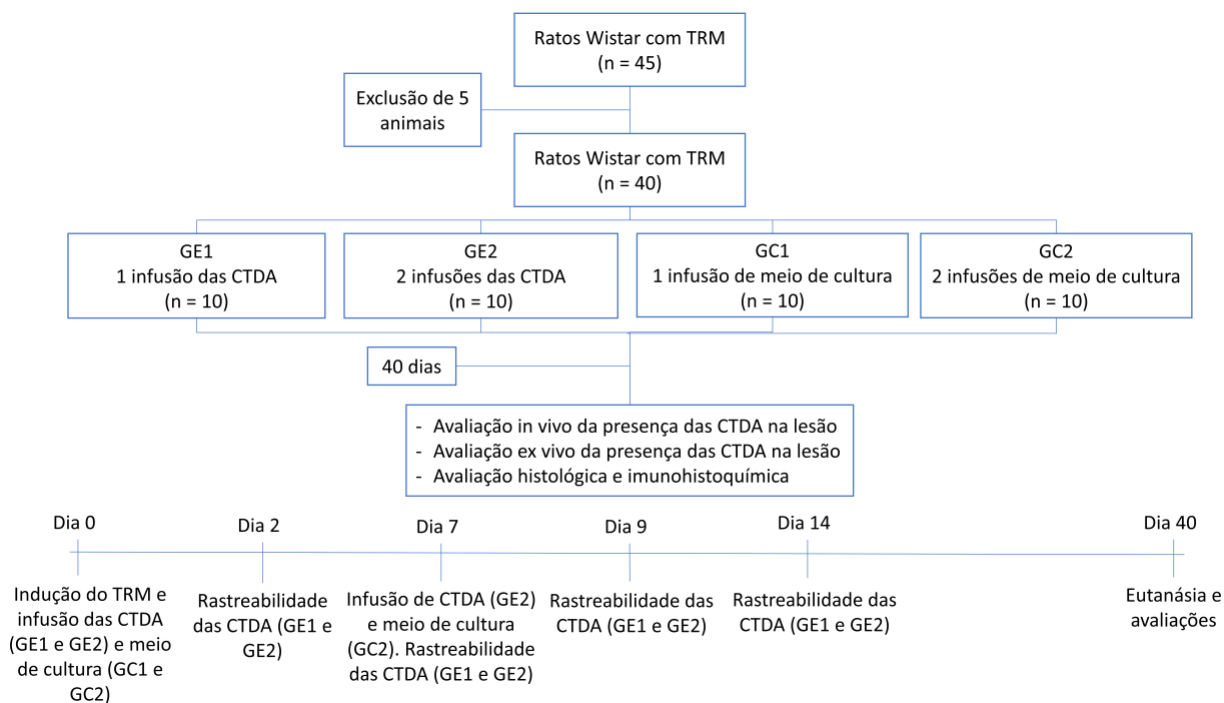


Figura 1. Desenho do estudo.

Fonte: o autor, 2022

5.2 Descrição cirúrgica

Para indução do trauma raquimedular (TRM), os animais foram anestesiados utilizando-se quetamina (Agener União, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (Agener União, São Paulo, Brasil) intraperitoneal, na dose de 90 mg/kg e 10 mg/kg peso, respectivamente, iniciando-se o procedimento após testes de verificação de plano anestésico profundo, ausência de reflexo corneano e não reatividade à compressão caudal. Primariamente ao acesso cirúrgico, administrou-se cefalotina 25 mg/kg (Virbac, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal como profilaxia pré-operatória.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral, sobre peça específica do aparelho “Impactor” (Rutgers University Impactor®), conforme método previamente validado de lesão medular completa por meio de contusão (VIALLE; FISCHER; MARCON; VIALLE *et al.*, 1999). Procedeu-se à tricotomia e, por palpação das costelas inferiores, realizou-se acesso na pele e dissecação profunda ao nível de T10, seguida de remoção dos elementos vertebrais posteriores (laminectomia), com exposição da medula espinhal. Sob ajustes controlados e previamente validados de altura e velocidade, uma haste pesando 5

gramas foi derrubada sobre o nível exposto, gerando lesão completa comprovada pelo *software* específico (MASCIS®, Rutgers, New Jersey, EUA) aplicado ao sistema para validação da lesão. Foram excluídos do estudo animais que não tiveram lesões medulares completas.

Após indução do TRM, realizou-se hemostasia e lavagem da ferida cirúrgica com solução fisiológica 0,9% e, em seguida, sutura da pele com fio mononylon 3.0 (Shalom, Goiânia, Brasil) (Figura 2). Todos os animais permaneceram em recuperação anestésica pelo período aproximado de duas horas em câmara com temperatura controlada a 30°C, e acondicionados em gaiolas individuais com água e alimento de fácil acesso (VIALLE; FISCHER; MARCON; VIALLE *et al.*, 1999).

Durante todo o período pós-operatório, a ferida cirúrgica foi inspecionada diariamente e realizou-se esvaziamento vesical pelo método de Credé, a cada 12 horas, em todos os animais (MEYER; VIALLE; VIALLE; BLEGGI-TORRES *et al.*, 2003; VIALLE; FISCHER; MARCON; VIALLE *et al.*, 1999).

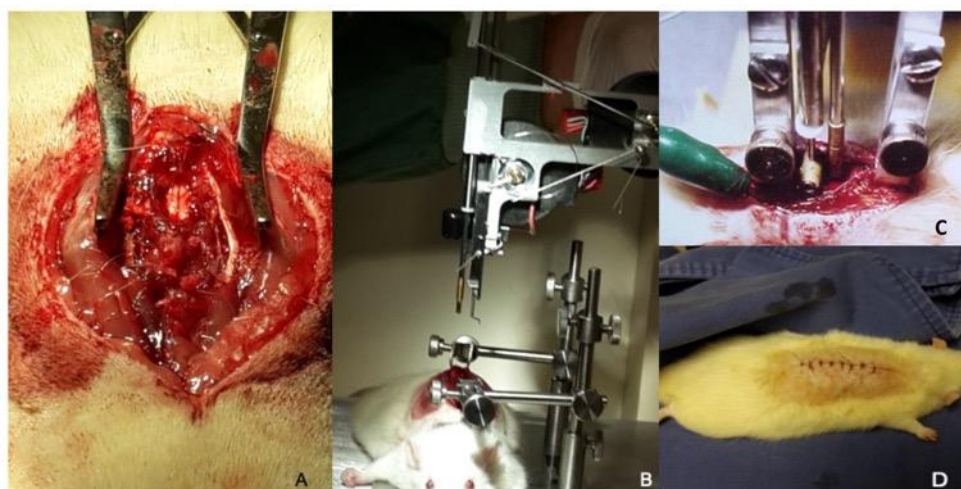


Figura 2. Indução do trauma raquimedular. A, exposição da medula espinhal entre T9-T10; B, animal preso pelos processos espinhosos torácicos ao aparelho Impactor; C, impacto na medula espinhal; D, animal após o término do procedimento.

Fonte: o autor, 2022

5.3 Isolamento e expansão das CTDA

O tecido adiposo humano, obtido em cirurgia bariátrica, foi acondicionado em frascos contendo uma solução de glicose a 2% e transportados até o Laboratório Experimental de Cultivo Celular para o processamento do material.

Cerca de 100 mL de tecido adiposo foi macerado e submetido à digestão enzimática com collagenase tipo I (1 mg/mL) (Gibco™, NY, EUA) durante 30 minutos, a 37°C, sob constante agitação, seguido por filtração (100 µm) e centrifugação, a 800 g, durante 10 min. Após a lise das hemácias e lavagem com solução tampão salina fosfatada (PBS) (Gibco™, NY, EUA), procedeu-se nova filtração (40 µm) (Gibco™, NY, EUA) e ressuspensão em meio de Eagle modificado por Dulbecco e F12 (DMEM-F12) (Gibco™, NY, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™, NY, EUA) e plaqueadas em frascos de 75 cm² (Eppendorf, São Paulo, Brasil), na densidade de 1x10⁵ células/cm². Procedeu-se à primeira troca do meio após 24 horas, para retirada das células não aderentes e as demais trocas foram realizadas duas vezes por semana. Após confluência de 80%, procedeu-se à dissociação celular com tripsina/EDTA (Gibco™, NY, EUA). O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS por duas vezes e em seguida adicionado tripsina às células e incubadas a 37° C, por 4 minutos. Na sequência, foi realizada a inativação da enzima com 1% de SFB e IMDM. A suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células foram contadas e plaqueadas novamente (primeira Passagem – P1), mantendo-se o processo sucessivamente, sendo que todos os experimentos foram realizados entre a terceira (P3) e quinta passagem (P5) das células.

5.4 Caracterização das CTDA

A caracterização das CTDA foi realizada pela avaliação dos marcadores de superfície celular por imunofenotipagem e pelo potencial de diferenciação celular.

A análise imunofenotípica seguiu os critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (DOMINICI; LE BLANC; MUELLER; SLAPER-CORTENBACH *et al.*, 2006).

Foram colocados em cada tubo 1×10^6 células, as células foram lavadas com PBS (Gibco™, NY, EUA). e em seguida centrifugadas por 5 minutos a 400 g. Após centrifugação foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: CD105, CD90, CD73, CD29, CD44, CD14, CD34, CD45, CD31 e CD19 (BD Pharmingen, San Diego, USA).

As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos, na ausência de luz. Em seguida foram lavadas com PBS e ressuspensas em PBS contendo 1% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Foram coletados aproximadamente 20.000 eventos de cada amostra, adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Biosciences) e analisadas por meio do *software* FlowJo versão 10.1 (Tree Star, Ashland, USA).

O potencial de diferenciação celular foi avaliado pela indução da diferenciação das CTDA em adipócitos, osteoblastos e condrócitos, utilizando meios comerciais.

Para as diferenciações adipogênica e osteogênica, 16.000 CTDA foram plaqueadas em duplicata sobre lamínulas de vidro (GlassTécnica, Curitiba, Brasil) em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Alemanha). As células foram incubadas em incubadora (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) a 37°C, com 5% de CO₂ até atingirem uma confluência de 80%. Foi adicionado 300 µL de meio de diferenciação (Lonza, Walkersville, MD, USA) e a troca do meio foi realizada três vezes por semana durante 21 dias. As células controles foram cultivadas pelo mesmo período, em meio de cultura sem os fatores de indução à diferenciação.

Para a diferenciação adipogênica as células foram fixadas com Bouin (Biotec, Pinhais, Brasil) durante 10 minutos, lavadas duas vezes com etanol (Merck, Damstadt, Alemanha) 70% e duas vezes com água MiliQ. Foi adicionado propilenoglicol (Biotec) por 2 minutos e em seguida as células foram coradas com uma solução de 0,5% de Oil Red O (Sigma-Aldrich) durante 1 hora, para visualizar a presença de vacúolos lipídicos. Após coloração, foi adicionado propilenoglicol (Biotec) por um minuto e as células foram lavadas duas vezes com água ultrapura MiliQ. Para a coloração do núcleo foi utilizado Hematoxilina-Eosina (HE) (Biotec) por 30 segundos e lavadas duas vezes com água ultrapura MiliQ. Foi realizada a montagem em lâmina com glicerol (Neon). A diferenciação celular foi avaliada utilizando microscópio óptico Eclipse E200 (Nikon, Tokyo, Japão).

Para a diferenciação osteogênica, após 21 dias de cultivo, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% (Sigma-Aldrich) por 20 minutos e lavadas com água ultrapura MiliQ. As

células foram coradas com Vermelho de Alizarina S (Fluka Chemie, Steinheim, Alemanha) por 5 minutos, para avaliar a presença dos cristais de cálcio. Após coloração, as células foram lavadas duas vezes com água ultrapura MiliQ. Para a fixação do material, a lamínula foi mergulhada em uma bateria de soluções de acetona e xilol (Biotec). Em seguida foi realizada a montagem em lâmina com resina adesiva Histolan (Biotec). A presença de cristais de cálcio foi avaliada por meio de microscópio óptico (Nikon).

Para a diferenciação condrogênica foi realizada a cultura em micromassa. Foram transferidas 1×10^6 células para um tubo cônico o qual foi centrifugado por 10 minutos a 400 g. Após centrifugação, foi adicionado 1 mL de meio de diferenciação (Lonza) e novamente o tubo foi centrifugado para formar o botão celular. A troca de meio foi realizada três vezes por semana durante 21 dias. As células controles foram cultivadas pelo mesmo período em meio de cultura sem os fatores de indução à diferenciação. Após este período, o agregado celular foi fixado com 10% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) durante 1 hora, desidratado com diluições seriadas de etanol (Merck) e colocado em bloco de parafina. Foram realizados cortes de 4 μm de espessura, corados com azul de toluidina (Sigma-Aldrich). A presença de proteoglicanas na matriz foi avaliada por microscópio óptico (Nikon).

5.5 Transdução das CTDA

Para o monitoramento *in vivo* das CTDA por bioluminescência, células da linhagem 293 foram transfectadas com os vetores pMD2.G, pCMV_dr8.91 e pMSCV_Luc2_T2A utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Waltham, EUA) e mantidas durante três dias em cultura. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado, filtrado com filtro de 0,22 μm , e ultracentrifugado por 28000 rpm por 1 hora e 30 minutos. Os botões de células foram ressuspensos em PBS/BSA 1% (Sigma-Aldrich), distribuído em alíquotas de 40 μL e estocado a -80°C . As CTDA foram transduzidas com o sobrenadante contendo as partículas virais e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Brometo de Hexadimetrina (Sigma-Aldrich). O meio utilizado para a transdução das células foi trocado a cada 24 horas durante três dias. Após este período, adicionou-se a puomicina (Sigma-Aldrich), para seleção das células, em uma concentração final de 10 mM. A expressão da luciferase foi observada utilizando o sistema de imagem IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).

5.6 Infusão das CTDA

Após procedimento cirúrgico inicialmente descrito para indução do TRM, sob anestesia, realizou-se nova incisão cirúrgica, aproximadamente 1,5 cm distal à primeira, com identificação dos níveis lombares e identificação do saco dural. Sob visualização direta, utilizando-se seringa de Hamilton, uma solução de 100 μ L de meio DMEM-F12 contendo 1×10^6 CTDA foi infundida no interior do saco dural dos animais dos grupos GE1 e GE2. O mesmo procedimento foi realizado com os animais dos grupos GC1 e GC2, injetando-se 100 μ L de meio de cultura. A incisão foi suturada com fio mononylon 3.0.

Após o período de uma semana da lesão e infusão de células, GE2 e GC2 foram submetidos a nova infusão de CTDA ou meio de cultura, sendo realizado acesso sobre a região lombar previamente exposta na primeira infusão.

5.7 Monitoramento *in vivo*

As CTDA transduzidas foram infundidas em três animais de cada grupo. A intensidade de luz foi detectada com o sistema de imagem *in vivo* (IVIS LUMINA II) que consiste em uma câmera escura onde o animal é posicionado e recebe oxigênio e anestésico inalatório. A imagem foi capturada por uma câmera de alta sensibilidade.

Foi aplicada nos animais injeção intraperitoneal de 150 mg/kg de D-luciferina (Perkin Elmer, Waltham, EUA), 5 minutos antes da aquisição da imagem e anestesia inalatória com isoflurano (Rhodia, Paulínia, Brasil) durante a aquisição desta. Os animais foram posicionados na câmera em decúbito dorsal e utilizou-se um campo de captura de 12,7 x 12,7 cm. Uma série de imagens foi adquirida, até a obtenção do pico máximo de sinal de bioluminescência (mensuração em contagem – “counts”). As imagens com o pico máximo de sinal de bioluminescência foram analisadas, e o sinal quantificado como fótons/segundo usando o *software* LIVINGIMAGE 3D (versão 2.50, Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). A intensidade do sinal das CTDA infundidas foi avaliada 48 horas e sete dias após o procedimento.

5.8 Eutanásia e coleta do tecido

Após 40 dias da indução do TRM, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de anestesia em altas doses, via intraperitoneal, com quetamina (240 mg/kg peso) (Agener União) e xilazina (30 mg/ kg peso) (Agener União), associadas a gás halotano em câmara anestésica (4-5%) para reduzir qualquer sofrimento, seguindo-se os protocolos de eutanásia para estudos experimentais.

Imediatamente após confirmação da eutanásia, uma toracotomia foi realizada para permitir perfusão intracardiaca com soro fisiológico 0,9% até completa exsanguinação. Por meio da mesma via, átrio direito, injetou-se solução de paraformaldeído 4% (volume total aproximado de 300 mL/animal) (Neon, Suzano, Brasil), permitindo a fixação imediata do tecido nervoso e possibilitando condições ideais para preparo e manipulação anatomopatológica.

5.9 Estudo anatomopatológico – Histologia, Imunohistoquímica, Hibridização *in situ* por fluorescência

Após o processo de eutanásia e coleta do material, todas as medulas foram identificadas e alocadas em solução tamponada de formol 10%. Após a fixação, foram realizados os cortes histológicos, com espessura de 5 μ m a partir da zona central de lesão, verificada macroscopicamente por meio de evidentes alterações morfológicas – coloração opaca e mais escura, afilamento local – em correspondência com o nível de TRM induzido experimentalmente. A Figura 3 ilustra a metodologia dos cortes histológicos.

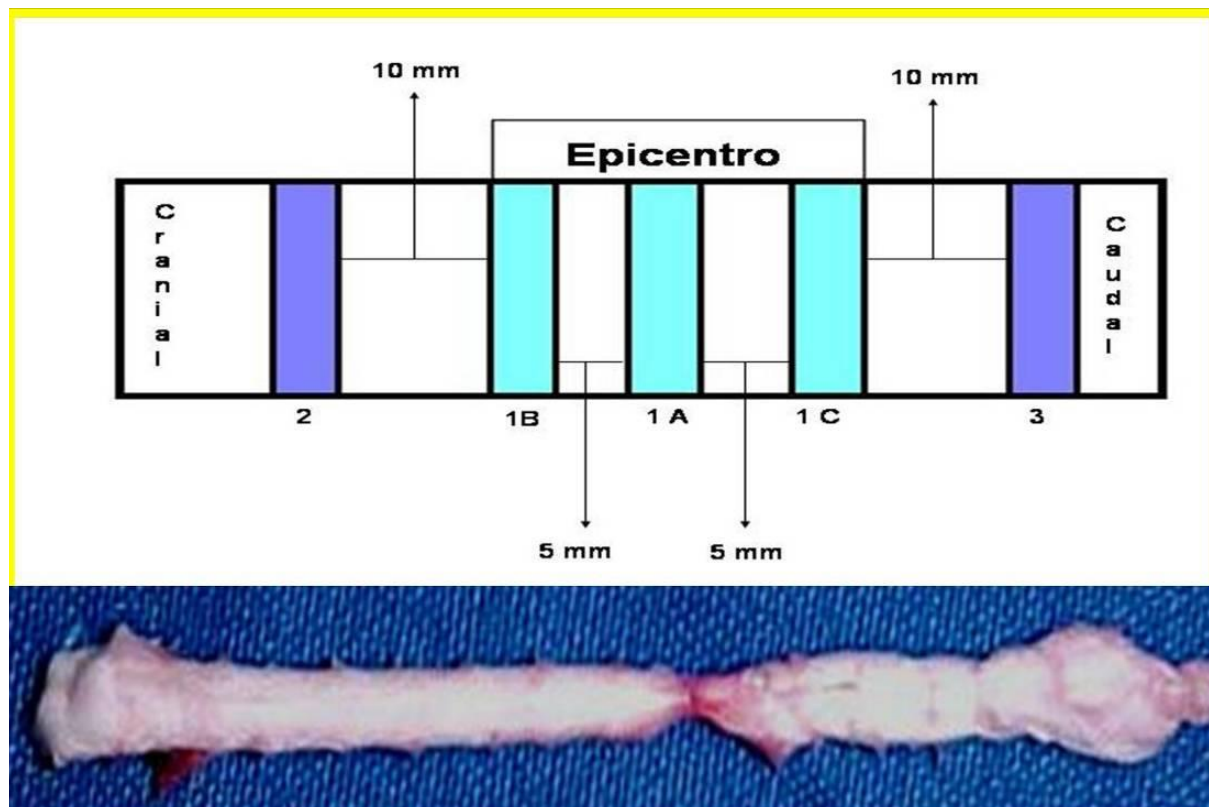


Figura 3: Imagem da medula espinhal removida, com esquematização da área submetida a análise histológica. Cortes centrais de 5 μ m, com intervalo de 5 mm a partir do centro, e 10 mm para áreas distais. As áreas demarcadas em azul foram submetidas a seis cortes, e as áreas em roxo a três cortes.

Fonte: o autor, 2022

Para análise histológica, as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), luxol fast blue (Sigma-Aldrich) e cresil violeta (Sigma-Aldrich). Por meio da coloração de HE (Biotec) foram verificadas alterações gerais nas condições das amostras, tais como degeneração das substâncias branca e cinzenta, presença de focos de hemorragia e eventuais áreas de perda neuronal. A partir da análise das lâminas coradas com luxol fast blue e com *software* – Image ProPlus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), baseando-se no método de morfometria de cores, estimou-se a quantidade de mielina presente no tecido. Através da coloração cresil violeta, dois examinadores independentes avaliaram a celularidade medular, com enfoque à presença neuronal, a partir da divisão do campo histológico em quadrantes iguais (anterior-posterior, direito-esquerdo e combinações),

utilizando microscópio óptico em aumento de 200X (Olympus, Tokyo, Japão). Eventuais neurônios presentes nos cortes medulares foram contados isoladamente. O *software* calculou a área marcada em unidades de micrômetros quadrados (μm^2). Alguns valores foram expressos no valor total de pontos identificados pelo programa, para melhor demonstrar as diferenças entre os grupos (VIALLE; VIALLE; ARRUDA, 2012).

A fim de refinar a análise da celularidade, associou-se a técnica de imunohistoquímica utilizando-se o marcador GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) para identificação dos astrócitos ativados.

Por meio da técnica da Hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*), avaliou-se a possível presença das CTDA no tecido nervoso medular dos animais, após 40 dias da lesão. Foram selecionados aleatoriamente um animal de cada grupo e a rastreabilidade celular *ex vivo* foi realizada na área de epicentro da lesão. Foi utilizada uma sonda pancentromérica para os cromossomos humanos, já que as células transplantadas eram de origem humana. O protocolo foi realizado segundo às recomendações do fabricante da sonda, com algumas adaptações. Brevemente, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 10-20 minutos, em solução 2x de SSC (*Saline-Sodium Citrate*) (Calbiochem: San Diego, EUA) por 20-30 minutos a 37°C e, em seguida, desidratadas por uma bateria com concentrações crescentes (70%, 85% e 100%) de etanol (MERCK) cada. A desnaturação da sonda foi feita em um bloco de aquecimento por 3 minutos a 80- 85°C e a codesnaturação, do DNA da amostra e da sonda, por 5 minutos a 75°C. Após esse tempo, as lâminas foram colocadas no hibridizador a 37°C por 24 horas. No dia seguinte, foram feitas as lavagens de estringência, em solução de 0,4xSSC com 0,3% de Igepal (Sigma-Aldrich) pH 7.4 a 73°C, por 2 minutos e 30 segundos e, depois, na solução 2xSSC com 0,1% de Igepal pH 7.0 em temperatura ambiente, por 1 minuto. Após as lavagens, as lâminas passaram novamente pela bateria de etanol e foram contra coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Abbott Molecular Inc., Illinois, EUA), possibilitando visualizar o núcleo, no microscópio de fluorescência (Leica, modelo DM4000B) acoplado a uma câmera digital (Leica, modelo DFC 345 FX). O sistema de imagem utilizado para análise da fluorescência foi o LAS AF versão 3.6 (Leica).

5.10 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada por meio do *software* SPSS Statistics (v.20.0). Nos casos de avaliações histológicas e imunohistoquímicas, foi feita a comparação entre as médias e aplicou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância corrigido por Bonferroni, além da análise da variância com um fator (ANOVA, $p=0,05$). Valores $p \leq 0,012$ foram considerados como significativos. O teste T de Student foi utilizado para comparação dentro dos grupos ($p < 0,05$). Os dados obtidos pelo rastreamento *in vivo* e *ex vivo* das células não foram submetidos a análise estatística, sendo apresentados de maneira descritiva.

6. RESULTADOS

Os resultados foram divididos na caracterização das CTDA, nas análises histológicas, onde foi realizada a quantificação da perda de mielina e a perda neuronal por meio da histomorfometria e imunohistoquímica. Na sequência, os resultados do rastreamento celular *in vivo* e *ex vivo*, realizados por bioluminescência e FISH, respectivamente, foram apresentados.

6.1 Caracterização das CTDA

O perfil de expressão das CTDA apresentou-se de acordo com os critérios definidos pela ISCT. Foram positivas para os marcadores CD105, CD90, CD73, CD29 e CD166 e negativas para os marcadores CD34, CD45, CD19, CD14 e HLA-DR (Figura 4)

A viabilidade celular antes da infusão foi em média de 98,2%.

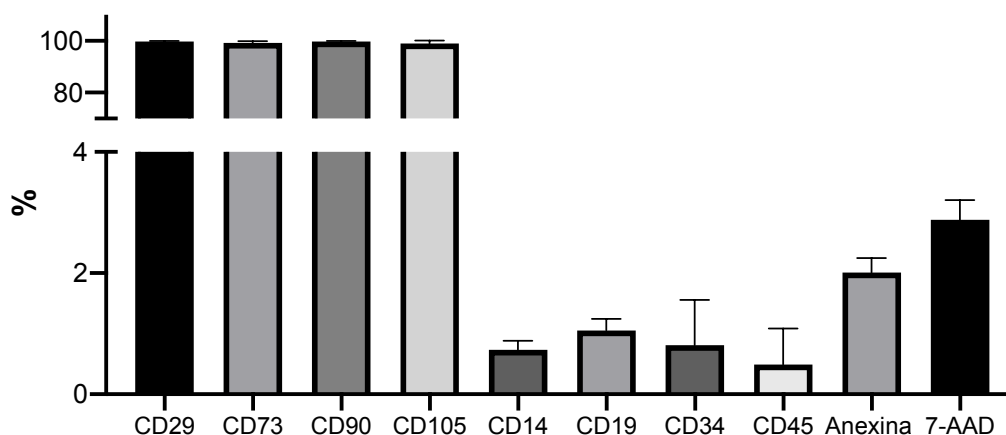


Figura 4. Caracterização imunofenotípica. Porcentagem de células positivas para cada marcador. As barras representam a porcentagem média de expressão para cada marcador testado.

As CTDA apresentaram potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos. Na diferenciação adipogênica foram visualizados vacúolos lipídicos no interior das células induzidas a diferenciação; nas células tratadas com meio de diferenciação osteogênica foi observada a presença de cristais de cálcio nas células e nos ensaios de diferenciação condrogênica, foi possível identificar a matriz extracelular rica em proteoglicanas e as lacunas ao redor dos

condrócitos jovens. As células controle, não apresentaram diferenciação após 21 dias de cultivo (Figura 5).

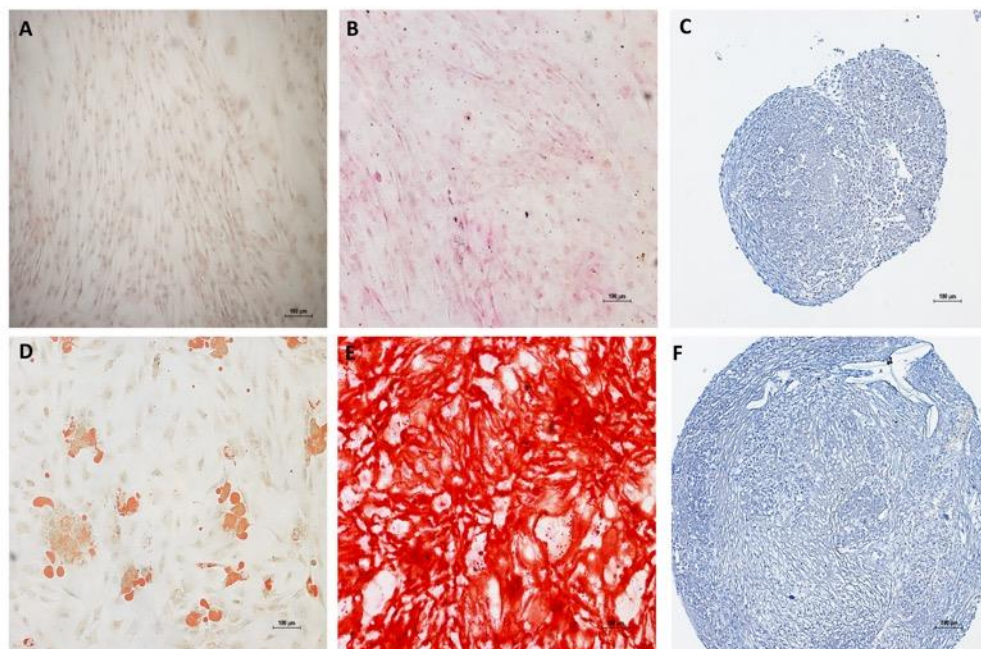


Figura 5. Diferenciação das CTDA. As células foram incubadas por 21 dias na presença de meios de diferenciação específicos para adipócitos, osteoblastos e condrócitos. A diferenciação na linhagem adipocítica foi demonstrada pela coloração com Oil Red O (D), a coloração com Alizarin Red S mostra mineralização da matriz extracelular na diferenciação osteogênica (E) e azul de toluidina mostra a deposição de proteoglicanos e lacunas ao redor dos condrócitos jovens na diferenciação condrogênica (F). Células controle não foram cultivadas sem meio de indução à diferenciação (A, B, C).

Fonte: o autor, 2022

6.1 Análise histomorfométrica da quantidade de mielina

As comparações foram efetuadas considerando-se os grupos experimental e controle. Na comparação da média entre os dois grupos, testou-se a hipótese nula de que a área de mielina é igual ambos, *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes. As Tabelas 3 e 4, assim como o Gráfico 1, apresentam os resultados absolutos e a comparação entre grupos por meio de estatística descritiva.

A infusão das CTDA não alterou de modo significativo a área de mielina na região submetida a lesão medular experimental comparativamente com a infusão de meio de

cultura. Em dois grupos (GE1 e GC1), a necrose central foi muito extensa impedindo avaliação histológica em três lâminas.

Foi observado uma grande variação na quantidade de mielina dentro dos grupos (Tabelas 3 e 4), e só foi possível expressar esta variação em um gráfico utilizando os valores de mediana ao invés dos valores da média.

Tabela 3: Avaliação histomorfométrica da área de mielina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Grupo	Mielina (μm^2)					
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
GE1	8	121296	9830	5706	877478	305736
GE2	10	415670	14611	3154	1268976	534847
GC1	9	323089	11178	2205	1113817	480434
GC2	10	737775	1022184	4796	1682594	653962

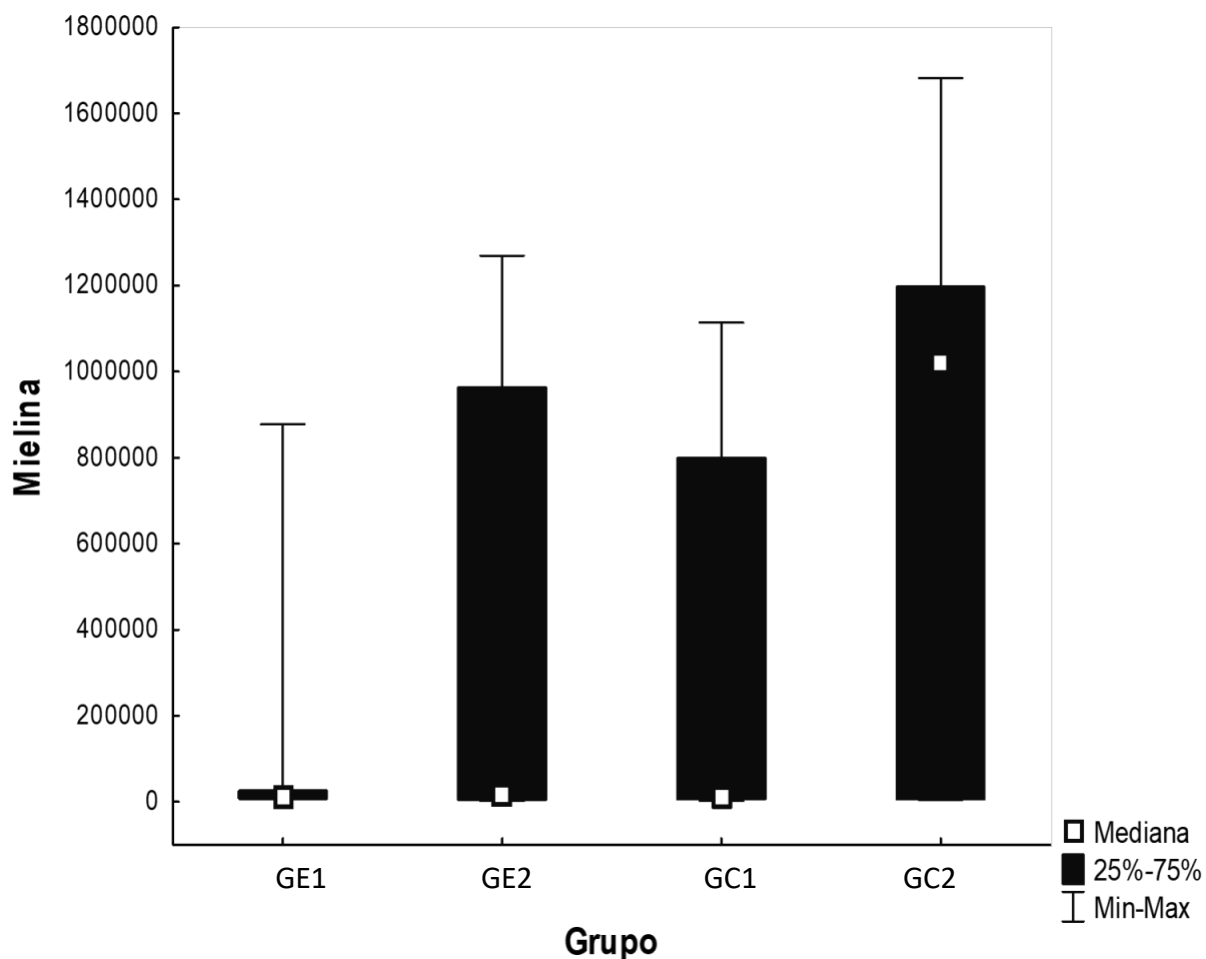
Legenda da Tabela 3: GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais.

Tabela 4: Comparação da área de mielina entre os grupos.

Grupos	Valor de p*
GE1 x GE2	0,633
GC1 x GC2	0,113
GE1 x GC1	0,963
GE2 xGC2	0,190

Legenda da Tabela 4: GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais. *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,012$ (correção de Bonferroni).

Gráfico 1: Histomorfometria. Comparação dos grupos em relação aos valores absolutos de mielina.



Legenda do Gráfico 1: GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura. Mielina mensurada em unidades de micrômetros quadrados.

Fonte: o autor, 2022

6.2 Análise histomorfométrica do número de neurônios

Para a comparação de dois grupos, testou-se a hipótese nula de que os números de neurônios são iguais ambos, *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes. Nas tabelas 5 e 6 são apresentadas estatísticas descritivas do número de neurônios de acordo com os grupos.

Houve diferença significativa nos grupos que receberam a infusão de CTDA quanto ao número de corpos neuronais na área lesada, em comparação aos grupos controle (Gráfico 2).

Tabela 5: Avaliação dos corpos neuronais entre os grupos experimentais e controle.

Grupo	Neurônios					
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
GC1	10	56,7	59,5	0	97	33,5
GC2	8	38	42	0	78	29,8
GE1	8	193,5	184,5	90,0	282	61,09
GE2	9	187,4	176	161	239	29,45

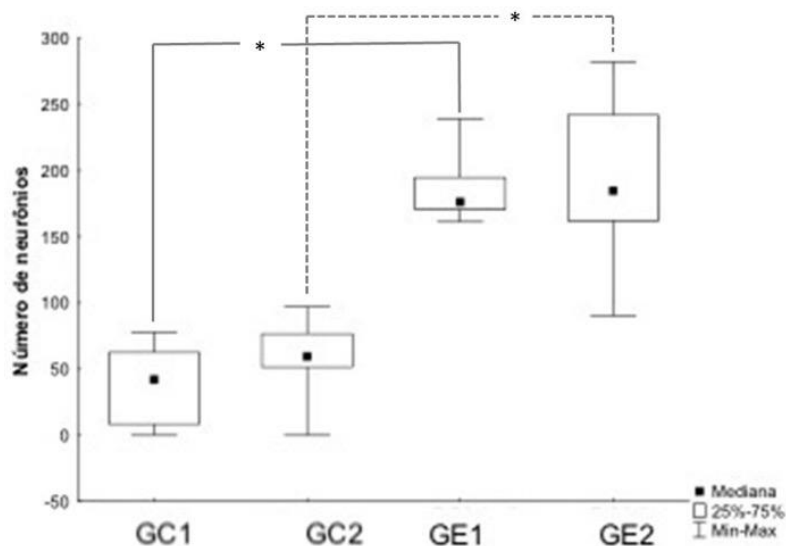
Legenda da Tabela 5: GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais. Neurônios representados pela contagem de corpos neuronais com núcleo.

Tabela 6: Comparação quanto à presença de neurônios entre os grupos.

Grupos	Valor de p*
GC1 x GC2	0,274
GE1 x GE2	0,815
GC1 x GE1	<0,001
GC2 x GE2	<0,001

Legenda da Tabela 6: GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais. *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,012$ (correção de Bonferroni).

Gráfico 2: Comparação dos grupos em relação à presença de neurônios identificados por meio da histomorfometria.



Legenda do Gráfico 2: GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; * = valor de p com significância estatística comparativa entre os respectivos grupos avaliados. Fonte: o autor, 2022

6.3 Avaliação astrocitária por meio da imunohistoquímica

Para avaliação tecidual por meio do estudo imunohistoquímico, os cortes teciduais da medula espinhal foram divididos em quatro áreas (anterior direita e esquerda, posterior direita e esquerda). Para a comparação dos dois grupos, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais em ambos, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. As tabelas 7 e 8 apresentam as estatísticas descritivas das variáveis de acordo com os grupos. O número de amostras variou em decorrência da grande desorganização tecidual que impediu avaliação adequada em algumas lâminas.

A análise imunohistoquímica não mostrou diferença na área ocupada pelos astrócitos entre os grupos controle e os grupos experimentais (Gráfico 3).

Tabela 7: Descrição da área astrocitária em quadrantes, comparando-se os grupos experimentais.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
AD	GC1	9	19738	18760	8690	28785	6500
	GC2	10	16778	15287	7870	36177	8326
	GE1	8	21547	21702	15805	26511	3597
	GE2	9	20042	17650	10312	34553	8369
AE	GC1	9	19882	21492	7922	27080	6766
	GC2	10	13586	12688	5525	25587	6325
	GE1	8	21256	20114	15863	29074	4339
	GE2	9	18629	18453	9779	37710	9531
PD	GC1	9	20139	20121	8302	30488	6559
	GC2	10	18034	16628	8737	32206	7045
	GE1	8	24795	24927	15770	29270	4107
	GE2	9	19064	21752	10207	31100	7589
PE	GC1	9	21411	21664	10541	29412	5929
	GC2	10	15765	16124	8161	22956	4404
	GE1	8	23672	23148	16040	31780	5776
	GE2	9	19058	13830	11131	38737	10120

Legenda da Tabela 7: AD= quadrante anterior direito da medula, AE= quadrante anterior esquerdo da medula; PD= quadrante posterior direito da medula; PE= quadrante posterior esquerdo da medula; GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais. Astrócitos representados em unidades de micrômetro.

*Análise da variância com um fator (ANOVA), $p < 0,05$.

Tabela 8: Área ocupada por astrócitos - comparação entre os grupos experimentais.

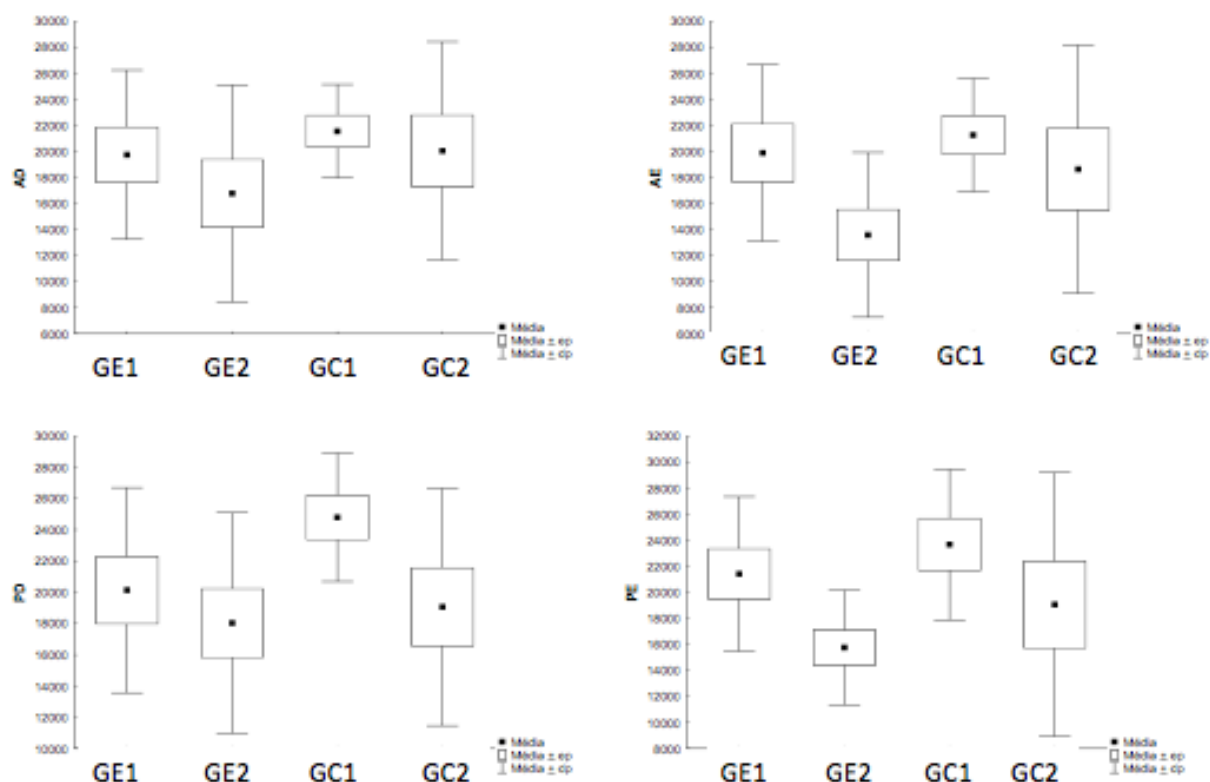
Grupos	Valor de p*			
	AD	AE	PD	PE
GE1 x GE2	0,633	0,486	0,077	0,275
GC1 x GC2	0,404	0,051	0,511	0,033
GE1 x GC1	0,497	0,631	0,105	0,439
GE2 x GC2	0,407	0,188	0,763	0,387

Legenda da Tabela 8: AD= quadrante anterior direito da medula, AE= quadrante anterior esquerdo da medula; PD= quadrante posterior direito da medula; PE= quadrante posterior esquerdo da medula; GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais. Astrócitos representados em unidades de micrômetro.

*Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,012$ (correção de Bonferroni);

*Análise da variância com um fator (ANOVA), $p < 0,05$.

Gráfico 3: Imunohistoquímica da área ocupada por astrócitos. Área dividida em quadrantes.



Legenda do Gráfico 3: AD= quadrante anterior direito da medula, AE= quadrante anterior esquerdo da medula; PD= quadrante posterior direito da medula; PE= quadrante posterior esquerdo da medula; GE1= grupo experimental que recebeu uma infusão de CTDA; GE2= grupo experimental que recebeu duas infusões de CTDA; GC1= grupo controle que recebeu uma infusão de meio de cultura; GC2= grupo controle que recebeu duas infusões de meio de cultura; n= número de animais. Astrócitos representados em unidades de micrômetro.

Fonte: o autor, 2022

6.4 Avaliação *in vivo* por bioluminescência das CTDA

O protocolo de transdução foi avaliado *in vitro* onde observou-se a presença das células transduzidas com o gene da luciferase. Após a adição do substrato D-luciferina ocorre a reação de degradação da luciferase, e emissão de um sinal luminoso captado pelo equipamento IVIS Lumina (Figura 6).

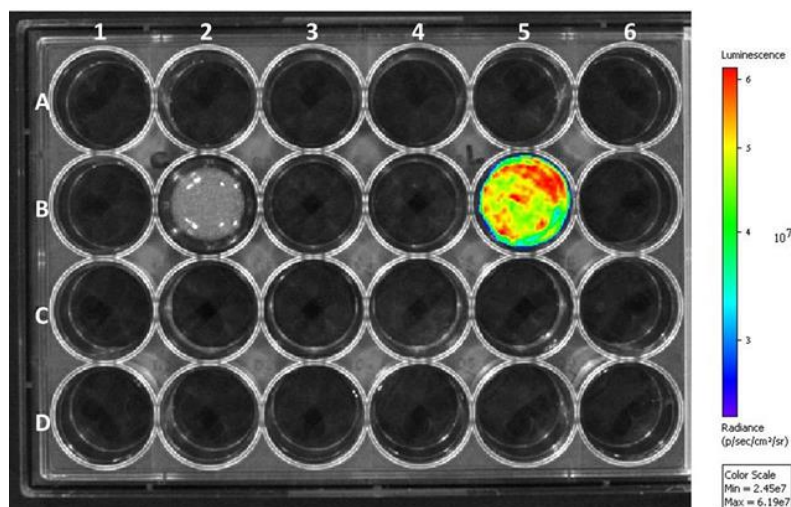


Figura 6. Avaliação *in vitro* da bioluminescência das CTDA. Células transduzidas na ausência da D-luciferina (poço B2); células transduzidas na presença da D-luciferina (poço B5). A escala indica a intensidade do sinal luminoso.

Fonte: o autor, 2022

A avaliação da bioluminescência foi realizada em três animais de cada grupo experimental, 48 horas e sete dias após a primeira infusão das CTDA (GE1, GE2). Na avaliação de 48 horas, foram observadas células no local da lesão e retida nos pulmões. Observou-se a redução da intensidade do sinal na segunda avaliação para os grupos GE1 (dia 7) e GE2 (dias 7 e 9) após a infusão. Nos animais dos grupos GE1 e GE2 não foram observadas células após sete dias de infusão das CTDA (Figura 7).

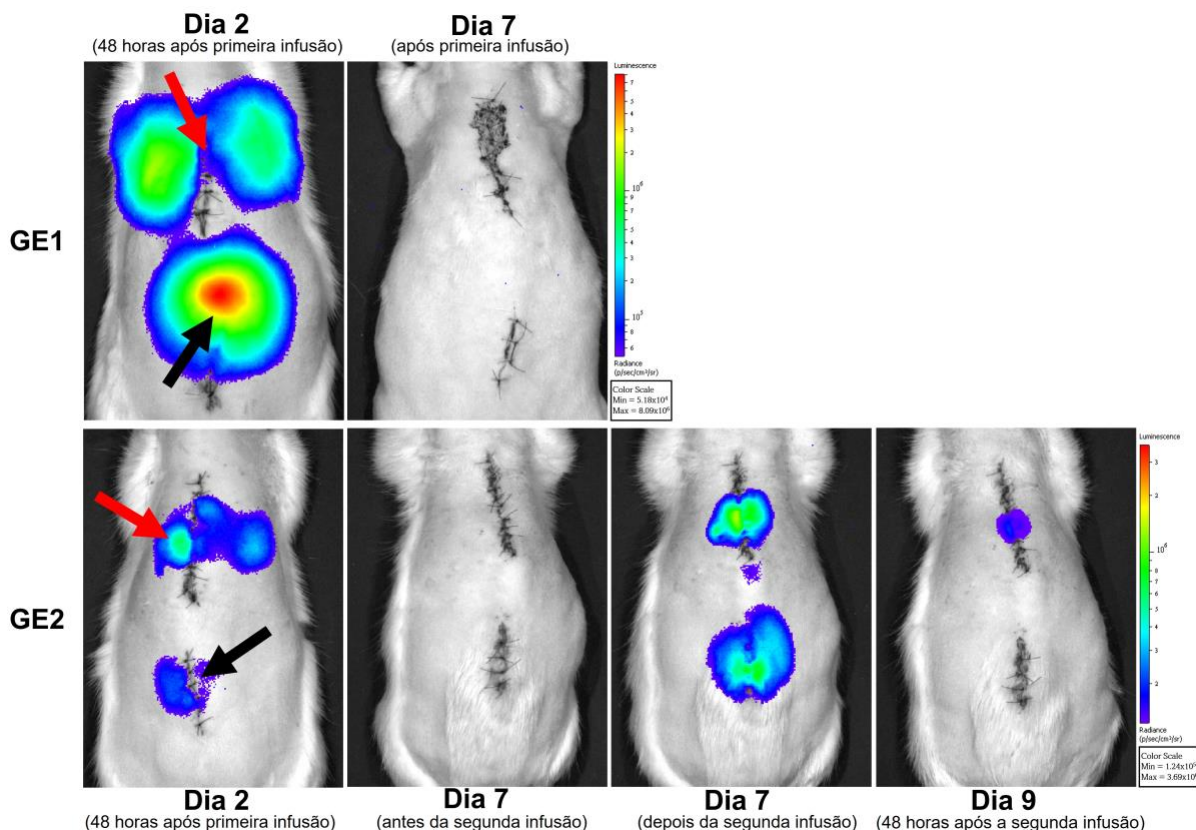


Figura 7. Rastreamento *in vivo* das CTDA. fotos representativas dos grupos experimentais (GE1 e GE2). As células foram observadas no local de infusão e nos pulmões. A seta vermelha indica o local da lesão e a seta preta indica o local de infusão das CTDA. As imagens representam o sinal bioluminescente emitido durante a degradação da D-luciferina pela enzima luciferase presente nas células. A escala de cores representa a intensidade do sinal de bioluminescência emitido pelas células em fótons/segundo/cm²/esterradiano (p/s/cm²/sr).

Fonte: o autor, 2022

6.5 Análise da presença das CTDA na lesão por *FISH*.

Nos tecidos de um animal do GE1 e um animal do GE2 que foram avaliados 40 dias após a infusão de CTDA, não foi possível identificar células na área central da medula espinhal por hibridização *in situ*.

7. DISCUSSÃO

A metodologia empregada neste estudo, que utiliza a lesão medular contusa padronizada, visa seguir a técnica empregada nas principais instituições de pesquisa sobre lesão medular. Os estudos levantados na revisão da literatura utilizaram compressão por clip de aneurisma ou por balão na maior parte das vezes. A lesão por contusão utilizando o aparelho *Impactor* é a que mais se assemelha à lesão traumática, porém necessita de maior dissecação cirúrgica e consequente experiência por parte da equipe de pesquisa. Ainda, por haver uma leitura informatizada da energia aplicada no trauma, cerca de 20% dos animais experimentais acabam sendo excluídos por variáveis do gráfico produzido após a lesão. Em outros métodos de indução de TRM menos controlados como secção, clip e balão, são utilizados maior número de animais além da variabilidade dos resultados, o que dificulta avaliar o benefício das terapias aplicadas (TALAC; FRIEDMAN; MOORE; LU *et al.*, 2004).

A escolha das CTDA, seguiu não apenas a linha de pesquisa desta instituição (VILLANOVA JUNIOR; FRACARO; REBELATTO; DA SILVA *et al.*, 2020), mas foi ao encontro aos benefícios apresentados por pesquisas semelhantes: maior resistência a condições de hipóxia, liberação de fatores neurotróficos e pouca imunogenicidade (PINHO; CIBRÃO; LIMA; GOMES *et al.*, 2022). Possivelmente, a combinação de técnicas de condicionamento com hipóxia e exposição a fatores neurotróficos, associadas a administração concomitante com outros tipos celulares, pode permitir com que o potencial regenerativo destas células aumente de modo significativo. Os estudos de Oh *et al.* (2011) mostram a maior sobrevivência das CTDA condicionadas em ambiente hipóxico antes da administração, em comparação com CTDA não tratadas e CTM provenientes da medula óssea (OH; HA; AN; KHAN *et al.*, 2010; OH; KIM; AN; PENNANT *et al.*, 2011). Outro fator que deve ser considerado é a fonte de células mesenquimais utilizada na terapia celular, pois há variações na qualidade das células obtidas de diferentes origens (EL-SAYED; EL-FEKY; EL-AMIR; HASAN *et al.*, 2019). Neste estudo foi demonstrado que após o cultivo das CTDA, estas células apresentaram as características de células mesenquimais, como a expressão de marcadores e o potencial de diferenciação celular.

. Também foi mostrado, conforme literatura disponível por análise de revisão sistemática, que existe um bom potencial de melhora motora a partir da injeção de CTDA em modelos animais de TRM. Embora haja grande heterogeneidade quanto às variáveis avaliadas e metodologia aplicada (RAFIEI ALAVI; MADANI NEISHABOORI; HOSSEIN; SARVEAZAD *et al.*, 2021), sem nível de evidência suficiente para determinar, até o presente momento, as melhores variáveis operacionais diretamente benéficas ao melhor desfecho esperado.

A via de administração das CTDA foi a principal modificação nesta linha de pesquisa, e o fator diferencial em relação a outros projetos em andamento na instituição. A motivação para esta modificação veio da observação em outros estudos, que a aplicação intralésional das CT levavam a uma deterioração neurológica nos dias que se seguiam à aplicação. Os estudos de Carvalho *et al.* (2008), que avaliaram a recuperação motora em diversos períodos após a aplicação de células na área de lesão, mostram uma perda da função motora após a injeção em relação ao controle, com recuperação gradual da pontuação ao fim do estudo. Outros autores estudaram a migração celular por diversas vias de administração, e mostraram que a concentração celular ocorre na área da lesão de modo similar à injeção intralésional, porém com melhores resultados histológicos nos grupos que receberam as CTDA no sistema nervoso, seja por via direta ou por punção lombar (DAVE; PATEL; VANIKAR; TRIVEDI, 2018; KHAN; YOON; KIM; JO *et al.*, 2018; KIM; JO; KIM; KWEON, 2015; KIM; LEE; KIM; KWEON, 2016).

Na fase aguda, o processo inflamatório extenso dificultava a identificação das células administradas, em meio as células cicatriciais do animal; enquanto, na fase crônica, a fibrose local demandava uma aplicação sob pressão, com extravasamento evidente do veículo administrado pelo local de punção (ANJUM; YAZID; FAUZI DAUD; IDRIS *et al.*, 2020). A punção lombar, tal como realizada neste estudo, é o método mais acessível para administração em humanos, e a compreensão do comportamento das CTDA administradas desta maneira é fundamental para a evolução dos protocolos terapêuticos em humanos. Outras vias de administração, como carreadores celulares (*tissue scaffolds*) são opções promissoras, mas atualmente sua aplicação requer remoção de um segmento da medula nos modelos experimentais, e, portanto, sua aplicabilidade em humanos ainda não é viável (ZHANG; O'CARROLL; WU; NICHOLSON *et al.*, 2010).

O rastreamento *in vivo* das células transplantadas, permitiu observar a capacidade migratória das CTDA em direção à lesão, porém houve a necessidade de submeter os animais a anestésias repetidas, num período de recuperação de lesão neurológica, o que gerou mortalidade elevada dos animais (superior a 30%). A realização de procedimentos anestésicos seriados também pode ser um fator negativo na avaliação de um processo de modulação e sobrevivência tecidual, apesar de não haver diferença significativa nos achados histológicos e imunohistoquímicos entre os animais que realizaram o rastreamento *in vivo* e os que não realizaram. De maneira análoga, Callera *et al.* (CALLERA; DE MELO, 2007) conseguiram rastrear as CT marcadas por meio de ressonância magnética, demonstrando a migração das CT administradas por punção lombar para a área da lesão medular na coluna torácica.

A bainha de mielina, produzida por oligodendrócitos no sistema nervoso central, fornece estrutura à medula e possui várias funções regulatórias, dentre elas a limitação do crescimento neuronal através de moléculas conhecidas como NOGO (*neurite outgrowth inhibitor*), secretadas pelos oligodendrócitos lesionados ou disfuncionais. Diversas tentativas de bloquear estas moléculas para estimular o crescimento axonal foram malsucedidas, deixando uma lacuna no conhecimento que limita de modo importante a progressão de terapias regenerativas (GEOFFROY; ZHENG, 2014; LEE; GEOFFROY; CHAN; TOLENTINO *et al.*, 2010). Uma terapia eficaz, deveria estimular oligodendrócitos a produzir mielina e remielinizar axônios residuais ou regenerados.

Os resultados da análise histológica foram semelhantes aos observados em outros estudos na literatura, em que a administração de CTDA não levou a uma alteração estrutural caracterizada pela perda de mielina, modulou a perda celular neuronal, e não foi capaz de ativar os astrócitos de modo significativo (SHANG; WANG; LI; CHEN *et al.*, 2022). Os melhores resultados foram obtidos quando as CTDA foram diferenciadas previamente em células neurais, como no estudo de Zaminy *et al.* (2013) onde os fatores de crescimento e a matriz extracelular secretada por estas células foi capaz de mudar o ambiente desfavorável à regeneração na área da lesão medular.

A maior quantidade de corpos neuronais encontrados não pode, numa fase precoce, ser atribuída a diferenciação das CTDA, uma vez que células marcadas não estavam presentes ao fim do estudo. Isto possivelmente demonstra que os fatores imunomoduladores

liberados pelas CT no sistema nervoso modularam de alguma forma a lesão neuronal secundária, seja por diminuição da inflamação, inibição da apoptose ou citoproteção. O fato de não terem sido identificadas células infundidas pelo método FISH ao fim do estudo, mostra que provavelmente a sobrevida destas células é curta (ZHANG; WANG; WEN; XIANG *et al.*, 2017).

Outro fator importante na intenção de reparar o tecido medular é o controle do processo cicatricial. Ao não reduzir o número de astrócitos na área de lesão, a terapia celular se mostrou insuficiente para impedir a formação de uma barreira intrínseca ao crescimento axonal e à reconexão neuronal, como também sinalizado de modo semelhante na literatura (FAULKNER; HERRMANN; WOO; TANSEY *et al.*, 2004).

A viabilidade da via de infusão proposta neste estudo, mostrou-se segura, sem intercorrências e possibilita a padronização para estudos futuros. Por fim, a análise histológica e imunohistoquímica realizada neste estudo demonstra a complexidade do processo reparador da medula espinhal. A administração de CTDA permitiu um avanço na compreensão dos mecanismos regulatórios intrínsecos do sistema nervoso central. Estratégias combinadas para cada um destes mecanismos permitirão melhores resultados e uma proposta terapêutica eficaz que possa ser aplicada em humanos.

Considerando o estudo experimental, coloca-se como principal limitação a racionalização do uso de animais. Considerando o processo de dupla abordagem, coloca-se a limitação de labilidade dos animais ao processo anestésico duplicado, bem como o período prolongado de seguimento, com dificuldades inerentes à avaliação motora por eventuais complicações sistêmicas. Considerando as análises realizadas, uma limitação seria na rastreabilidade das células no tecido, pois o tempo de avaliação possivelmente foi muito prolongado. Análises em períodos de tempo menores, após a infusão, poderiam possibilitar a visualização destas células no local da lesão

8. CONCLUSÃO

1. Os grupos que receberam CTDA apresentaram maior número de neurônios em comparação ao controle.
2. Os grupos que receberam CTDA apresentaram valores similares para área de mielina em comparação ao controle.
3. Os grupos que receberam CTDA apresentaram valores similares para concentração de astrócitos em comparação ao controle.
4. A análise por bioluminescência comprovou que as células injetadas na cauda equina migram para a área de lesão.
5. A avaliação pelo método *FISH* não identificou as CTDA implantadas ao final do experimento.
6. Não houve diferença estatística, em relação aos critérios avaliados, entre os grupos que receberam uma ou duas injeções de CTDA.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou a efetividade das CTDA humanas, aplicadas à distância sobre área de lesão medular contusa completa e padronizada em animais. Foi observada a redução significativa da perda neuronal, embora não houve diferenças em relação a perda da mielina ou a área ocupada pelos astrócitos comparativamente ao grupo controle. Os resultados são semelhantes independentemente do número de infusões de CTDA. O rastreamento *in vivo* comprova a capacidade de migração celular após a aplicação na cauda equina, com consequente preservação do tecido medular perilesional.

Os resultados positivos observados nos grupos experimentais comparativamente aos controles, indicam a possibilidade de continuação dessa linha de pesquisa Institucional, podendo combinar a técnica descrita nesse estudo a outras estratégias de abordagem, com objetivo final de translação e aplicação de protocolos de ensaios clínicos, com a segurança e efetividade.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, 105, n. 4, p. 1815-1822, Feb 15 2005.

AHUJA, C. S.; MARTIN, A. R.; FEHLINGS, M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. **F1000Res**, 5, 2016.

AL-ZOUBI, A.; JAFAR, E.; JAMOUS, M.; AL-TWAL, F. *et al.* Transplantation of purified autologous leukapheresis-derived CD34+ and CD133+ stem cells for patients with chronic spinal cord injuries: long-term evaluation of safety and efficacy. **Cell Transplant**, 23 Suppl 1, p. S25-34, 2014.

ALVITES, R.; BRANQUINHO, M.; SOUSA, A. C.; LOPES, B. *et al.* Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity-Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential. **Pharmaceutics**, 14, n. 2, Feb 9 2022.

AMR, S. M.; GOUDA, A.; KOPTAN, W. T.; GALAL, A. A. *et al.* Bridging defects in chronic spinal cord injury using peripheral nerve grafts combined with a chitosan-laminin scaffold and enhancing regeneration through them by co-transplantation with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: case series of 14 patients. **J Spinal Cord Med**, 37, n. 1, p. 54-71, Jan 2014.

ANJUM, A.; YAZID, M. D.; FAUZI DAUD, M.; IDRIS, J. *et al.* Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. **Int J Mol Sci**, 21, n. 20, Oct 13 2020.

ARAS, Y.; SABANCI, P. A.; KABATAS, S.; DURUKSU, G. *et al.* The Effects of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation During the Acute and Subacute Phases Following Spinal Cord Injury. **Turk Neurosurg**, 26, n. 1, p. 127-139, 2016.

BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem Cells Int**, 2012, p. 812693, 2012.

BHANOT, Y.; RAO, S.; GHOSH, D.; BALARAJU, S. *et al.* Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury. **Br J Neurosurg**, 25, n. 4, p. 516-522, Aug 2011.

BLECKER, D.; ELASHRY, M. I.; HEIMANN, M.; WENISCH, S. *et al.* New Insights into the Neural Differentiation Potential of Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Anat Histol Embryol**, 46, n. 3, p. 304-315, Jun 2017.

BULATI, M.; MICELI, V.; GALLO, A.; AMICO, G. *et al.* The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. **Front Immunol**, 11, p. 54, 2020.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 31, p. 25-35, 2009.

CALLERA, F.; DE MELO, C. M. Magnetic resonance tracking of magnetically labeled autologous bone marrow CD34+ cells transplanted into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with chronic spinal cord injury: CD34+ cells' migration into the injured site. **Stem Cells Dev**, 16, n. 3, p. 461-466, Jun 2007.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J Pathol**, 217, n. 2, p. 318-324, Jan 2009.

CARVALHO, K. A.; CUNHA, R. C.; VIALLE, E. N.; OSIECKI, R. *et al.* Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45+)/CD34(-) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats. **Transplant Proc**, 40, n. 3, p. 847-849, Apr 2008.

CHEN, D.; ZENG, W.; FU, Y.; GAO, M. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells combined with minocycline improve spinal cord injury in a rat model. **Int J Clin Exp Pathol**, 8, n. 10, p. 11957-11969, 2015.

CHEN, Y.; HE, Y.; DEVIVO, M. J. Changing Demographics and Injury Profile of New Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States, 1972-2014. **Arch Phys Med Rehabil**, 97, n. 10, p. 1610-1619, Oct 2016.

CHENG, H.; LIU, X.; HUA, R.; DAI, G. *et al.* Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury. **J Transl Med**, 12, p. 253, Sep 12 2014.

CHERNYKH, E. R.; STUPAK, V. V.; MURADOV, G. M.; SIZIKOV, M. Y. *et al.* Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. **Bull Exp Biol Med**, 143, n. 4, p. 543-547, Apr 2007.

CHOO, A. M.; LIU, J.; LAM, C. K.; DVORAK, M. *et al.* Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. **J Neurosurg Spine**, 6, n. 3, p. 255-266, Mar 2007.

CHUNG, C. S.; FUJITA, N.; KAWAHARA, N.; YUI, S. *et al.* A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. **J Vet Med Sci**, 75, n. 7, p. 879-886, Jul 31 2013.

CRIPPS, R. A.; LEE, B. B.; WING, P.; WEERTS, E. *et al.* A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. **Spinal Cord**, 49, n. 4, p. 493-501, Apr 2011.

CRISTANTE, A. F.; BARROS-FILHO, T. E.; TATSUI, N.; MENDRONE, A. *et al.* Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. **Spinal Cord**, 47, n. 10, p. 733-738, Oct 2009.

DAI, G.; LIU, X.; ZHANG, Z.; WANG, X. *et al.* Comparative analysis of curative effect of CT-guided stem cell transplantation and open surgical transplantation for sequelae of spinal cord injury. **J Transl Med**, 11, p. 315, Dec 20 2013.

DAI, G.; LIU, X.; ZHANG, Z.; YANG, Z. *et al.* Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. **Brain Res**, 1533, p. 73-79, Oct 2 2013.

DAVE, S. D.; PATEL, C. N.; VANIKAR, A. V.; TRIVEDI, H. L. In vitro differentiation of neural cells from human adipose tissue derived stromal cells. **Neurol India**, 66, n. 3, p. 716-721, May-Jun 2018.

DE ARAÚJO, L. T.; MACÊDO, C. T.; DAMASCENO, P. K. F.; DAS NEVES Í, G. C. *et al.* Clinical Trials Using Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Challenges in Generating Evidence. **Cells**, 11, n. 6, Mar 17 2022.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, 99, n. 10, p. 3838-3843, May 15 2002.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EL-KHEIR, W. A.; GABR, H.; AWAD, M. R.; GHANNAM, O. *et al.* Autologous bone marrow-derived cell therapy combined with physical therapy induces functional improvement in chronic spinal cord injury patients. **Cell Transplant**, 23, n. 6, p. 729-745, Apr 2014.

EL-SAYED, M.; EL-FEKY, M. A.; EL-AMIR, M. I.; HASAN, A. S. *et al.* Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells: Cell origin and cell quality variations. **Mol Biol Rep**, 46, n. 1, p. 1157-1165, Feb 2019.

ESCALHÃO, C. C. M.; RAMOS, I. P.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; BRUNSWICK, T. H. K. *et al.* Safety of Allogeneic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. **Stem Cells Int**, 2017, p. 3053759, 2017.

FANG, B.; SONG, Y.; ZHAO, R. C.; HAN, Q. *et al.* Treatment of resistant pure red cell aplasia after major ABO-incompatible bone marrow transplantation with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Am J Hematol**, 82, n. 8, p. 772-773, Aug 2007.

FAULKNER, J. R.; HERRMANN, J. E.; WOO, M. J.; TANSEY, K. E. *et al.* Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, 24, n. 9, p. 2143-2155, Mar 3 2004.

FEHLINGS, M. G.; PERRIN, R. G. The role and timing of early decompression for cervical spinal cord injury: update with a review of recent clinical evidence. **Injury**, 36 Suppl 2, p. B13-26, Jul 2005.

FONSECA, A. F. B.; SCHEFFER, J. P.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; COELHO, B. P. *et al.* Comparison among bone marrow mesenchymal stem and mononuclear cells to promote functional recovery after spinal cord injury in rabbits. **Acta Cir Bras**, 32, n. 12, p. 1026-1035, Dec 2017.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnol**, 24, n. 4, p. 150-154, Apr 2006.

FROLOV, A. A.; BRYUKHOVETSKIY, A. S. Effects of hematopoietic autologous stem cell transplantation to the chronically injured human spinal cord evaluated by motor and somatosensory evoked potentials methods. **Cell Transplant**, 21 Suppl 1, p. S49-55, 2012.

GARCIA-OLMO, D.; HERREROS, D.; PASCUAL, I.; PASCUAL, J. A. *et al.* Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. **Dis Colon Rectum**, 52, n. 1, p. 79-86, Jan 2009.

GEOFFROY, C. G.; ZHENG, B. Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury. **Curr Opin Neurobiol**, 27, p. 31-38, Aug 2014.

GHANNAM, S.; BOUFFI, C.; DJOUAD, F.; JORGENSEN, C. *et al.* Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. **Stem Cell Res Ther**, 1, n. 1, p. 2, Mar 15 2010.

HAMMADI, A. A.; MARINO, A.; FARHAN, S. Clinical response of 277 patients with spinal cord injury to stem cell therapy in Iraq. **Int J Stem Cells**, 5, n. 1, p. 76-78, May 2012.

HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, 41, n. 7, p. 369-378, Jul 2003.

HUANG, H.; CHEN, L.; WANG, H.; XIU, B. *et al.* Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury. **Chin Med J (Engl)**, 116, n. 10, p. 1488-1491, Oct 2003.

HUR, J. W.; CHO, T. H.; PARK, D. H.; LEE, J. B. *et al.* Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. **J Spinal Cord Med**, 39, n. 6, p. 655-664, Nov 2016.

JIANG, P. C.; XIONG, W. P.; WANG, G.; MA, C. *et al.* A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. **Exp Ther Med**, 6, n. 1, p. 140-146, Jul 2013.

KARAMOUZIAN, S.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S. N.; NAKHAEE, N.; ESKANDARY, H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. **Clin Neurol Neurosurg**, 114, n. 7, p. 935-939, Sep 2012.

KHAN, I. U.; YOON, Y.; KIM, A.; JO, K. R. *et al.* Improved Healing after the Co-Transplantation of HO-1 and BDNF Overexpressed Mesenchymal Stem Cells in the Subacute Spinal Cord Injury of Dogs. **Cell Transplant**, 27, n. 7, p. 1140-1153, Jul 2018.

KIM, J. W.; HA, K. Y.; MOLON, J. N.; KIM, Y. H. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralaminar and intravenous transplantation. **Spine (Phila Pa 1976)**, 38, n. 17, p. E1065-1074, Aug 1 2013.

KIM, Y.; JO, S. H.; KIM, W. H.; KWEON, O. K. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. **Stem Cell Res Ther**, 6, p. 229, Nov 26 2015.

KIM, Y.; LEE, S. H.; KIM, W. H.; KWEON, O. K. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. **J Vet Sci**, 17, n. 1, p. 123-126, Mar 2016.

KISHK, N. A.; GABR, H.; HAMDY, S.; AFIFI, L. *et al.* Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. **Neurorehabil Neural Repair**, 24, n. 8, p. 702-708, Oct 2010.

KUMAR, A. A.; KUMAR, S. R.; NARAYANAN, R.; ARUL, K. *et al.* Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury: A phase I/II clinical safety and primary efficacy data. **Exp Clin Transplant**, 7, n. 4, p. 241-248, Dec 2009.

KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N.; BEINER, J. *et al.* Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **Spine J**, 4, n. 4, p. 451-464, Jul-Aug 2004.

LAPLACA, M. C.; SIMON, C. M.; PRADO, G. R.; CULLEN, D. K. CNS injury biomechanics and experimental models. **Prog Brain Res**, 161, p. 13-26, 2007.

LEE, J. K.; GEOFFROY, C. G.; CHAN, A. F.; TOLENTINO, K. E. *et al.* Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. **Neuron**, 66, n. 5, p. 663-670, Jun 10 2010.

LIMA, C.; ESCADA, P.; PRATAS-VITAL, J.; BRANCO, C. *et al.* Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. **Neurorehabil Neural Repair**, 24, n. 1, p. 10-22, Jan 2010.

LIU, J.; HAN, D.; WANG, Z.; XUE, M. *et al.* Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, 15, n. 2, p. 185-191, Feb 2013.

LV, C.; ZHANG, T.; LI, K.; GAO, K. Bone marrow mesenchymal stem cells improve spinal function of spinal cord injury in rats via TGF- β /Smads signaling pathway. **Exp Ther Med**, 19, n. 6, p. 3657-3663, Jun 2020.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GÖBEL, U. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, 103, n. 12, p. 4619-4621, Jun 15 2004.

MENDONÇA, M. V.; LAROCCA, T. F.; DE FREITAS SOUZA, B. S.; VILLARREAL, C. F. *et al.* Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. **Stem Cell Res Ther**, 5, n. 6, p. 126, Nov 17 2014.

MENEZES, K.; NASCIMENTO, M. A.; GONÇALVES, J. P.; CRUZ, A. S. *et al.* Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats. **PLoS One**, 9, n. 5, p. e96020, 2014.

MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N.; BLEGGI-TORRES, L. F. *et al.* Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 18, p. 203-208, 2003.

NAUTA, A. J.; WESTERHUIS, G.; KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E. G. *et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, 108, n. 6, p. 2114-2120, Sep 15 2006.

NEW, P. W.; FARRY, A.; BAXTER, D.; NOONAN, V. K. Prevalence of non-traumatic spinal cord injury in Victoria, Australia. **Spinal Cord**, 51, n. 2, p. 99-102, Feb 2013.

NOONAN, V. K.; FINGAS, M.; FARRY, A.; BAXTER, D. *et al.* Incidence and prevalence of spinal cord injury in Canada: a national perspective. **Neuroepidemiology**, 38, n. 4, p. 219-226, 2012.

OH, J. S.; HA, Y.; AN, S. S.; KHAN, M. *et al.* Hypoxia-preconditioned adipose tissue-derived mesenchymal stem cell increase the survival and gene expression of engineered neural stem cells in a spinal cord injury model. **Neurosci Lett**, 472, n. 3, p. 215-219, Mar 26 2010.

OH, J. S.; KIM, K. N.; AN, S. S.; PENNANT, W. A. *et al.* Cotransplantation of mouse neural stem cells (mNSCs) with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves mNSC survival in a rat spinal cord injury model. **Cell Transplant**, 20, n. 6, p. 837-849, 2011.

OH, S. K.; CHOI, K. H.; YOO, J. Y.; KIM, D. Y. *et al.* A Phase III Clinical Trial Showing Limited Efficacy of Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. **Neurosurgery**, 78, n. 3, p. 436-447; discussion 447, Mar 2016.

OHTA, Y.; TAKENAGA, M.; HAMAGUCHI, A.; OOTAKI, M. *et al.* Isolation of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells from Cryopreserved Fat Tissue and Transplantation into Rats with Spinal Cord Injury. **Int J Mol Sci**, 19, n. 7, Jul 5 2018.

PAL, R.; VENKATARAMANA, N. K.; BANSAL, A.; BALARAJU, S. *et al.* Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. **Cytotherapy**, 11, n. 7, p. 897-911, 2009.

PARK, C. H.; JUNG, S. H.; HAN, C. G. Effect of intravenous lidocaine on the neuropathic pain of failed back surgery syndrome. **Korean J Pain**, 25, n. 2, p. 94-98, Apr 2012.

PARK, S. S.; LEE, Y. J.; LEE, S. H.; LEE, D. *et al.* Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. **Cytotherapy**, 14, n. 5, p. 584-597, May 2012.

PINHO, A. G.; CIBRÃO, J. R.; LIMA, R.; GOMES, E. D. *et al.* Immunomodulatory and regenerative effects of the full and fractioned adipose tissue derived stem cells secretome in spinal cord injury. **Exp Neurol**, 351, p. 113989, May 2022.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circ Res**, 95, n. 1, p. 9-20, Jul 9 2004.

RAFIEI ALAVI, S. N.; MADANI NEISHABOORI, A.; HOSSEIN, H.; SARVEAZAD, A. *et al.* Efficacy of adipose tissue-derived stem cells in locomotion recovery after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis on animal studies. **Syst Rev**, 10, n. 1, p. 213, Jul 31 2021.

RYU, H. H.; KANG, B. J.; PARK, S. S.; KIM, Y. *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. **J Vet Med Sci**, 74, n. 12, p. 1617-1630, Dec 2012.

SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I.; MEGURO, A. *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, 109, n. 1, p. 228-234, Jan 1 2007.

SELMANI, Z.; NAJI, A.; ZIDI, I.; FAVIER, B. *et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. **Stem Cells**, 26, n. 1, p. 212-222, Jan 2008.

SHANG, Z.; WANG, R.; LI, D.; CHEN, J. *et al.* Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Therapeutic Strategies Based on 15 Types of Stem Cells in Animal Models. *In: Front Pharmacol*: Copyright © 2022 Shang, Wang, Li, Chen, Zhang, Wang, Wang and Wanyan., 2022. v. 13, p. 819861.

SHIN, J. C.; KIM, K. N.; YOO, J.; KIM, I. S. *et al.* Clinical Trial of Human Fetal Brain-Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in Patients with Traumatic Cervical Spinal Cord Injury. **Neural Plast**, 2015, p. 630932, 2015.

SYKOVÁ, E.; JENDELOVÁ, P.; URDZÍKOVÁ, L.; LESNÝ, P. *et al.* Bone marrow stem cells and polymer hydrogels--two strategies for spinal cord injury repair. **Cell Mol Neurobiol**, 26, n. 7-8, p. 1113-1129, Oct-Nov 2006.

TAKAHASHI, A.; NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; TAKEURA, N. *et al.* Comparison of Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Murine Adipose Tissue and Bone Marrow in the Treatment of Spinal Cord Injury. **Cell Transplant**, 27, n. 7, p. 1126-1139, Jul 2018.

TALAC, R.; FRIEDMAN, J. A.; MOORE, M. J.; LU, L. *et al.* Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. **Biomaterials**, 25, n. 9, p. 1505-1510, Apr 2004.

TANG, L.; LU, X.; ZHU, R.; QIAN, T. *et al.* Adipose-Derived Stem Cells Expressing the Neurogenin-2 Promote Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Rat. **Cell Mol Neurobiol**, 36, n. 5, p. 657-667, Jul 2016.

THAKKAR, U. G.; VANIKAR, A. V.; TRIVEDI, H. L.; SHAH, V. R. *et al.* Infusion of autologous adipose tissue derived neuronal differentiated mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in post-traumatic paraplegia offers a viable therapeutic approach. **Adv Biomed Res**, 5, p. 51, 2016.

TRIVEDI, H. L.; VANIKAR, A. V.; THAKKER, U.; FIROZE, A. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells combined with hematopoietic stem cell transplantation synthesize insulin. **Transplant Proc**, 40, n. 4, p. 1135-1139, May 2008.

VAQUERO, J.; ZURITA, M.; RICO, M. A.; BONILLA, C. *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**, 19, n. 3, p. 349-359, Mar 2017.

VAQUERO, J.; ZURITA, M.; RICO, M. A.; BONILLA, C. *et al.* An approach to personalized cell therapy in chronic complete paraplegia: The Puerta de Hierro phase I/II clinical trial. **Cytotherapy**, 18, n. 8, p. 1025-1036, Aug 2016.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R. G.; RASERA, E.; CECHINEL, C. *et al.* Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. **Rev. bras. ortop**, p. 83-21, 2002.

VIALLE, E. N.; VIALLE, L. R.; ARRUDA ADE, O. Histomorphometric analysis of experimental disc degeneration. **Global Spine J**, 2, n. 3, p. 129-136, Sep 2012.

VIALLE, L. R. G.; FISCHER, S.; MARCON, J. C.; VIALLE, E. *et al.* Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. **Rev. bras. ortop**, p. 85-89, 1999.

VILLANOVA JUNIOR, J. A.; FRACARO, L.; REBELATTO, C. L. K.; DA SILVA, A. J. *et al.* Recovery of motricity and micturition after transplantation of mesenchymal stem cells in rats subjected to spinal cord injury. **Neurosci Lett**, 734, p. 135134, Aug 24 2020.

YAO, L.; HE, C.; ZHAO, Y.; WANG, J. *et al.* Human umbilical cord blood stem cell transplantation for the treatment of chronic spinal cord injury: Electrophysiological changes and long-term efficacy. **Neural Regen Res**, 8, n. 5, p. 397-403, Feb 15 2013.

YOON, S. H.; SHIM, Y. S.; PARK, Y. H.; CHUNG, J. K. *et al.* Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. **Stem Cells**, 25, n. 8, p. 2066-2073, Aug 2007.

ZAMINY, A.; SHOKRGOZAR, M. A.; SADEGHI, Y.; NOROUZIAN, M. *et al.* Transplantation of schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury. **Arch Iran Med**, 16, n. 9, p. 533-541, Sep 2013.

ZHANG, H.; WANG, L.; WEN, S.; XIANG, Q. *et al.* Magnetic resonance imaging tracking and assessing repair function of the bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of spinal cord injury. **Oncotarget**, 8, n. 35, p. 58985-58999, Aug 29 2017.

ZHANG, J.; O'CARROLL, S. J.; WU, A.; NICHOLSON, L. F. *et al.* A model for ex vivo spinal cord segment culture--a tool for analysis of injury repair strategies. **J Neurosci Methods**, 192, n. 1, p. 49-57, Sep 30 2010.

ZHAO, Y.; JIANG, H.; LIU, X. W.; CHEN, J. T. *et al.* Neurogenic differentiation from adipose-derived stem cells and application for autologous transplantation in spinal cord injury. **Cell Tissue Bank**, 16, n. 3, p. 335-342, Sep 2015.

ZHOU, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; MIN, S. *et al.* Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. **Cytotherapy**, 15, n. 4, p. 434-448, Apr 2013.

ZHU, H.; POON, W.; LIU, Y.; LEUNG, G. K. *et al.* Phase I-II Clinical Trial Assessing Safety and Efficacy of Umbilical Cord Blood Mononuclear Cell Transplant Therapy of Chronic Complete Spinal Cord Injury. **Cell Transplant**, 25, n. 11, p. 1925-1943, Nov 2016.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, 13, n. 12, p. 4279-4295, Dec 2002.



Article

Human Adipose-Derived Stem Cells Reduce Cellular Damage after Experimental Spinal Cord Injury in Rats

Emiliano Neves Vialle, Letícia Fracaro, Fabiane Barchiki, Alejandro Correa Dominguez, André de Oliveira Arruda, Marcia Olandoski, Paulo Roberto Slud Brofman and Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto

Special Issue

Combined Treatments and Therapies to Cure Spinal Cord Injury

Edited by
Dr. Nicolas Guerout





Article

Human Adipose-Derived Stem Cells Reduce Cellular Damage after Experimental Spinal Cord Injury in Rats

Emiliano Neves Vialle ^{1,*}, Leticia Fracaro ^{2,3}, Fabiane Barchiki ^{2,3}, Alejandro Correa Dominguez ⁴, André de Oliveira Arruda ¹, Marcia Olandoski ⁵, Paulo Roberto Slud Brofman ^{2,3,†} and Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto ^{2,3,†}

¹ Spine Surgery Group, Cajuru University Hospital, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba 80215-030, Brazil

² Core for Cell Technology, School of Medicine and Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba 80215-030, Brazil

³ National Institute of Science and Technology for Regenerative Medicine, INCT-REGENERA, Rio de Janeiro 21941-599, Brazil

⁴ Laboratory of Basic Biology of Stem Cells, Carlos Chagas Institute—Fiocruz, Rio de Janeiro 21941-599, Brazil

⁵ Department of Biostatistics, School of Medicine, Catholic University of Paraná, Curitiba 80215-030, Brazil

* Correspondence: evialle@hotmail.com; Tel.: +55-41-3223-7860

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Traumatic spinal cord injury (SCI) is a devastating condition without an effective therapy. Cellular therapies are among the promising treatment strategies. Adult stem cells, such as mesenchymal stem cells, are often used in clinical research for their immunomodulatory and regenerative potential. This study aimed to evaluate the effect of human adipose tissue-derived stem cells (ADSC) infusion through the cauda equina in rats with SCI. The human ADSC from bariatric surgery was isolated, expanded, and characterized. Wistar rats were subjected to blunt SCI and were divided into four groups. Two experimental groups (EG): EG1 received one ADSC infusion after SCI, and EG2 received two infusions, the first one after SCI and the second infusion seven days after the injury. Control groups (CG1 and CG2) received infusion with a culture medium. In vivo, cell tracking was performed 48 h and seven days after ADSC infusion. The animals were followed up for 40 days after SCI, and immunohistochemical quantification of myelin, neurons, and astrocytes was performed. Cellular tracking showed cell migration towards the injury site. ADSC infusion significantly reduced neuronal loss, although it did not prevent the myelin loss or enhance the area occupied by astrocytes compared to the control group. The results were similar when comparing one or two cell infusions. The injection of ADSC distal to the injured area was shown to be a safe and effective method for cellular administration in spinal cord injury.

Keywords: spinal cord injury; cell therapy; adipose tissue; neurological rehabilitation; experimental surgery



Citation: Vialle, E.N.; Fracaro, L.; Barchiki, F.; Dominguez, A.C.; Arruda, A.d.O.; Olandoski, M.; Brofman, P.R.S.; Kuniyoshi Rebelatto, C.L. Human Adipose-Derived Stem Cells Reduce Cellular Damage after Experimental Spinal Cord Injury in Rats. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1394. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051394>

Academic Editor: Nicolas Guerout

Received: 28 March 2023

Revised: 28 April 2023

Accepted: 28 April 2023

Published: 8 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Traumatic spinal cord injury (SCI) is responsible for high morbidity and mortality rates in our society, affecting a significant portion of the economically active population and causing significant socioeconomic impacts [1,2]. Regarding the pathophysiology of SCI, after the initial triggering factor of the injury, there is a complex and intricate sequence of events that results in neuronal death and functional loss below the affected level, with interruption of the circuits formed by the afferent sensory fibers and efferent motors that communicate between the cerebral cortex and the rest of the body [3,4]. Spinal cord injury is divided into two phases: primary injury—mechanical, acute, with direct injury and compression of neural elements; and secondary—ischemic, related to a reactive biochemical cascade with changes in perfusion and local blood flow [5–7]. Several therapeutic

strategies have been proposed to treat or minimize the damage caused by SCI; surgical procedures are not able to act on the biochemical processes of secondary injury or provide stimulus to regeneration [5]. Other options of treatment are corticoids, riluzole, hormones, calcium channel blockers, and specific proteins, which are ineffective in the treatment of SCI [8,9]. The administration of stem cells (SC) presents as a promising strategy since it can potentially interrupt or minimize the cascade of pathophysiological events and provide a favorable environment for specialized tissue regeneration, with possible positive clinical correlation [10–12]. Adult stem cells, such as mesenchymal stem cells (MSC), are often used in clinical research for their immunomodulatory and regenerative potential [9,13]. The adipose tissue is an attractive source of MSC because of the high frequency of adipose-derived stem cells (ADSC); they present few ethical concerns and can be obtained from donors undergoing plastic surgical procedures [14,15]. Considering the complexity of SCI and the different mechanisms of action of the ADSC, the use of a standardized spinal cord contusion model gains scientific strength by controlling several aspects involving the lesion and subsequent evaluations of the possible effects of the administered SC [16]. This paper aims to evaluate the effect of administering human ADSC in the cauda equina of rats submitted to standardized experimental SCI, through histological study of the spinal cord, quantifying cellular changes through immunohistochemistry and histomorphometric analysis; further studying the cellular migration using an in vivo tracking methodology and cell survival rate after transplantation using immunofluorescence.

2. Materials and Methods

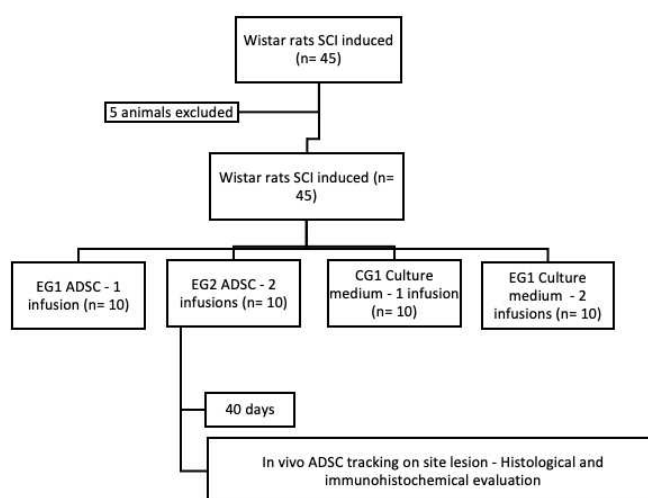
2.1. Study Design

The present study is longitudinal, prospective, randomized, and controlled. It was approved by the Institutional Ethics Committee on the Use of Animals (No. 769) and the Ethics Committee in Research with Humans (CAAE 12723713.3.0000.0020—Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil). Three biological samples of adipose tissue donors from bariatric surgery were used. Forty-five Wistar rats, *Rattus norvegicus*, young adults with an average of 20 weeks of age, weighing between 300 and 350 g, female, were used. During the study period, all animals received water and food ad libitum and were kept under light control (light-dark cycles of 12 h) and at room temperature (25 ± 1 °C, continuous temperature monitoring). Spinal cord injury was induced in all animals ($n = 45$). They were divided into experimental groups (EG, $n = 20$) and control groups (CG, $n = 20$). The experimental group was divided according to the number of infusions performed: one infusion after SCI induction (EG1, $n = 10$) or two infusions, the second infusion seven days after the injury (EG2, $n = 10$). Control groups received culture medium infusion (CG1, $n = 10$ and CG2, $n = 10$). The animals were followed up for 40 days after SCI and euthanized for histological analysis (Figure 1).

2.2. Adipose-Derived Stem Cells Isolation and Expansion

Human adipose tissue, obtained through bariatric surgery, was collected in flasks containing a 2% glucose solution. This tissue was isolated by using enzymatic digestion. Approximately 100 mL of adipose tissue was washed with phosphate buffer saline (PBS) (Gibco™, New York, NY, USA). The tissue was macerated, and enzymatic digestion with collagenase type I (1 mg/mL) (Gibco™, New York, NY, USA) was performed for 30 min at 37 °C, under constant shaking, followed by filtration through 100-µm mesh filter (BD FALCON, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA) and centrifugation at $800 \times g$ for 10 min. Contaminating erythrocytes were removed by erythrocyte lysis buffer. The cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) (Gibco™, New York, NY, USA), resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium and F12 (DMEM-F12) (Gibco™, New York, NY, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL) (Gibco™, New York, NY, USA), and plated in 75 cm² flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland), at a density of 1×10^5 cells/cm². The first change of medium was performed after 24 h, to remove non-adherent cells, and the other changes

were performed twice a week. After 80% confluence, cell dissociation was performed with trypsin/EDTA (Gibco™, New York, NY, USA). The culture medium was discarded, and the cells were washed twice with PBS. Then, trypsin was added to the cells and incubated at 37 °C for 4 min. Next, the trypsin was inactivated with 1% FBS and IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium—Gibco™, New York, NY, USA). The cell suspension was centrifuged, the supernatant discarded, and the cells were counted and plated again (first pass—P1). All experiments were performed between the third (P3) and the fifth passage (P5).



Day 0	Day 2	Day 7	Day 9	Day 14	Day 40
SCI Induction and infusion: ADSC (EG1, EG2) and culture medium (CG1, CG2)	In vivo ADSC tracking (EG1, CG1)	In vivo ADSC tracking (EG1, CG1) Infusion: ADSC (EG2) and culture medium (CG2)	In vivo ADSC tracking (EG2, CG2)	In vivo ADSC tracking (EG2, CG2)	Euthanasia and evaluations

Figure 1. Flow diagram of experimental study. SCI (spinal cord injury); EG (experimental group); ADSC (adipose derived stem cells); CG (control group).

2.3. Adipose-Derived Stem Cells Characterization

The characterization of ADSC was carried out by evaluating cell surface markers by immunophenotyping and by cell differentiation potential. The immunophenotypic analysis followed the criteria defined by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [17]. Approximately 1×10^6 cells were placed in each tube, the cells were washed with PBS (Gibco™, New York, NY, USA) and centrifuged for 5 min at $400 \times g$. After centrifugation, the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies were added: CD105, CD90, CD73, CD29, CD44, CD14, CD34, CD45, CD31, and CD19 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Next, the cells were incubated with the antibodies for 30 min. They were washed with PBS and resuspended in PBS containing 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Twenty thousand events were collected from each sample, acquired on a BD FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences), and analyzed using FlowJo software version 10.1 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Cell differentiation potential was assessed using commercial media by inducing ADSC differentiation into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes (Lonza, MD, USA). For adipogenic and osteogenic differentiation, 16,000 ADSC were plated in duplicate on glass coverslips (GlassTécnica, Curitiba, Brazil) in 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). The cells were incubated in an incubator (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C, with 5% CO₂ until reaching 80% confluence. Hence, 300 µL of differentiation medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) was added and the medium was changed three times a week for 21 days. Control cells were cultured for the same period, in a culture

medium without differentiation induction factors. For adipogenic differentiation, cells were fixed with Bouin (Biotec, Pinhais, Basil) for 10 min, washed twice with 70% ethanol (Merck, Damstadt, Germany) and with MiliQ water. The cells were stained with a 0.5% Oil Red O solution (Sigma-Aldrich) for 1 h to visualize the presence of lipid vacuoles. Hematoxylin-Eosin (HE) (Biotec) was used for nuclear staining. For osteogenic differentiation, cells were fixed with 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min and washed with MiliQ ultra-pure water. Cells were stained with Alizarin Red S (Fluka Chemie, Steinheim, Germany) for 5 min to assess the presence of calcium crystals.

For chondrogenic differentiation, micromass culture was performed. Briefly, 1×10^6 cells were transferred to a conical tube which was centrifuged for 10 min at $400 \times g$ to form a pellet. After centrifugation, 1 mL of differentiation medium was added, and medium exchange was performed three times a week for 21 days. Next, control cells were cultured without differentiation induction factors, for the same period. After 21 days, the cell aggregate was fixed with 10% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 1 h, dehydrated with serial dilutions of ethanol (Merck) and placed in a paraffin block. Sections of 4 μ m thickness were made and stained with toluidine blue (Sigma-Aldrich). The presence of proteoglycans in the extracellular matrix was evaluated using an optical microscope (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan) [18].

2.4. Adipose-Derived Stem Cells Transduction

The cells were transduced with a luciferase gene for the in vivo monitoring of ADSC by bioluminescence. Cell line Human embryonic kidney 293 cells (HEK 293) was transfected with vectors pMD2.G, pCMV_dr8.91, and pMSCV_Luc2_T2A using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and maintained for three days in culture. The supernatant containing the viral particles was collected, filtered with a 0.22- μ m filter, and ultracentrifuged at 28,000 rpm for 1 h and 30 min. Cells were resuspended in PBS/BSA 1% (Sigma-Aldrich) and stored at -80°C . ADSC were transduced with the supernatant containing the viral particles and 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of Hexadimethrine Bromide (Polybrene, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). The medium used for cell transduction was changed every 24 h for three days. After this period, puromycin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was added for cell selection at a final concentration of 10 mM. The IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) imaging system was used to analyze the bioluminescence emitted by cells expressing luciferase.

2.5. Surgical Procedure

For the induction of standardized experimental SCI, the animals were anesthetized using ketamine (Agener União, São Paulo, Brazil) and 2% xylazine (Agener União, São Paulo, Brazil) intraperitoneally, at a dose of 90 mg/kg and 10 mg/kg weight, respectively. The procedure was started after tests to verify the deep anesthetic plane, absence of corneal reflex, and non-reactivity to caudal compression. Cephalothin 25 mg/kg (Virbac, São Paulo, Brazil) was administered intraperitoneally as preoperative prophylaxis. The animals were positioned in ventral decubitus, on the "Impactor" device (Rutgers University Impactor®, Rutgers, NJ, USA), according to a previously validated method of complete SCI through contusion [19]. Trichotomy was performed, and by palpation of the lower ribs, access to the skin and deep dissection at the level of T10 were accomplished, followed by removal of the posterior vertebral elements (laminectomy), exposing the spinal cord. Under controlled and previously validated adjustments of height and speed, a rod weighing 5 g was dropped on the exposed level, generating a complete lesion proven by the specific software (MASCIS®, Rutgers, NJ, USA) applied to the system for validation of the lesion. Animals that did not have complete SCI were excluded from the study. After SCI induction, hemostasis was performed, and the surgical wound was washed with 0.9% saline solution, and then the skin was sutured with mono nylon 3.0 thread (Shalom, Goiania, Brazil) (Figure 2). All animals remained under anesthesia for approximately two hours in a chamber with a controlled temperature of 30°C and placed in individual cages with easily accessible food

and water. The surgical wound was inspected daily, and the bladder was emptied using the Credé method every 12 h in all animals throughout the postoperative period [20].

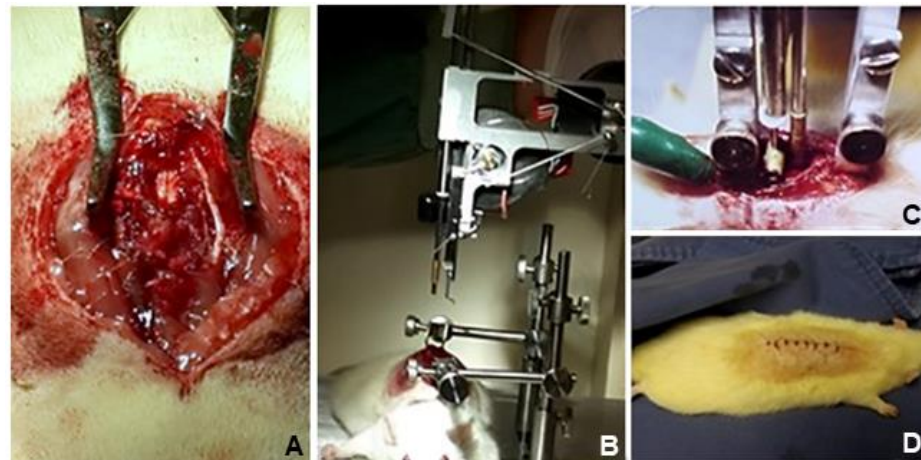


Figure 2. Spinal cord injury procedure. (A). Dissection of T9-T10 level followed by laminectomy, exposing the spinal cord. (B). Animal positioned on the Impactor device. (C). A rod was dropped on the spinal cord, generating a lesion. (D). After the procedure, the skin was sutured.

2.6. Cell Transplantation

Under anesthesia, a new surgical incision was made, approximately 1.5 cm distal to the first one, identifying the lumbar levels and the dural sac. Under direct visualization, using a Hamilton syringe (Hamilton®), a solution of 100 μ L of DMEM-F12 medium containing 1×10^6 ADSC was infused inside the dural sac of the animals in groups EG1 and EG2. The same procedure was performed with the animals in CG1 and CG2, with 100 μ L of culture medium. The incision was sutured with 3.0 mononylon (Bioline, Anápolis, Goiás, Brazil). After seven days of injury and first cell infusion, EG2 and CG2 underwent a new infusion of ADSC or culture medium, respectively.

2.7. In Vivo Cell Tracking

The transduced ADSC were infused into three animals from each group. The animals received inhalational anesthesia with isoflurane (Rhodia, Paulínia, Brazil), an intraperitoneal injection of 150 mg/kg of D-luciferin (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) was administered to the animals 5 min before image acquisition. The animals were positioned in the camera in dorsal decubitus and a capture field of 12.7×12.7 cm was used (imaging system IVIS LUMINA II, Hopkinton, MA, USA). A series of images were acquired until the maximum peak of the bioluminescence signal was obtained. Images were analyzed using the Living Image software (version 2.50, Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). The signal intensity of the infused ADSC was evaluated 48 h and seven days after the procedure.

2.8. Euthanasia and Tissue Collection

Forty days after SCI induction, the animals were euthanized through high-dose anesthesia, intraperitoneally, with ketamine (240 mg/kg weight) (Agener União, São Paulo, Brazil) and xylazine (30 mg/kg weight) (Agener União), associated with halothane (Tanohalo, Cristália, Brazil) gas in an anesthetic chamber (4–5%) to reduce animal suffering, following euthanasia protocols for experimental studies. First, a thoracotomy was performed to allow intracardiac perfusion with 0.9% saline (JP, Ribeirão Preto, Brazil) until complete exsanguination. Then, through the same route, reaching the right atrium, a 4% paraformaldehyde solution was injected (approximate total volume of 300 mL/animal) (Neon, Suzano, Brazil), allowing the immediate fixation of the nervous tissue and providing ideal conditions for preparation and anatomopathological manipulation.

2.9. Anatomopathological Study—Histology and Immunohistochemistry

After euthanasia, the spinal cord was collected and transferred to a 10% formalin buffered solution. After fixation, histological sections were made, with a thickness of 5 μm from the central area of the lesion. Evident morphological changes were verified macroscopically, evidencing opaque and darker coloration, as well as local thinning, in correspondence with the experimentally induced SCI level (Figure 3).

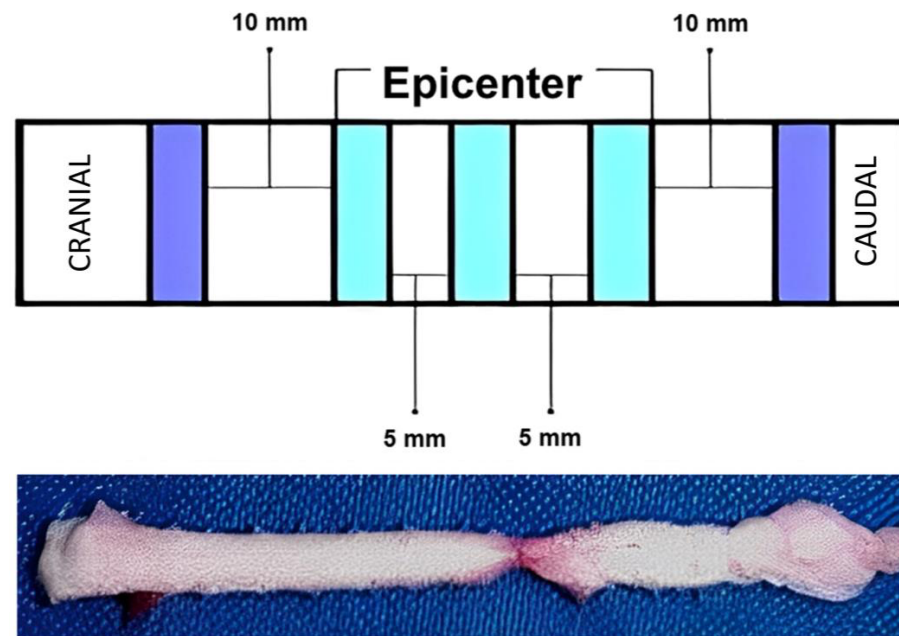


Figure 3. Anatomopathological image of the spinal cord. After removal of the surrounding bone, the tissue was fixed and prepared for histological sections. The central cuts were 5 μm thick, with 5 mm intervals for the central area and 10 mm for the distal cuts. The blue areas had 6 cuts and the violet ones had three cuts.

For histological analysis, samples were stained with hematoxylin-eosin (HE), luxol fast blue (Sigma-Aldrich) and cresyl violet (Sigma-Aldrich). From the analysis of the slides stained with luxol fast blue, a software, Image ProPlus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), based on the color morphometry method, estimated the amount of myelin present in the tissue. Using cresyl violet staining, two independent examiners assessed medullary cellularity, focusing on neuronal presence, by dividing the histological field into equal quadrants (anterior-posterior, right-left, and combinations), using an optical microscope at 200 $\times$ magnification (Olympus, Tokyo, Japan). Eventual neurons present in medullary sections were counted separately. The software calculated the marked area in units of square micrometers (μm^2). Some values were expressed in the total value of points identified by the program, to better demonstrate the differences between groups [21]. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) was evaluated by immunohistochemistry technique to identify activated astrocytes.

2.10. Statistical Analysis

Data analysis was performed using the SPSS Statistics software (v. 20.0). In the cases of histological and immunohistochemical evaluations, the means were compared, and the non-parametric Mann–Whitney test was applied with significance level corrected by Bonferroni, in addition to the one-way analysis of variance (ANOVA, $p = 0.05$). Values $p \leq 0.012$ were considered significant. Student's t test was used for comparison within groups ($p < 0.05$). The data obtained from the in vivo tracking of the cells were not submitted to statistical analysis, being presented in a descriptively way.

3. Results

3.1. Animal Care and Surgical Procedures

The animal model of SCI induction was adequate, with observations as follows. Five animals were excluded from the study: four died, three during the anesthetic period of induction and prolonged maintenance to perform the surgery and evaluate cell tracking in vivo, probably due to idiosyncratic reactions; and one during the late maintenance period, probably related to complications arising from and inherent to the loss of bladder control and neurological function. One animal did not present complete spinal cord injury and was excluded.

3.2. ADSC Characterization

The ADSC surface antigen profile was evaluated, and they were accordingly the criteria defined by ISCT [19]. The cells were positive for CD105, CD90, CD73, CD29, and CD166 markers and negative for CD34, CD45, CD19, CD14, and HLA-DR. Cellular viability before injection into the spinal canal was 98.2% (Figure 4).

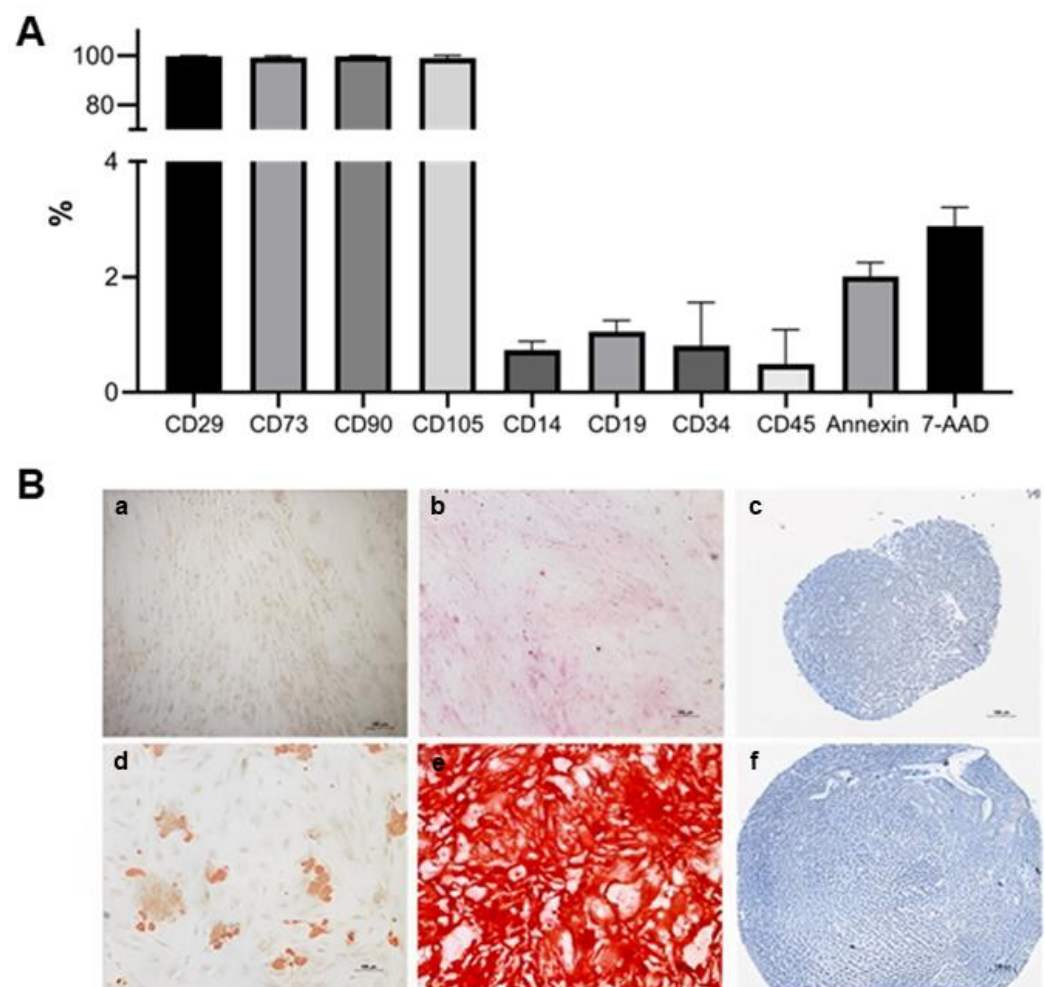


Figure 4. Adipose-derived stem cell characterization. (A). Immunophenotypical profile, cell viability, and apoptosis/necrosis. The bars represent the average expression for each marker. (B). Adipose-derived stem cell differentiation. Cells were maintained with medium to induce differentiation for 21 days. (d). Adipose differentiation was demonstrated with the presence of lipid vacuoles. (e). Extracellular matrix mineralization was observed at osteogenic differentiation. (f). Chondrocytic differentiation was observed by proteoglycan deposition in the matrix and the presence of lacunae around young chondrocytes. (a–c). Control cells were cultured without an induction medium.

After induction of cell differentiation with specific media for each lineage, ADSC showed differentiative potential into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes (Figure 4).

3.3. Histomorphometric Analysis of Myelin and Neurons

Adipose-derived stem cell infusion did not change the myelin area significantly in comparison with the control group. In three samples, tissue destruction was extremely intense such that histological analysis was impossible. There was a large variation in the amount of myelin measured within the groups (Figure 5).

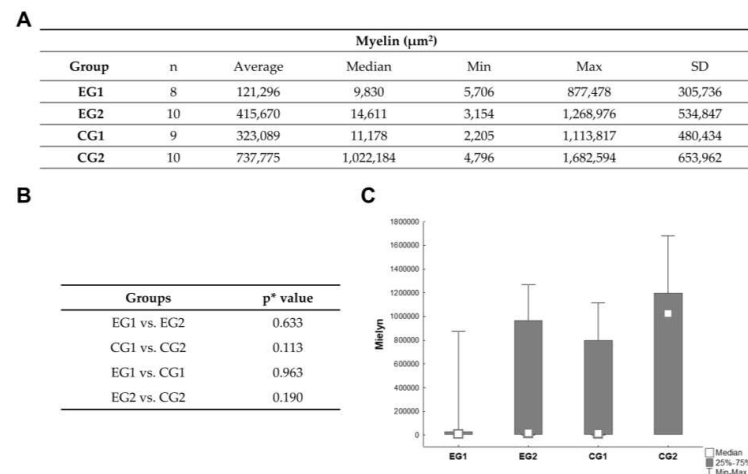


Figure 5. Histomorphometric analysis of myelin area. (A,B). Comparison of myelin area showed no significant difference between groups. (C). Myelin was measured in units of μm^2 and represented by the median values. * Mann-Whitney non-parametric test, $p < 0.012$ (Bonferroni's correction). EG: experimental group; CG: control group; SD: standard deviation.

There was a significant difference regarding number of neurons in the injury area when comparing the experimental and control groups. Groups that received ADSC infusion showed significantly more neurons. There was no difference when comparing one and two ADSC infusions (Figure 6).

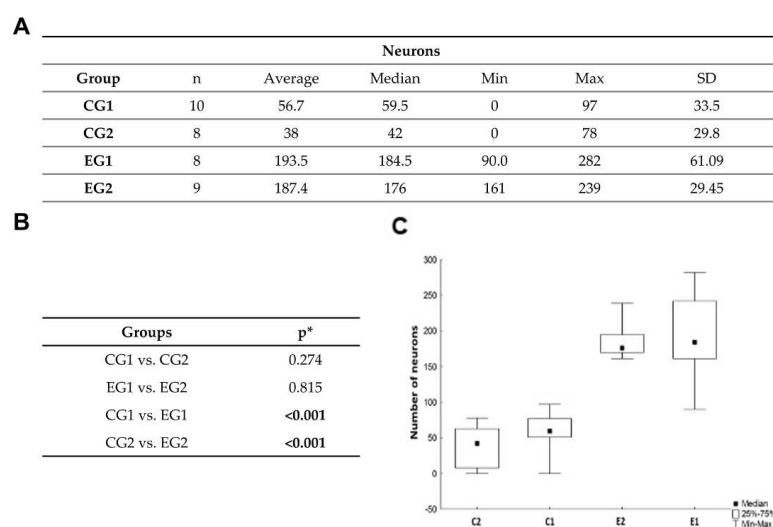


Figure 6. (A) Histomorphometric analysis of neurons. (B,C) Comparison of neuron numbers between experimental and control groups. Groups that received ADSC infusion, showed a greater number of neurons. * Mann-Whitney's non-parametric test, $p < 0.012$ (Bonferroni's correction). EG: experimental group; CG: control group; SD: standard deviation. Numbers in bold represent statistically significant difference.

3.4. Immunohistochemical Astrocyte Evaluation

The spinal cord was divided in four sections (anterior right and left, posterior right and left). There was no significant difference when comparing experimental and control groups (Tables 1 and 2, Figure 7).

Table 1. Description of astrocytic area in four quadrants. Astrocytes were measured in units of μm^2 . Analysis of variance with one factor (ANOVA), $p < 0.05$ —EG: experimental group; CG: control group; AR: anterior-right; AL: anterior-left; PR: posterior-right; PL: posterior-left.

Area	Group	N	Average	Median	Min	Max	SD
AR	CG1	9	19,738	18,760	8690	28,785	6500
	CG2	10	16,778	15,287	7870	36,177	8326
	EG1	8	21,547	21,702	15,805	26,511	3597
	EG2	9	20,042	17,650	10,312	34,553	8369
AL	CG1	9	19,882	21,492	7922	27,080	6766
	CG2	10	13,586	12,688	5525	25,587	6325
	EG1	8	21,256	20,114	15,863	29,074	4339
	EG2	9	18,629	18,453	9779	37,710	9531
PR	CG1	9	20,139	20,121	8302	30,488	6559
	CG2	10	18,034	16,628	8737	32,206	7045
	EG1	8	24,795	24,927	15,770	29,270	4107
	EG2	9	19,064	21,752	10,207	31,100	7589
PL	CG1	9	21,411	21,664	10,541	29,412	5929
	CG2	10	15,765	16,124	8161	22,956	4404
	EG1	8	23,672	23,148	16,040	31,780	5776
	EG2	9	19,058	13,830	11,131	38,737	10,120

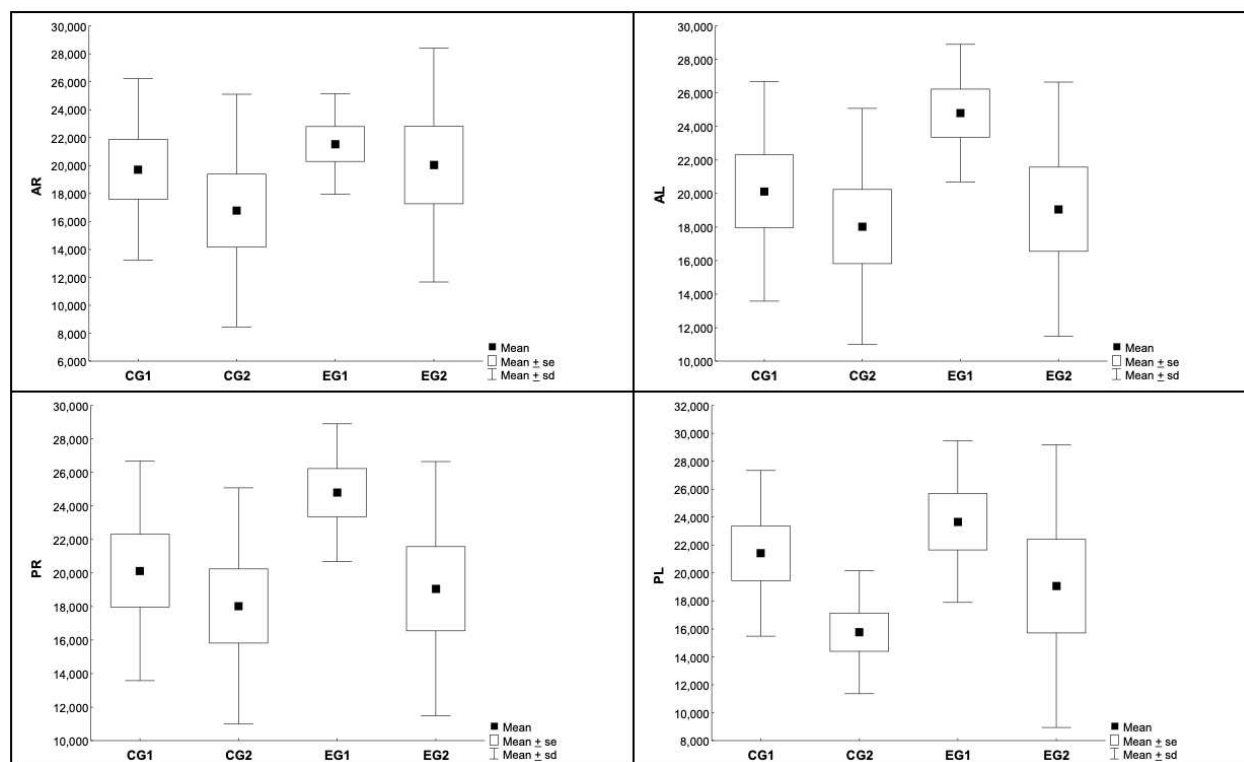


Figure 7. Immunohistochemical evaluation of astrocytic area, divided in four quadrants—EG: experimental group; CG: control group; AR: anterior-right; AL: anterior-left; PR: posterior-right; PL: posterior-left.

Table 2. Comparison of astrocytic area between groups. Student's *t*-test for independent samples, * $p < 0.012$ (Bonferroni's correction); ANOVA, $p < 0.05$ —EG: experimental group; CG: control group; AR: anterior-right; AL: anterior-left; PR: posterior-right; PL: posterior-left.

Groups	<i>p</i> * Value			
	AR	AL	PR	PL
EG1 × EG2	0.633	0.486	0.077	0.275
CG1 × CG2	0.404	0.051	0.511	0.033
EG1 × CG1	0.497	0.631	0.105	0.439
EG2 × CG2	0.407	0.188	0.763	0.387

3.5. In Vivo Cell Tracking with Bioluminescence Imaging

Bioluminescence evaluation was performed in three animals of each experimental group, at 48 h and seven days after first ADSC infusion (EG1 and EG2). In EG2, the evaluation was performed 48 h and seven days after second cell infusion. At 48 h of evaluation, cells were observed at the injury site and in some animals on the lungs. It was noticed that signal intensity was reduced on the second evaluation for EG1 (day 7) and EG2 group (days 7 and 9) after infusion. In the animals of the groups EG1 and EG2, no cells were observed after seven days of ADSC infusion (Figure 8).

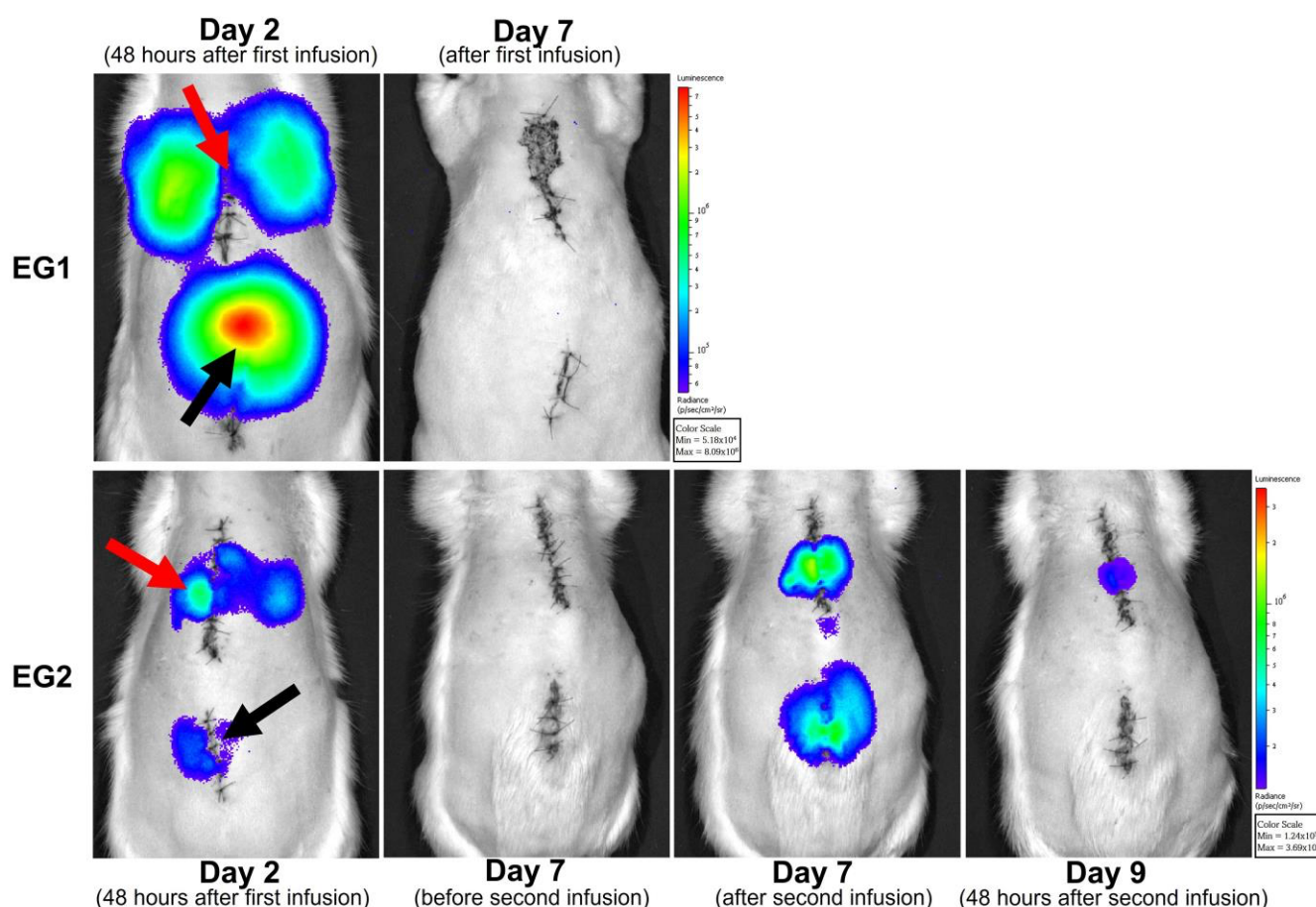


Figure 8. In vivo tracking of ADSC. Representative photos of experimental groups (EG1 and EG2). Cells were observed at the infusion site and in the lungs. The red arrow indicates the injury site, and the black arrow indicates the ADSC infusion site. The images are pseudo-colored and represent the bioluminescent signal emitted during degradation of D-luciferin by the enzyme luciferase present in cells. The color scale represents the intensity of the bioluminescence signal emitted by the cells in photons/second/cm²/steradian (p/s/cm²/sr).

4. Discussion

The methodology used in this study, standardized spinal cord contusion, aims to allow for better comparison within our own institution and with other research centers globally. In comparison with clip or balloon compression, the impactor device allows for better similarity in histology and motor recovery and leads to fewer deaths during follow-up [22,23].

The choice of ADSC followed not only our institution's protocol but is also justified by benefits found in other similar studies: good resistance to hypoxic conditions, secretion of neurotrophic factors, and low immunogenicity. It is possible that the combination of hypoxic conditioning and the addition of different cell types will significantly improve the regenerative potential of ADSC [24]. Furthermore, these cells resist hypoxic conditions, secrete neurotrophic factors, and show low immunogenicity [25]. The injection pathway was the main modification in our research strategy, due to unsatisfactory results achieved with direct injection into the injury site, especially in the acute setting. Our previous reports show decreased motricity after direct stem cell injection into the injury site [10]. Although there are reports of cellular migration towards the injury with intravenous or arterial catheterization pathways, cellular concentration is higher when the cells are delivered directly into the nervous system [26]. In the acute setting, the inflammatory process makes it challenging to identify the presence of stem cells, and in the chronic phase, fibrosis limits tissue expansion, limiting the injected volume and presenting evident extravasation from the injury site [27]. As proposed by our protocol, lumbar puncture is also accessible for human trials, and understanding the behavior of stem cells injected into this pathway is crucial for developing future human therapeutic strategies.

In vivo, cellular tracking with bioluminescence imaging is a sensitive technique for evaluating administered cell distribution, localization, and migration [28]. Although ADSC have a short life span after infusion [29], this research identified cells at the injury site and on the lungs right after each infusion. Cell tracking with bioluminescence allowed us to observe the migratory capacity of ADSC towards the lesion site; however, the animals that received repeated sedation during the injury recovery period showed a significant mortality rate. Repeated anesthetic procedures can also be a negative factor in evaluating a modulation and cell survival. However, in this study, no significant histological differences were noticed between animals that underwent cell tracking and those that did not. Callera et al. [30] were able to track marked cells using magnetic resonance imaging, confirming migration from the infusion site in the lumbar spine towards the injured area in the thoracic spinal cord. Other methods to track cell migration include magnetic resonance imaging, in vivo microscopy, and micro-computed tomography. However, these methods require expensive equipment, making results reproducibility difficult, especially in low-income countries [31]. The myelin sheath, produced by oligodendrocytes in the central nervous system, renders the structure to the spinal cord and regulates neuronal growth through neurite outgrowth inhibitor (NOGO) molecules secreted by injured or dysfunctional oligodendrocytes. Controlling myelin production and NOGO secretion is critical to spinal cord regeneration research [32,33]. In the present study, ADSC could not effectively modify the structural damage secondary to myelin loss nor activate astrocytes. On the contrary, some studies showed that mesenchymal stromal cell promotes axonal regeneration and myelination [34]. Chen et al. reported that the infusion of ADSC directly to the injury site right after the trauma promoted astrocyte activation and reduced glial scar [25].

In this research, neuronal loss was reduced, which suggests that immunomodulatory factors secreted by the ADSC reduced inflammation, inhibited apoptosis, and protected neurons. These results are in line with other studies showing that the intravenous injection of ADSC had a similar effect on the number of neurons, even with a small concentration of cells migrating towards the injury site on subacute phases of SCI, which suggests a regenerative effect secondary to ADSC administration [35]. Menezes et al. identified laminin deposition on the injury site, indicating neuronal regeneration after cell transplantation [36].

Another key issue in spinal cord regeneration is controlling scar formation. By not controlling or reducing astrocyte migration to the injury area, ADSC could not block the intrinsic process that limits axonal regrowth and neuronal reconnection [37].

The infusion of cells into the dural sac, distal to the spinal cord, allows for a larger injected volume, with low risk of neurologic deterioration, and in vivo cell tracking confirmed cell migration towards the injury site. The downside of repeated anesthetic procedures in the experimental models, would not be a problem on a human trial, since lumbar puncture can be performed on an ambulatory fashion, with local anesthesia.

5. Conclusions

ADSC infusion distal to the injury site was able to reduce neuronal loss significantly, although it did not prevent the myelin loss or enhance the area occupied by astrocytes compared to the control group. The results are similar when comparing one or two cell infusions.

Author Contributions: E.N.V.: study design, experimental procedures, statistical analysis, manuscript preparation; C.L.K.R.: study design, experimental procedures, manuscript preparation; L.F., F.B. and A.C.D.: experimental procedures, manuscript review; A.d.O.A.: experimental procedures, statistical analysis, manuscript preparation; M.O.: statistical analysis; P.R.S.B.: study design, manuscript preparation and review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study received a grant from AOSpine Latin America.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Institutional Ethics Committee on the Use of Animals (No 69) as well as by the Ethics Committee in Research with Humans (CAAE 12723713.3.0000.0020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study, allowing for use of adipose tissue from humans undergoing plastic surgery.

Data Availability Statement: Data is available upon request to the main author, according to Institutional policy.

Acknowledgments: The authors thank Crisciele Kuligovski for cell transduction experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cripps, R.A.; Lee, B.B.; Wing, P.; Weerts, E.; Mackay, J.; Brown, D. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: Towards a living data repository for injury prevention. *Spinal Cord* **2011**, *49*, 493–501. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Noonan, V.K.; Fingas, M.; Farry, A.; Baxter, D.; Singh, A.; Fehlings, M.G.; Dvorak, M.F. Incidence and prevalence of spinal cord injury in Canada: A national perspective. *Neuroepidemiology* **2012**, *38*, 219–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Choo, A.M.; Liu, J.; Lam, C.K.; Dvorak, M.; Tetzlaff, W.; Oxland, T.R. Contusion, dislocation, and distraction: Primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* **2007**, *6*, 255–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. LaPlaca, M.C.; Simon, C.M.; Prado, G.R.; Cullen, D.K. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog. Brain Res.* **2007**, *161*, 13–26. [\[CrossRef\]](#)
5. Fehlings, M.G.; Perrin, R.G. The role and timing of early decompression for cervical spinal cord injury: Update with a review of recent clinical evidence. *Injury* **2005**, *36* (Suppl. S2), B13–B26. [\[CrossRef\]](#)
6. Hausmann, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* **2003**, *41*, 369–378. [\[CrossRef\]](#)
7. Kwon, B.K.; Tetzlaff, W.; Grauer, J.N.; Beiner, J.; Vaccaro, A.R. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* **2004**, *4*, 451–464. [\[CrossRef\]](#)
8. Ahuja, C.S.; Martin, A.R.; Fehlings, M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000Research* **2016**, *5*, 1017. [\[CrossRef\]](#)
9. Chen, D.; Zeng, W.; Fu, Y.; Gao, M.; Lv, G. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with minocycline improve spinal cord injury in a rat model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 11957–11969.
10. Carvalho, K.A.; Cunha, R.C.; Vialle, E.N.; Osiecki, R.; Moreira, G.H.; Simeoni, R.B.; Francisco, J.C.; Guarita-Souza, L.C.; Oliveira, L.; Zocche, L.; et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45+)/CD34(-) after cell therapy in acute spinal cord injury: In exercise training and in sedentary rats. *Transplant. Proc.* **2008**, *40*, 847–849. [\[CrossRef\]](#)

11. Fonseca, A.F.B.; Scheffer, J.P.; Giral-di-Guimarães, A.; Coelho, B.P.; Medina, R.M.; Oliveira, A.L.A. Comparison among bone marrow mesenchymal stem and mononuclear cells to promote functional recovery after spinal cord injury in rabbits. *Acta Cir. Bras.* **2017**, *32*, 1026–1035. [\[CrossRef\]](#)
12. Lv, C.; Zhang, T.; Li, K.; Gao, K. Bone marrow mesenchymal stem cells improve spinal function of spinal cord injury in rats via TGF- β /Smads signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 3657–3663. [\[CrossRef\]](#)
13. Caplan, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J. Pathol.* **2009**, *217*, 318–324. [\[CrossRef\]](#)
14. Fang, B.; Song, Y.; Zhao, R.C.; Han, Q.; Cao, Y. Treatment of resistant pure red cell aplasia after major ABO-incompatible bone marrow transplantation with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Hematol.* **2007**, *82*, 772–773. [\[CrossRef\]](#)
15. Fraser, J.K.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Hedrick, M.H. Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 150–154. [\[CrossRef\]](#)
16. Vialle, E.; Vialle, L.R.G.; Raseira, E.; Cechinel, C.; Leonel, I.; Seyboth, C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. *Rev. Bras. Ortop.* **2002**, *37*, 83–91.
17. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [\[CrossRef\]](#)
18. Rebelatto, C.K.; Aguiar, A.M.; Moretão, M.P.; Senegaglia, A.C.; Hansen, P.; Barchiki, F.; Oliveira, J.; Martins, J.; Kuligowski, C.; Mansur, F.; et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 901–913. [\[CrossRef\]](#)
19. Vialle, L.R.G.; Fischer, S.; Marcon, J.C.; Vialle, E.; Luzzi, R.; Bleggi-Torres, L.F. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev. Bras. Ortop.* **1999**, *34*, 85–89.
20. Meyer, F.; Vialle, L.R.; Vialle, E.N.; Bleggi-Torres, L.F.; Raseira, E.; Leonel, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Bras.* **2003**, *18*, 203–208. [\[CrossRef\]](#)
21. Vialle, E.N.; Vialle, L.R.; Arruda Ade, O. Histomorphometric analysis of experimental disc degeneration. *Global Spine J.* **2012**, *2*, 129–136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Talac, R.; Friedman, J.A.; Moore, M.J.; Lu, L.; Jabbari, E.; Windebank, A.J.; Currier, B.L.; Yaszemski, M.J. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1505–1510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Sharif-Alhoseini, M.; Khormali, M.; Rezaei, M.; Safdarian, M.; Hajighadery, A.; Khalatbari, M.M.; Meknatkhah, S.; Rezvan, M.; Chalangari, M.; Derakhshan, P.; et al. Animal models of spinal cord injury: A systematic review. *Spinal Cord* **2017**, *55*, 714–721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Villanova Junior, J.A.; Fracaro, L.; Rebelatto, C.L.K.; da Silva, A.J.; Barchiki, F.; Senegaglia, A.C.; Dominguez, A.C.; de Moura, S.A.B.; Pimpão, C.T.; Brofman, P.R.S.; et al. Recovery of motricity and micturition after transplantation of mesenchymal stem cells in rats subjected to spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* **2020**, *734*, 135134. [\[CrossRef\]](#)
25. Chen, J.; Wang, L.; Liu, M.; Gao, G.; Zhao, W.; Fu, Q.; Wang, Y. Implantation of adipose-derived mesenchymal stem cell sheets promotes axonal regeneration and restores bladder function after spinal cord injury. *Stem. Cell Res. Ther.* **2022**, *13*, 503. [\[CrossRef\]](#)
26. Dave, S.D.; Patel, C.N.; Vanikar, A.V.; Trivedi, H.L. In vitro differentiation of neural cells from human adipose tissue derived stromal cells. *Neurol. India* **2018**, *66*, 716–721. [\[CrossRef\]](#)
27. Anjum, A.; Yazid, M.D.; Fauzi Daud, M.; Idris, J.; Ng, A.M.H.; Selvi Naicker, A.; Ismail, O.H.R.; Athi Kumar, R.K.; Lokanathan, Y. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7533. [\[CrossRef\]](#)
28. Kim, T.J.; Tuerkcan, S.; Ceballos, A.; Pratx, G. Modular platform for low-light microscopy. *Biomed Opt. Express.* **2015**, *6*, 4585–4598. [\[CrossRef\]](#)
29. Zaminy, A.; Shokrgozar, M.A.; Sadeghi, Y.; Norouzi, M.; Heidari, M.H.; Piryaei, A. Transplantation of schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury. *Arch. Iran. Med.* **2013**, *16*, 533–541.
30. Callera, F.; de Melo, C.M. Magnetic resonance tracking of magnetically labeled autologous bone marrow CD34+ cells transplanted into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with chronic spinal cord injury: CD34+ cells' migration into the injured site. *Stem. Cells Dev.* **2007**, *16*, 461–466. [\[CrossRef\]](#)
31. Hubertus, V.; Meyer, L.; Roolfs, L.; Waldmann, L.; Nieminen-Kelhä, M.; Fehlings, M.G.; Vajkoczy, P. In vivo imaging in experimental spinal cord injury—Techniques and trends. *Brain Spine* **2022**, *2*, 100859. [\[CrossRef\]](#)
32. Geoffroy, C.G.; Zheng, B. Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2014**, *27*, 31–38. [\[CrossRef\]](#)
33. Lee, J.K.; Geoffroy, C.G.; Chan, A.F.; Tolentino, K.E.; Crawford, M.J.; Leal, M.A.; Kang, B.; Zheng, B. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* **2010**, *66*, 663–670. [\[CrossRef\]](#)
34. Ashammakhi, N.; Kim, H.J.; Ehsanipour, A.; Bierman, R.D.; Kaarela, O.; Xue, C.; Khademhosseini, A.; Seidlits, S.K. Regenerative Therapies for Spinal Cord Injury. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2019**, *25*, 471–491. [\[CrossRef\]](#)
35. Ohta, Y.; Hamaguchi, A.; Ootaki, M.; Watanabe, M.; Takeba, Y.; Iiri, T.; Matsumoto, N.; Takenaga, M. Intravenous infusion of adipose-derived stem/stromal cells improves functional recovery of rats with spinal cord injury. *Cytotherapy* **2017**, *19*, 839–848. [\[CrossRef\]](#)

36. Menezes, K.; Nascimento, M.A.; Gonçalves, J.P.; Cruz, A.S.; Lopes, D.V.; Curzio, B.; Bonamino, M.; de Menezes, J.R.; Borojevic, R.; Rossi, M.I.; et al. Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96020. [[CrossRef](#)]
37. Faulkner, J.R.; Herrmann, J.E.; Woo, M.J.; Tansey, K.E.; Doan, N.B.; Sofroniew, M.V. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 2143–2155. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.