

BRIAN GUILHERME MONTEIRO MARTA COIMBRA

**Terapia experimental com células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos
adultos em modelo de lesão aguda da medula espinal**

SÃO PAULO

2025

BRIAN GUILHERME MONTEIRO MARTA COIMBRA

**Terapia experimental com células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos
adultos em modelo de lesão aguda da medula espinal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça
Cristante

Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Amaral
Haddad

SÃO PAULO

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coimbra, Brian Guilherme Monteiro Marta

Terapia experimental com células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos adultos em modelo de lesão aguda da medula espinal / Brian Guilherme Monteiro Marta Coimbra; Alexandre Fogaça Cristante, orientador; Luciana Amaral Haddad, coorientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2025.

1.Terapia celular 2.Células ectomesenquimais 3.Modelo experimental 4.Lesão medular aguda I.Cristante, Alexandre Fogaça, orient. II.Haddad, Luciana Amaral, coorient. III.Título

USP/FM/DBD-495/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (através do LIM 41, Laboratório de Investigação Médica 41 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo 2013/08028-1).

Coimbra BGMM. Terapia experimental com células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos adultos em modelo de lesão aguda da medula espinal. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2025.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elisabete e Mário

À minha companheira, Arielle Anzai

A meus avós, Olímpia, Domingos, Luzia e Antonio Henriques

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elisabete e Mário, pela dedicação, pelo amor incondicional e por serem o esteio que possibilitou minha trajetória acadêmica e pessoal.

À minha grande companheira, Arielle Anzai, por toda parceria, pela presença amorosa e também por dividir comigo a vida, os desafios e tantas conquistas.

Aos meus avós, Olímpia, Domingos, Luzia e Antonio Henriques, pelo privilégio da intensa convivência e por todo cuidado que me dedicaram.

Aos meus familiares, pelo suporte importante e pelos inúmeros momentos partilhados.

Ao meu orientador, Professor Alexandre Fogaça, pelas oportunidades, ensinamentos e confiança em meu trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Luciana Haddad, pela paciência, pela generosidade e pela excelência científica que é fonte permanente de inspiração.

Aos demais membros que participaram de maneira decisiva deste estudo, Gustavo Bispo, Natália de Araújo, Professora Vera Capelozzi, Camila Baldavira, Daniel Perini, Rosangela Silva e equipes dos laboratórios.

Aos Professores que tanto me ensinaram e ajudaram em diferentes fases de minha formação, com destaque para Prof. Marcelo Suehara, Prof. Bruno Zilberstein, Prof. Alexandre Danilovic e Prof. Edmund Baracat. Agradeço especialmente também ao Prof. Tarcísio Eloy e ao Prof. Olavo Pires de Camargo pela possibilidade de realizar o doutorado e por todas as oportunidades concedidas.

Aos meus amigos médicos que tanto influenciam positivamente minha existência e minha carreira profissional, com destaque para André Franco, Flavia Prada, William Teixeira, Paulo Reis, Camilo Helito e Douglas Narazaki.

Aos meus pacientes, razão e motivação da minha prática como médico.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa (Livro do Desassossego)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de “*International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)*”.

Estrutura e apresentação: Diretrizes para Apresentação de Dissertação e Teses da USP - Parte IV Vancouver. Elaborado por Vania Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação/Faculdade de Medicina da USP; 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com “*List of Journals Indexed in Index Medicus*”.

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica, aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia - CTA-SBA. 1a ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole; 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto no 6.583/2008.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Diagrama ilustrativo dos ossos do crânio de um roedor. (A) Vista dorsal do crânio. (B) Vista ventral do crânio com a mandíbula removida. O crânio foi preparado a partir de um camundongo de 40 dias de idade. Ossos individuais estão coloridos para melhor visualização. Os ossos que definem a porção óssea da cavidade nasal estão identificados sublinhados: dorsalmente os ossos frontal e nasal, ventralmente o vômer, caudalmente o osso etmoidal e ventrocaudalmente o osso palatino..... 36
- Figura 2 –** (A) Ilustração da distribuição e tipos de epitélios (escamoso, transicional, respiratório e olfatório) na cavidade nasal do rato. (B) Ilustração da mucosa olfatória, constituída pelo próprio neuroepitélio olfatório (camadas apical e intermediária) e pela lâmina própria adjacente, separados por uma membrana basal. A placa cribriforme e a cavidade nasal estão posicionadas na parte superior e inferior da figura, respectivamente. Células da bainha olfatória e células ectomesenquimais são retratadas na lâmina própria, bem como no ácino da glândula de Bowman olfatória. Os axônios dos neurônios sensoriais olfatórios se reúnem em feixes de nervos olfatórios que atravessam a lâmina própria e a placa cribriforme. As células do ducto da glândula de Bowman, bem como células de suporte sustentaculares e microvilares, e neurônios são vistos no neuroepitélio, onde suas células progenitoras (células basais globosas e horizontais) também são observadas..... 37
- Figura 3 –** Aspectos técnicos do isolamento do septo nasal de rato adulto *post-mortem*: (A) rato posicionado em decúbito esternal, (B) incisão longitudinal, (C) dissecação de partes moles, (D e E) craniotomia e osteotomia nasal, (F) retração óssea, com cavidade nasal evidente, (G) coleta de septo nasal e (H) septo nasal isolado..... 53
- Figura 4 –** Análise de populações de células aderentes e flutuantes. (A) Imagens de contraste de fase mostrando células aderentes confluentes em DIV 7 e células flutuantes brilhantes (setas). (B) Estruturas esféricas

formadas em cultura em suspensão de células P3 10 dias após o plaqueamento. (C) Análise citométrica de fluxo de células aderentes P5 coletadas em 90% de confluência, analisadas para a expressão dos marcadores de células hematopoiéticas CD34 e CD45, o marcador de células endoteliais CD31 e os marcadores de tronco mesenquimais CD73 e CD90. (D-F) Imagens representativas de esferas flutuantes de células observadas após quatro (D), sete (E) ou 15 dias em cultura. (G) Diagrama de pontos do tamanho da esfera (μm) mostrando medições individuais feitas no dia indicado em cultura. ANOVA unidirecional com teste post hoc de Tukey ($\mu = 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barras de escala = 50 μm 64

Figura 5 – Painel de Histologia da Medula Espinal nos Grupos Experimentais, com amostras representativas de tecido medular com lesão; lesão e Matrigel; e lesão, Matrigel e células ectomesenquimais, após 6 semanas..... 78

Figura 6 – Painel de Imunohistoquímica da Medula Espinal nos Grupos Experimentais, com amostras representativas de tecido medular com lesão; lesão e Matrigel; e lesão, Matrigel e células ectomesenquimais, após 6 semanas..... 79

Figura 7 – Diagramas ilustrativos dos procedimentos e dados obtidos neste trabalho. (A) Diagrama da obtenção de neuroesferas a partir da mucosa olfatória de ratos, sua introdução em Matrigel® líquido e gelificação a temperatura ambiente e enxerto aos animais que sofreram LME. (B) Ratos que receberam neuroesferas em Matrigel® apresentaram melhores funções motoras do que os que receberam somente Matrigel®. À sexta semana, suas funções motoras não diferiram entre os dois grupos. (C) Representação esquemática dos principais elementos celulares da substância branca. Neste desenho, o corpo celular de um neurônio na substância cinzenta estende vários processos dendríticos curtos e um único processo axonal longo. O axônio, na substância branca, é circundado por uma bainha de mielina isolante. Essa bainha é produzida pelos oligodendrócitos.

Geralmente, os oligodendrócitos estendem muitos processos, cada um dos quais envolve um segmento do axônio para formar um internodo. Os internodos são separados uns dos outros por pequenas regiões amielinizadas chamadas nódulos de Ranvier. Essa organização especializada das bainhas de mielina promove a condução saltatória, na qual os impulsos elétricos "saltam" de nódulo para nódulo à medida que percorrem o axônio, do corpo celular do neurônio até a terminação axonal. A substância branca também contém astrócitos e microglia. Os astrócitos são células gliais em forma de estrela que ajudam a manter a homeostase, regulando as concentrações iônicas locais e o volume do fluido extracelular dentro do SNC. Na substância branca, estendem prolongamentos até os nódulos de Ranvier e os vasos sanguíneos, onde contribuem para a função da barreira hematoencefálica. As células da microglia, consideradas as células imunes do SNC, ajudam a remover detritos e células mortas²²⁰.....

FIGURAS DE TABELAS

Tabela 1 –	Descrição da escala BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	66
Tabela 2 –	Resultado das comparações múltiplas do BBB entre grupos e momentos avaliados conforme as diferenças encontradas.....	68
Tabela 3 –	Diferenças dos valores da escala BBB entre os grupos dentro de cada período pós-operatório*.....	70
Tabela 4 –	Diferenças dos valores da escala BBB entre os períodos pós-operatórios dentro de cada grupo*.....	71
Tabela 5 –	Resultado das comparações múltiplas dos parâmetros do plano horizontal entre grupos e momentos avaliados conforme diferenças apresentadas.....	75
Tabela 6 –	Descrição dos dados de imunohistoquímica segundo grupos e resultado das comparações.....	81
Tabela 7 –	Resultado das comparações múltiplas do OLIG1 entre os grupos.....	82
Tabela 8 –	Análise comparativa das técnicas para obtenção de tecido do septo nasal de roedores.....	87
Tabela 9 –	Descrição dos pesos dos animais segundo grupos no início e ao final do estudo e das variações de peso e resultado das comparações das variações entre os grupos.....	92
Tabela 10 –	Descrição do tempo de bexiga neurogênica presente segundo grupos e resultado da comparação.....	93
Tabela 11 –	Resultado das comparações múltiplas entre os grupos do tempo de bexiga neurogênica.....	93
Tabela 12 –	Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	94
Tabela 13 –	Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	96
Tabela 14 –	Resultado das correlações dos dados de imunohistoquímica e os dados funcionais dos animais.....	99

FIGURAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Perfis médios do BBB e respectivos erros padrões segundo grupos...	67
Gráfico 2 –	Valores da escala BBB para cada grupo (G3, G4 e G5) momento do estudo (D2, S1 - S6) permitindo a comparação entre os momentos. No box plot, X representa a mediana. Pequenos círculos indicam valores discrepantes e valores internos. Cada caixa colorida indica os valores do primeiro e terceiro interquartis. Os valores mínimo e máximo estão indicados (*) $P < 0,05$ para o pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni. Está indicado somente a primeira diferença significativa ao longo do período pós-operatório para cada grupo.....	69
Gráfico 3 –	Perfis médios e respectivos erros padrões do número de passos segundo grupo.....	72
Gráfico 4 –	Perfis médios e respectivos erros padrões do percentual de acertos segundo grupo.....	73
Gráfico 5 –	Perfis médios e respectivos erros padrões do percentual de escorregões segundo grupo.....	73
Gráfico 6 –	Perfis médios e respectivos erros padrões do percentual de erros segundo grupo.....	74
Gráfico 7 –	Valores da escala BBB para cada momento do estudo (D2, S1 - S6) permitindo a comparação entre os grupos (G3, G4 e G5) a cada momento. No box plot, X representa a mediana. Pequenos círculos indicam valores discrepantes e valores internos. Cada caixa colorida indica os valores do primeiro e terceiro interquartis. Os valores mínimo e máximo estão indicados (*) $P < 0,05$ para o pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-MSCs	Células tronco mesenquimais amnióticas
AD-MSCs	Tecido adiposo derivadas das células-tronco mesenquimais
AECs	Células epiteliais amnióticas
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BBB	Basso-Beattie-Bresnahan
BM-MSC	Medula óssea - células-tronco mesenquimais
BMS	Basso Mouse Scale
CCAC	<i>Canadian Council on Animal Care</i>
CBO	Células da bainha olfatória
CD11B	<i>Integrin alpha M / Mac-1</i>
CE	Células ectomesenquimais
CMO	Células da medula óssea
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Células ectomesenquimais
CTE	Células-tronco embrionárias
DIV	Dia in vitro
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12</i>
EEG	Equações de estimação generalizadas
EGF	Epidérmico
ESCs	Células-tronco embrionárias
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Hepatócitos
IB	Instituto de Biociências
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia

iPSCs	Células-tronco pluripotentes induzidas
KGF	Queratinócitos
LME	Lesão da medula espinal
LETRAN	Laboratório de Estudos do traumatismo raquimedular e de nervos
MASCIS	<i>Multicenter animal spinal cord injury study</i>
MSCs	Células-tronco mesenquimais
NG2	<i>Neuron-glial antigen 2 / CSPG4</i>
NOR	Neurônios olfatórios
NPCs	Células progenitoras neurais
NSCs	Células-tronco neurais
NYU	New York University
Olig1	<i>Oligodendrocyte transcription factor 1</i>
Olig2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
RM	Ressonância magnética
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TCE	Traumatismo cranioencefálico
TRM	Trauma raquimedular
UC-MSCs	Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Histórico.....	24
1.2	Lesão de medula espinal.....	25
1.3	Estratégias de reparo da LME.....	27
1.4	Principais tipos celulares empregados em terapia celular para LME.....	28
1.4.1	Células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	28
1.4.2	MSCs derivadas do tecido adiposo.....	29
1.4.3	MSCs do cordão umbilical e da membrana amniótica.....	29
1.4.4	Células epiteliais amnióticas.....	30
1.4.5	Células progenitoras neurais (NPCs / NSCs).....	30
1.4.6	Células-tronco embrionárias e células pluripotentes induzidas.....	31
1.4.7	Transplante da mucosa olfatória em bloco.....	31
1.5	Transplante de células olfatórias.....	31
1.6	O roedor como modelo experimental.....	35
1.7	Conceito da pesquisa.....	38
2	OBJETIVOS.....	40
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	Aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais.....	50
4.2	Animals.....	50
4.3	Material.....	50
4.4	Métodos.....	52
4.4.1	Coleta e processamento da mucosa olfatória dos roedores....	52
4.4.2	Cultivo de Ces e neuroesferas.....	53
4.4.3	Modelo experimental da lesão medular.....	55
4.4.3.1	Animais para o procedimento cirúrgico.....	55
4.4.3.2	Grupos experimentais.....	55
4.4.3.3	Protocolo de anestesia.....	56
4.4.3.4	Procedimento cirúrgico.....	56

4.4.3.5	Contusão medular.....	57
4.4.3.6	Pós-operatório.....	57
4.4.3.7	Analgesia.....	57
4.4.3.8	Antibioticoprofilaxia.....	57
4.4.3.9	Protocolo de eutanásia.....	57
4.4.3.10	Descarte das carcaças.....	58
4.4.4	Avaliações.....	58
4.4.4.1	Avaliação funcional.....	58
4.4.4.2	Necrópsia e avaliação macroscópica.....	59
4.4.4.3	Análise histológica e imunohistoquímica.....	60
4.4.4.4	Histologia.....	60
4.4.5	Análise estatística.....	61
5	RESULTADOS.....	62
5.1	Análises da função motora dos animais no período pós-operatório.....	64
5.2	Análises histológicas e imunohistoquímica.....	78
6	DISCUSSÃO.....	83
7	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS.....	123

RESUMO

Coimbra BGMM. Terapia experimental com células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos adultos em modelo de lesão aguda da medula espinal. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Introdução: A lesão traumática da medula espinal (LME) apresenta incidência crescente, importante impacto na vida de seus portadores e elevados custos socioeconômicos e psicológicos. O tratamento atualmente disponível oferece pouco efeito na regeneração dos danos provocados. As terapias *multi-target*, com atuação em várias frentes da fisiopatologia da doença, surgem como as mais promissoras no prognóstico dessa patologia, e o estudo em laboratório segue sendo de grande importância para novas descobertas neste campo de pesquisa. No laboratório de estudos do traumatismo raquimedular e nervos (LETRAN) da Universidade de São Paulo (USP) foi anteriormente padronizado e validado um modelo experimental consagrado de LME traumática, caracterizada como contusão aguda na medula espinal torácica de ratos adultos. O componente mesenquimal de células-tronco ectomesenquimais da mucosa olfatória de ratos (CE) e humanos tem se mostrado um adjuvante significativo ao reparo da LME de ratos. A subpopulação neuroectodérmica isolada de CEs não foi muito bem explorada para esse fim. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi avaliar a função motora de ratos *Wistar* adultos com contusão moderada da medula espinal seguida de transplante de neuroesferas derivadas de CEs, em veículo gelificado, e buscar correlacioná-la à expressão de marcadores da glia do sistema nervoso central. **Métodos:** Viabilizou-se a coleta do septo nasal, fonte de CEs, por técnica de dissecação original. Foi isolada a população neuroectodérmica de CEs como neuroesferas, que foram empregadas em enxerto no modelo experimental. Cinco grupos de animais foram definidos, sendo que todos foram submetidos à laminectomia e os grupos 2 a 5 também à durotomia. Os grupos 3 a 5 sofreram contusão moderada da medula espinal ao nível torácico (T8/T9). Os grupos 4 e 5 receberam veículo (matriz extracelular gelificada, Matrigel® a 90%). Animais do grupo 5 receberam neuroesferas. Em período pós-operatório de seis semanas, a avaliação da função motora dos animais foi pela escala de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB). Análises histológicas seguiram procedimentos de rotina. **Resultados:** Animais do grupo 1 e 2 apresentaram valores máximos na escala BBB. No período de uma a duas semanas do pós-operatório, valores de BBB do grupo 5 foram significativamente mais elevados do que os grupos 3 ou 4. Na sexta semana, os valores BBB foram semelhantes para os animais dos grupos 4 e 5, e mais elevados do que os do grupo 3. OLIG-1 teve sua expressão mais elevada no sítio

da LME do grupo 5. **Conclusões:** Laminectomia e durotomia não afetaram a medula espinal. Na sexta semana do período pós-operatório, animais dos grupos 4 e 5 tiveram funções motoras semelhantes e melhores do que o grupo controle. A marcação diferenciada de Olig1 e os valores BBB mais elevados nas duas primeiras semanas pós-operatórias para o grupo de animais que receberam neuroesferas de CEs sugerem maior diferenciação de células precursoras de oligodendrócitos em oligodendrócitos maduros produtores de mielina e que essas variáveis devam se relacionar no início do reparo da lesão. O modelo experimental com neuroesferas de CEs abre perspectivas para estudo da mielinização no início do reparo da LME e translação da pesquisa para estudos com humanos.

Palavras-chave: Terapia celular. Células ectomesenquimais. Modelo experimental. Lesão medular aguda.

ABSTRACT

Coimbra BGMM. Multipotent olfactory mucosa stem cell therapy in an experimental model of acute spinal cord injury in adult rats. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2025.

Introduction: Traumatic spinal cord injury (SCI) has an increasing incidence, with a significant impact on patients’ lives and high socioeconomic and psychological costs. Currently available treatments offer limited efficacy in promoting neural regeneration. Multitarget therapies, which act simultaneously on different aspects of the disease’s pathophysiology, have emerged as the most promising strategies for improving outcomes. Experimental studies remain essential for advancing new discoveries in this field. At the Laboratory for Studies on Spinal Cord and Nerve Trauma (LETRAN) of the University of São Paulo (USP), a validated and standardized experimental model of traumatic SCI has been established, characterized as an acute contusion of the thoracic spinal cord in adult rats. The mesenchymal component of ectomesenchymal stem cells (ESCs) from the olfactory mucosa of rats and humans has shown a significant adjuvant effect in SCI repair. However, the neuroectodermal subpopulation isolated from ESCs has been less explored for this purpose. **Objective:** To evaluate the motor function of adult Wistar rats subjected to moderate spinal cord contusion followed by transplantation of neurospheres derived from ectomesenchymal stem cells, delivered in a gel-based vehicle, and to correlate functional recovery with the expression of glial markers of the central nervous system. **Methods:** A novel dissection technique was developed to enable collection of the nasal septum, the source of ESCs. The neuroectodermal subpopulation of ESCs was isolated as neurospheres and used for transplantation in the experimental model. Five groups of animals were defined; all underwent laminectomy, and groups 2–5 also underwent durotomy. Groups 3–5 received a moderate thoracic (T8/T9) spinal cord contusion. Groups 4 and 5 were treated with a gel vehicle (90% Matrigel®), and group 5 additionally received neurospheres. Motor function was assessed using the Basso–Beattie–Bresnahan (BBB) locomotor scale over a six-week postoperative period. Histological analyses followed standard protocols. **Results:** Animals in groups 1 and 2 exhibited maximal BBB scores. Between the first and second postoperative weeks, group 5 showed significantly higher BBB scores than groups 3 and 4. By week six, BBB scores in groups 4 and 5 were similar, both higher than those in group 3. OLIG-1 expression was highest at the SCI site in group 5. **Conclusions:** Laminectomy and durotomy did not affect the spinal cord structure. At six weeks

postoperatively, animals in groups 4 and 5 showed similar motor function, both superior to the control group. The differential expression of OLIG-1, along with higher BBB scores in the first two postoperative weeks in animals treated with ESC-derived neurospheres, suggests enhanced differentiation of oligodendrocyte precursor cells into mature, myelin-producing oligodendrocytes. These variables appear to be related to the initial stages of spinal cord repair. The experimental model using ESC-derived neurospheres provides a promising approach for studying early remyelination mechanisms and translating preclinical findings to future human applications.

Keywords: Cell therapy. Ectomesenchymal cells. Experimental model. Acute spinal cord injury.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A medula espinal e seus prolongamentos neurais estão protegidos em um arcabouço ósseo que é o canal vertebral. Quando ocorre transferência de energia à coluna, pode ocorrer ruptura da continuidade das estruturas protetoras levando a dano ao tecido neural.

A lesão medular traumática é conhecida desde a antiguidade, bem como os efeitos clínicos dela decorrentes. Há perda de força, sensibilidade e perda de função urinária e intestinal. Quando há transecção axonal completa, não há recuperação de função neurológica. Quando ocorre contusão, pode haver recuperação, em menor ou maior grau, ao longo de semanas, meses e anos.

O primeiro registro que se tem de paraplegia decorrente de lesão medular data de 3000 aC, documentado em um papiro egípcio. Milênios depois, Hipócrates (460-370 aC) recomendava tração dos extremos do tronco para o tratamento desse tipo de lesão. Na Idade Média, Paulo de Aegina (625-690 dC) descreveu o primeiro registro que se tem de laminectomia como parte do tratamento das lesões traumáticas incapacitantes da coluna vertebral, conceito retomado por Ambroise Paré (1564-1598) na Idade Moderna.

Foi apenas no século XIX que a ciência, formalmente constituída após o Iluminismo do século anterior, realizou avanços no estudo deste campo. Originalmente na Inglaterra, as observações sobre lesão medular começaram a contemplar o impacto da mortalidade associada à perda do fisiologismo urinário. Apesar de a laminectomia ter sido adequadamente realizada pela primeira vez neste século por Henry Cline (1750-1827), a morbidade elevada favorecia o manejo não cirúrgico dos casos.

A Primeira Guerra Mundial foi o grande catalisador dos avanços na terapia das lesões espinais: Inglaterra, França e Alemanha tinham um elevado número de indivíduos vítimas desta entidade que precisavam ser tratados. Foi neste período, e no entre guerras, que o cuidado se tornou multidisciplinar, o maior dos avanços práticos até então. Houve avanço na drenagem urinária, introdução das mudanças de decúbito, início dos exercícios de reabilitação de rotina e retomada das discussões acerca do papel da laminectomia. A mortalidade seguia ainda elevada.

Com o advento da Segunda Guerra Mundial, a primazia tecnológica da medicina migrou da Alemanha para os Estados Unidos da América. Foi na segunda metade do século XX, neste contexto, que com o avanço de técnicas anestésicas e consolidação de conceitos práticos do cuidado (multidisciplinar) a cirurgia de laminectomia (e seus desdobramentos

futuros como o debate sobre a artrodese associada) teve seu estabelecimento e suas indicações consolidadas. Entretanto, se o tratamento prático da condição de que versamos conseguiu grandes avanços, a Medicina ainda falhava em decifrar melhor a fisiopatologia da lesão e investigar os possíveis meios de regeneração do tecido neural. Embora os tratamentos das sequelas da lesão traumática encontrem-se bem estabelecidos, o tratamento e o reparo do dano tecidual propriamente ditos, ainda não.

1.2 Lesão de medula espinal

Poucas deficiências se comparam em termos de devastação ao indivíduo como a lesão da medula espinal (LME). Trata-se de uma condição permanente e de natureza complexa, que torna o indivíduo vulnerável a perdas motoras, sensoriais e autonômicas que se acompanham de complicações diversas e grande impacto econômico e social. É papel da ciência buscar uma solução apropriada em termos prognósticos para o problema.

A epidemiologia do trauma raquimedular (TRM) evidencia uma transição global marcada por mudanças demográficas, socioeconômicas e etiológicas que redefinem seu perfil ao longo das últimas décadas. De acordo com dados do Global Burden of Disease Study 2021, a incidência global de lesões medulares cervicais aumentou de aproximadamente 249.122 casos em 1990 para 306.568 casos em 2021, apesar da redução da taxa padronizada por idade de 4,88 para 3,78 por 100.000 habitantes, sugerindo avanços nas políticas de prevenção e no manejo do trauma¹. Estima-se que as taxas de prevalência alcancem até 906 casos por milhão de habitantes em determinadas regiões, com expressivas disparidades regionais associadas ao nível de desenvolvimento socioeconômico e ao acesso aos serviços de saúde. Nos países em desenvolvimento, a meta-análise de Golestani et al.² identificou uma incidência média de 22,55 casos por milhão de habitantes ao ano, com predomínio de indivíduos do sexo masculino (80,1%) e idade média inferior a 30 anos. As principais causas são os acidentes de trânsito (43,2%) e as quedas (34,2%), enquanto as lesões cervicais representam 43,4% de todos os casos de TRM. Em contraste, nos países de alta renda e sociedades envelhecidas, como o Japão, observa-se um deslocamento do perfil epidemiológico: entre 2005 e 2021, a idade média dos pacientes aumentou progressivamente, superando 60 anos, e as quedas de baixo impacto — como quedas em nível do solo e em escadas — tornaram-se a principal etiologia, substituindo os traumas de alta energia, como acidentes automobilísticos³. Nesse contexto, as lesões cervicais altas (C1–C4) constituíram 45,8% dos casos, seguidas pelas lesões cervicais baixas (C5–C8, 26,4%), com predomínio de tetraplegias incompletas (48,4%)³. Essa evolução

demográfica e etiológica reflete não apenas o envelhecimento populacional, mas também as desigualdades estruturais entre sistemas de saúde, evidenciando a necessidade de estratégias regionais específicas de prevenção, reabilitação e vigilância epidemiológica contínua^{2,4,5}.

Aproximadamente 15-40 milhões de pessoas convivem com a LME em todo o mundo⁶. Homens são mais acometidos que mulheres, independente da faixa etária analisada³. A média de idade é de 42,2 anos e acidentes com veículos automotores é a principal causa, correspondendo a 38,1% do total, seguida de quedas (31%), violência (13,5%), esportes (8,9%), complicações médicas/cirúrgicas (4,7%) e outras (4,1%)⁷. O custo direto por indivíduo, ao longo da vida, varia entre 1,1 e 4,7 milhões de dólares nos EUA, e o custo para a sociedade é ainda maior⁸. Os custos podem variar de acordo com o nível educacional, a gravidade da lesão e tipo de ocupação profissional prévia⁹.

A fisiopatologia da LME envolve a lesão primária traumática e, em sequência, resposta secundária ao trauma. Na lesão primária, há descontinuidade abrupta de tratos neurais seguida de influxo massivo de macrófagos periféricos e células T, além da ativação da microglia local, que dura semanas após a lesão^{10,11}. A resposta secundária é produto de uma cascata de alterações biológicas funcionais que aumentam a área da lesão e levam à isquemia, edema, hemorragia, citotoxicidade e culminam na formação de cicatriz glial em torno de cavitação central no sítio da lesão primária¹²⁻¹⁴.

No momento da lesão, ocorre compressão, laceração e distração localmente. Dentro de segundos, desencadeiam-se alterações que aumentam a área lesional, como dano à barreira hemato-encefálica, hemorragia, inflamação inicial, lesão axonal, morte de células neuronais (por necrose ou apoptose), lesão vascular e queda nos níveis de ATP. Dentro de horas, na fase aguda precoce, verifica-se isquemia, edema, trombose, inflamação secundária, degeneração Walleriana, perda do gradiente de sódio, inflamação secundária, formação de radicais livres e exotoxicidade glutaminérgica. Dias após a ocorrência da lesão, desenrola-se a fase subaguda, em que há infiltração de macrófagos, astrocitose reativa, proliferação e alterações morfológicas na glia, ativação da microglia e liberação de alarminas. Por fim, nas semanas a meses que se seguem, alcança-se a fase crônica, de remodelação, em que há maturação da cicatriz glial, deposição de proteoglicano condroitina-sulfato na cicatriz e em seu redor, fibrose, resolução da inflamação de fase aguda, falha na regeneração axonal e cavitação cística¹⁵.

As consequências biológicas da LME são múltiplas: morte de neurônios e células gliais localmente, ruptura de axônios na substância branca, formação de cavidades císticas preenchidas com fluido e desmielinização da substância branca poupada¹⁶⁻¹⁸.

1.3 Estratégias de reparo da LME

Um grande problema associado à LME é a limitação à regeneração do tecido neural, principalmente devido ao meio extracelular não permissivo^{19,20}. Atualmente, entretanto, poucas terapias reparadoras foram alçadas com sucesso, e parcial, à prática clínica, provavelmente devido à natureza complexa da lesão.

Nenhuma terapia isolada deverá ser capaz de solucionar este insulto ao sistema nervoso central (SNC), sendo a combinação de terapia celular, reabilitação e intervenções farmacêuticas o caminho terapêutico mais promissor²¹⁻²⁸. Entretanto, atingir esta combinação (terapia *multi-target*) com sucesso clínico é um desafio futuro²⁹.

As diferentes linhas terapêuticas em estudo nos dias de hoje visam intervir em diferentes fases do processo acima comentado^{30,31}. As estratégias incluem promover neuroproteção (fatores de crescimento, *Riluzol*, transplante celular), modular inflamação (metilprednisolona, minociclina, transplante de células mesenquimais estromais), estimular plasticidade (transplante celular, miméticos de heparina, condroitinase ABC³², reabilitação neurológica), alvejar a cicatriz glial (condroitinase ABC³², miméticos de heparina), bloquear a inibição à mielina (anti-Nogo^{33,34}, antagonistas de Rho³⁵), substituir células ou tecidos perdidos (transplante celular), estabelecer pontes na lesão³⁶ (hidrogéis, transplante celular) e promover remielinização (miméticos de heparina).

Além das abordagens biológicas, a neuromodulação induzida eletricamente, como a estimulação epidural ou transcutânea da medula espinal, tem tido resultados promissores^{37,38} e deve ser adicionada às atuais estratégias de reabilitação neurológica em um futuro próximo³⁹.

O transplante celular de células multipotentes emerge como a mais promissora de todas as terapias, assumindo protagonismo no leque de possíveis tratamentos para LME. Esta estratégia tem dois objetivos: integrar-se à medula repondo tecido perdido (caráter permanente) e mediar remodelação reparativa (papel transitório)^{40,41}.

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas capazes de se autorrenovarem e se diferenciarem em outros tipos celulares^{42,43}. São chamadas de “embrionárias” quando oriundas da massa interna do blastocisto, e de “adultas” quando presentes nos anexos embrionários (placenta e cordão umbilical) ou nos diferentes órgãos. Após transplante, as células-tronco podem sobreviver, migrar para as regiões lesionadas e diferenciar-se em neurônios específicos, promovendo a reparação ao aumentar a sobrevivência de neurônios endógenos por mecanismos indiretos como suporte neurotrófico, modulação imunológica e substituição enzimática⁴⁴⁻⁴⁶.

Vários tipos celulares foram estudados, variando desde células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco neuronais (embrionárias, fetais e de adultos) até células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês, *induced pluripotent stem cells*, iPSC) e células mesenquimais estromais (derivadas da medula óssea, mucosa olfatória e cordão umbilical)⁴⁷⁻⁵⁹.

1.4 Principais tipos celulares empregados em terapia celular para LME

Ensaio pré-clínicos visando à regeneração da medula espinal após lesão empregaram diferentes tipos celulares, evidenciando-se principalmente as células mesenquimais ou mononucleares coletadas da medula óssea ou periféricamente, células mesenquimais derivadas do cordão umbilical ou do tecido adiposo, células do bulbo olfatório, da cavidade nasal, tecido neurogênico fetal (neuroprogenitores encefálicos) e células de Schwann⁶⁰.

1.4.1 Células-tronco mesenquimais da medula óssea

As células-tronco mesenquimais (MSCs) da medula óssea (BM-MSC) são as células-tronco mais bem caracterizadas em laboratório e clínica. O conceito do estroma medular como nicho hematopoiético surgiu nos anos 1970, com culturas de longa duração descritas em 1977⁶¹. Biologicamente, as BM-MSCs combinam um secretoma neurotrófico e imunomodulador com interação intercelular (por exemplo, N-caderina), favorecendo a regeneração neural⁶²⁻⁶⁴. Apesar de diferentes tecidos fornecerem MSCs com fenótipos “clássicos” semelhantes *in vitro*, o nicho de origem influencia plasticidade, imunogenicidade e velocidade de expansão, o que afeta a reprodutibilidade clínica e dificulta comparações diretas entre estudos.

Na LME, o uso de BM-MSCs melhora desfechos locomotores em roedores (escalas Basso-Beattie-Bresnahan – BBB – e Basso Mouse Scale – BMS) e facilita o crescimento axonal ao longo de feixes astrogliais imaturos⁶²⁻⁶⁴. Em humanos, a crista ilíaca é o sítio padrão de coleta. A aplicação pode ser no epicentro/penumbra da lesão ou em segmentos rostrais/caudais; em ratos, a posição do implante não alterou significativamente a densidade astrocitária⁶⁵. Abordagens de engenharia genética, como a superexpressão do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), aumentam a sobrevivência celular e o potencial terapêutico⁶⁶.

Na prática clínica, as BM-MSCs permanecem entre as células mais testadas para LME, com forte ênfase em segurança⁶⁷⁻⁷⁰. O efeito imunomodulador é promissor, mas persiste variabilidade de produto e de desenho de estudos. A idade do doador pode impactar o

desempenho, e preparações alogênicas (de doador) não são totalmente “imunoprivilegiadas”, exigindo ponderar o uso autólogo *versus* alogênico.

1.4.2 MSCs derivadas do tecido adiposo

As MSCs derivadas do tecido adiposo (AD-MSCs) contornam limitações práticas das BM-MSCs — como coleta mais dolorosa e necessidade de expansão prolongada — porque o tecido adiposo é abundante, de acesso minimamente invasivo e com alto potencial proliferativo⁷¹. O isolamento de células multipotentes de lipoaspirado humano em 2001, com expansão simples, impulsionou o campo⁷². Em cultura, essas células podem ser neuro-instruídas por vias epigenéticas (por exemplo, desmetilação em elementos regulatórios de Nestina), passando a expressar marcadores neuronais e canais iônicos dependentes de voltagem^{73,74}.

Em modelos de LME, o transplante autólogo de AD-MSCs melhorou a marcha (escala BBB) e reduziu cavitações medulares após quatro semanas⁷⁵. Em relação ao seu mecanismo de ação, associam-se à imunomodulação (atenuação da astrogliose reativa e aumento de citocinas anti-inflamatórias) e à maior resistência ao estresse quando pré-condicionadas (por exemplo, com peróxido de hidrogênio em baixa dose), com ganhos funcionais e histológicos^{76,77}. Em humanos, um estudo intratecal autólogo (14 pacientes) não observou eventos adversos graves e melhora sensitiva em parte dos casos, com estabilidade do volume de lesão à ressonância magnética (RM)⁷⁸. Revisões de ensaios clínicos de LME com MSCs corroboram esses sinais de segurança clínica.

Os ensaios clínicos são em geral não randomizados. Fatores como sensibilidade a fármacos locais (por exemplo, anestésicos) e heterogeneidade do tecido de origem podem afetar a qualidade do produto celular. Por outro lado, a logística favorável e o perfil de segurança mantêm as AD-MSCs como candidatas viáveis, sobretudo no cenário autólogo.

1.4.3 MSCs do cordão umbilical e da membrana amniótica

As MSCs do cordão umbilical (UC-MSCs) — obtidas da geleia de Wharton, do tecido do cordão, dos vasos ou do sangue de cordão — e as células amnióticas (A-MSCs, mesenquimais, ou AECs, epiteliais) têm coleta não invasiva, alto rendimento e baixa imunogenicidade⁶²⁻⁶⁴. Além disso, minimizam problemas relacionados à senescência de doadores idosos. Do ponto de vista funcional, exercem imunossupressão (por exemplo, sobre

linfócitos T e a maturação de monócitos) e secretam interleucinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4) e fatores tróficos como os fatores de crescimento de queratinócitos (KGF), hepatócitos (HGF) e epidérmico (EGF)^{66,71}. A literatura também ressalta que MSCs de nichos distintos podem divergir biologicamente *in vivo*, influenciando expansão e cultura, dificultando comparações diretas^{68,79,80}.

Na LME, UC-/A-MSCs favorecem preservação tecidual, redução de astrogliose (cicatriz glial) e melhora locomotora em roedores. Em modelo contusivo, UC-MSCs derivadas de rato sustentaram melhora por ≥ 14 semanas sem imunossupressão⁶⁵. Outro diferencial é a possibilidade de bancos alogênicos “off-the-shelf” (estoque pronto para uso) que encurtam o tempo até a terapia na fase subaguda e aumentam a consistência do produto^{64,65}. Fora da LME, há interesse clínico em doenças hepáticas, lúpus eritematoso sistêmico, artrite, traumatismo crânioencefálico (TCE) e acidente vascular cerebral (AVC)⁶².

Permanece incerto qual porção do cordão umbilical oferece células com o melhor perfil terapêutico⁷². Embora o banco alogênico aumente a disponibilidade de células-tronco, são necessários controles genômicos do doador e vigilância imunológica, pois, como outras MSCs, essas preparações podem induzir resposta imune no cenário alogênico.

1.4.4 Células epiteliais amnióticas

As AECs, derivadas da membrana amniótica junto às A-MSCs, possuem perfil imunomodulador, baixo risco tumoral e capacidade de diferenciação em linhagens neurais e não neurais. Estudos pré-clínicos demonstraram preservação tecidual e recuperação funcional em modelos de LME, com vantagens logísticas pela coleta não invasiva e abundância. No entanto, a experiência clínica ainda é restrita e permanece em fase exploratória⁸¹.

1.4.5 Células progenitoras neurais (NPCs / NSCs)

As células progenitoras neurais (NPCs) também conhecidas como células-tronco neurais (NSCs), obtidas de tecido fetal, regiões neurogênicas adultas ou derivadas *in vitro* da diferenciação de células-tronco, possuem potencial para criar pontes funcionais na região lesada do nervo, tanto por regeneração estrutural quanto por secretar fatores tróficos que modulam o microambiente da lesão favorecendo remielinização e suporte trófico aos neurônios lesados. Ensaios clínicos iniciais em pacientes com LME demonstraram segurança, mas eficácia funcional limitada, reforçando seu status de terapia ainda experimental⁸².

1.4.6 Células-tronco embrionárias e células pluripotentes induzidas

As células-tronco embrionárias (ESCs) e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) apresentam capacidade de gerar múltiplas linhagens neurais, incluindo neurônios e oligodendrócitos, o que as torna candidatas ao reparo de circuitos lesionados. Contudo, o risco de formação de teratomas, a dificuldade em controlar a diferenciação e, no caso das ESCs, as questões éticas, limitam sua aplicação clínica. Na LME, seguem principalmente em investigação pré-clínica, sem resultados consistentes em ensaios clínicos⁸².

1.4.7 Transplante da mucosa olfatória em bloco

Alguns estudos avaliaram o transplante de fragmentos da mucosa olfatória contendo o neuroepitélio e a *lamina própria* subjacente. Em modelos animais, essa estratégia favoreceu modesta regeneração axonal e melhora locomotora, embora os efeitos não possam ser atribuídos exclusivamente a um único tipo celular. Apesar da simplicidade técnica, a resposta reparativa mostrou-se limitada, e a abordagem não avançou para ensaios clínicos de grande porte⁸³.

A mucosa olfatória é um nicho neurogênico formado por epitélio pseudoestratificado (neurônios olfatórios, células de suporte e basais) e a *lamina propria*, onde também residem outros tipos de células-tronco da mucosa olfatória. Esta arquitetura e o acesso por via nasal, possibilitando coleta pouco invasiva e uso autólogo, sustentam o racional de empregar, de forma conjunta ou alternativa, diferentes populações derivadas da mucosa olfatória em estratégias de reparo neural^{76,84-86}.

1.5 Transplante de células olfatórias

Nas últimas três décadas, grande enfoque tem sido dado às células da bainha olfatória (CBO), um subtipo glial da mucosa olfatória que tem a habilidade *in vivo* de regenerar neurônios olfatórios (NOR) que transitam do sistema nervoso periférico (SNP) ao SNC, passando pela placa cribriforme do nariz⁸⁷. As células-tronco do neuroepitélio e da *lamina propria* que residem na mucosa olfatória⁸⁸ participam deste processo, que ocorre ao longo de toda a vida do indivíduo⁸⁹.

As CBO envolvem e guiam os NOR desde o epitélio da mucosa (no aspecto superior da cavidade nasal) até a camada externa do bulbo olfatório (que é parte do SNC). Após lesão, os NOR degeneram-se e novos neurônios são gerados a partir das células-tronco do epitélio

basal. As células da bainha agem na facilitação e estímulo à re-sinapse na camada glomerular do bulbo olfatório.

O conceito do transplante celular para LME com essas células consiste em utilizar-se dessa propriedade para restabelecer vias neurológicas condutivas. Quando transplantadas ao SNC, conforme já demonstrado em estudos prévios⁹⁰⁻⁹², as CBO promovem crescimento axonal^{83,93}, suporte trófico para células lesionadas^{94,95}, modulação de reações inflamatórias⁹⁶⁻⁹⁸, formação de bainha de mielina^{99,100}, expressão de vários fatores neurotróficos¹⁰¹⁻¹⁰³ e componentes de matriz extra-celular¹⁰⁴, interação com astrócitos reativos^{97,104,105} e neoangiogênese⁹⁶. Ainda, podem ser fagocíticas, eliminando debris celulares e bactérias, o que pode ajudar na limpeza focal após LME^{106,107}. Os resultados funcionais favoráveis após terapias com CBO em modelos animais consistem em uma indicação clara de seu grande potencial^{108,109}. Estas células já foram, inclusive, selecionadas para ensaios clínicos em humanos¹¹⁰.

As CBO podem ser isoladas a partir da camada de fibras nervosas do bulbo olfatório e da *lamina propria* da mucosa olfatória. CBO colhidas na mucosa são mais facilmente obtidas com procedimento menos invasivo para transplante autólogo¹¹¹, enquanto as do bulbo parecem ter maior potencial para neuroregeneração¹¹². CBO do bulbo tem mais capacidade mielinizante que as da mucosa, devido a diferenças de propriedades morfológicas microscópicas entre ambas¹¹³.

A fonte anatômica e a pureza (percentual das células em estudo em relação ao total da amostra) implicam diretamente nos resultados do transplante a ser realizado. Apesar de ser intuitivo que a baixa pureza na amostra de CBO leva a piores resultados e efeitos colaterais, vários estudos mostram que a presença de fibroblastos, por exemplo, pode ser benéfica à terapia^{114,115}. A alta pureza de CBO parece estar associada a melhores resultados, mas purificar e atestar pureza é difícil devido à ausência de marcadores celulares específicos¹¹⁶. Outro fator que influencia o resultado do transplante é a rapidez com que ele é realizado: há maior chance de sucesso se ocorrer antes do influxo inflamatório e da formação de cicatriz glial¹¹⁷.

As CBO de roedores são relativamente fáceis de serem colhidas e cultivadas em cultura, mas o isolamento do equivalente humano tem sido mais desafiador, o que é responsável em grande parte por frear a translação desta terapêutica. CBO de adultos humanos isoladas a partir do bulbo olfatório mostraram capacidade de mielinização de uma lesão persistentemente desmielinizada¹¹⁸ (o que é uma propriedade interessante, haja vista que os NOR não são mielinizados quando residentes em seu estado nativo no sistema olfatório). CBO humanas já foram isoladas de mucosa nasal de mais fácil acesso^{119,120} e imortalizadas em linhagens celulares de laboratório^{121,122}.

As culturas de CBO são preparadas, contudo, sem completa purificação e caracterização, o que leva à expansão populacional de outras células que coexistem na mucosa olfatória. Nenhum estudo até a presente data demonstrou a exequibilidade de crescimento de populações puras de CBO em quantidade suficiente para transplante celular em humanos, sendo os índices de pureza entre 40 e 70%¹²³.

Em meio ao esforço de isolar e cultivar CBO a partir de amostras de tecido de mucosa olfatória nasal humana, foram identificadas células com propriedades similares às de células-tronco e que proliferam rapidamente em cultura. Quando a mucosa olfatória de ratos embrionários foi dissociada e submetida à cultura em suspensão, duas classes de células foram identificadas em esferas formadas em suspensão. Capacidade multipotente foi associada a células olfatórias não epiteliais residentes na *lamina propria* olfatória, expressando marcadores de MSCs, bem como o marcador de progenitor neuroglial nestina e marcadores neuronais e gliais. A segunda classe de células esféricas derivadas do epitélio olfatório era menor e expressava citoqueratina, sendo composta por células epiteliais¹²⁴. O mesmo perfil duplo de células multipotentes, positivo para nestina e marcadores de células-tronco mesenquimais, como observado para o primeiro tipo de esferas, foi corroborado em células da *lamina propria* olfatória de camundongos, ratos e humanos adultos^{76,77}. Denominadas células ectomesenquimais (CE)⁷⁶, elas têm propriedades de reparo tecidual mediadas por efeitos imunorregulatórios, mielinizantes e neurogênicos, o que permite que sejam consideradas terapia multialvo^{76,78,84,125}.

Cultivadas em condições aderentes à placa, as CE proliferam-se rapidamente e expressam marcadores de MSCs. Este componente mesenquimal das CEs foi estudado. Aproximadamente 64% dos microRNAs expressos na população aderente de CEs são expressos em BM-MS. Similarmente a essas células, CE têm propriedades imunossupressoras, levando à manifestação de fenótipo anti-inflamatório mediado por microglia e à supressão da função citotóxica de linfócitos CD8+ e células natural killer. Além disso, as CE também promovem mielinização do SNC *in vitro* através da produção da quimiocina CXCL12 (de maneira análoga às CBO)^{48,126}.

Quando CE humanas foram transplantadas em modelo animal (rato) para lesão cervical crônica, a análise da marcha revelou uma recuperação precoce da coordenação entre membros dianteiros e traseiros, comparado aos controles¹²⁷. Essa melhora esteve associada à redução no tamanho da lesão e à remielinização aumentada na topografia ventral e lateral da substância branca, onde residem as fibras pertinentes à locomoção. Outros estudos também atestaram o potencial regenerativo das CE, em modelos animais (com ratos) de perda auditiva¹²⁸

e lesões hipocampais¹²⁹. Nesses casos, evitou-se perda auditiva e restauraram-se habilidades de aprendizado e memória, respectivamente.

Existem notáveis vantagens de se trabalhar com CE, devido principalmente à facilidade de coleta no tecido nasal e à habilidade dessas células serem rapidamente expandidas em cultura, gerando quantidades adequadas ao transplante em lesões humanas. Essa praticidade fornece larga vantagem às CE ante as CBO, cujas condições de crescimento e purificação carecem de otimização. Há vantagens sobre as BM-MSCs também, que crescem mais vagarosamente e tampouco são capazes de remielinizar o SNC lesado⁴⁸.

Em comparação a MSCs de outros nichos, as CE exibem imunomodulação e secretoma neurotrófico particularmente úteis no manejo da LME. Demonstram maior taxa proliferativa e capacidade neurogênica em relação às BM-MSCs, além de modular a resposta imune, suprimindo a expansão de linfócitos T e promovendo diferenciação de células T reguladoras^{130,131}. Essas propriedades sugerem aplicações não apenas no reparo neural, mas também em doenças autoimunes.

Dados experimentais em roedores e coelhos confirmam viabilidade e plasticidade das CEs, mesmo após criopreservação, além de diferenciação em linhagens neurais e não neurais (neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, adipócitos, osteócitos e mioblastos)^{132,133}. Em modelos de reparo neural, essas células favorecem a neurogênese, a remielinização e a integração sináptica¹³⁰.

Abordagens com biomateriais, como hidrogéis de base sintética, mostraram que as CEs sobrevivem e proliferam no microambiente implantado, contribuindo para recuperação motora e sensitiva após hemissecção medular em ratos¹³⁴. Esses achados reforçam o potencial de uso combinado de células e suportes artificiais na LME.

No contexto clínico, ainda faltam ensaios específicos avaliando diretamente CEs em LME. No entanto, revisões de transplantes celulares em humanos indicam que células derivadas da mucosa olfatória, em geral, apresentam bom perfil de segurança, embora os resultados funcionais ainda sejam heterogêneos e sem comprovação de superioridade em relação a BM-MSCs ou outros tipos celulares^{15,60}. Assim, o cenário mais promissor para essas células envolve sua integração em estratégias multimodais — combinando biomateriais, neuromodulação e reabilitação intensiva — para potencializar a regeneração¹⁵.

A subpopulação com características ectodérmicas das CEs foi pouco explorada. Como originalmente relatado por Tomé et al. (2009)¹²⁴, as células dessa subpopulação são isoladas da população aderente pelo cultivo sob condições não aderentes, que seleciona neuroprogenitores mantidos *in vitro* como esferas de células em suspensão.

1.6 O roedor como modelo experimental

A utilização de camundongos e ratos como modelos experimentais traz vantagens claras com relação a outros modelos com animais maiores. Estes animais têm custo mais baixo aos laboratórios por serem de fácil criação, demandam menos cuidados diários e são de fácil manipulação¹³⁵.

A cavidade nasal de roedores é uma estrutura anatômica com múltiplas funções relacionadas aos sistemas respiratório e olfatório. Além de aquecer, umedecer e filtrar o ar inspirado, direcionando-o corretamente para as vias aéreas, é nesta estrutura que as moléculas odorizadas atingem os receptores olfatórios¹³⁶. A região olfatória da cavidade nasal, revestida pela correspondente mucosa olfatória, está presente em um recesso olfatório, no aspecto mais caudal da cavidade, e é ventilada pelo fluxo inspiratório¹³⁷.

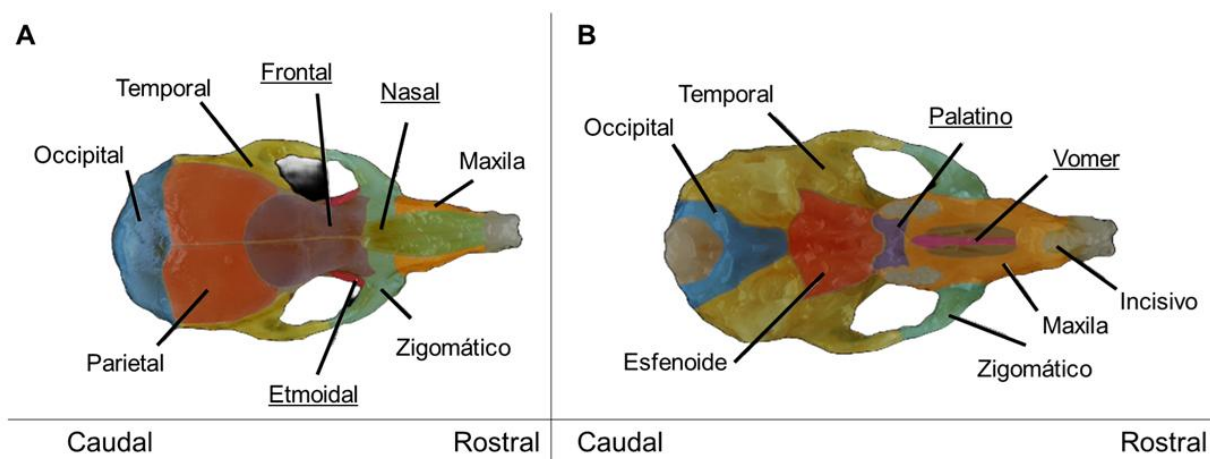
O nariz desempenha um papel crucial na função olfatória dos roedores. Estes são animais macrosmáticos, isto é, animais dotados de alta precisão olfatória. A região onde se distribuem os receptores olfatórios é maior (em relação a animais não-macrosmáticos) e as turbinas têm maior complexidade arquitetural¹³⁸.

Externamente, a região mais cranial do nariz é conhecida como *rhinarium* e consiste em dois orifícios naturais chamados narinas (*nares*), orientadas caudolateralmente e separadas pelos tubérculos nasais. Estes, divididos entre si pelo recesso mediano (*sulcus medianus*) ou *philtrum*, são proeminentes e contêm pequenas cristas que compõe um conjunto particular de cada indivíduo.

Na porção mais cranial da *rhinaria*, as narinas adotam forma semi-circular e são cobertas lateral e dorsalmente pelas pregas alares. Caudalmente, há um estreitamento e, através de uma fenestração, acessa-se a cavidade nasal¹³⁹.

As características macroscópicas da cavidade nasal (*Cavum nasi*) do rato e do camundongo são idênticas. Ela se estende desde as narinas até a nasofaringe e é composta por duas câmaras simétricas e idênticas divididas pelo septo nasal (*Septum nasi*). A porção cartilaginosa do septo (*Cartilago septi nasi*) é mais cranial e se articula diretamente com as cartilagens das narinas. A porção óssea (*Septum nasi osseum*), menor, se encontra na parte mais caudal da cavidade e se articula ventralmente com o vomer (*Vomer*), caudalmente com o osso etmoidal (*Os ethmoidale*), ventrocaudalmente com o osso palatino (*Os palatinum*), e dorsalmente com os ossos frontal (*Os frontale*) e nasal (*Os nasale*) (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama ilustrativo dos ossos do crânio de um roedor. (A) Vista dorsal do crânio. (B) Vista ventral do crânio com a mandíbula removida. O crânio foi preparado a partir de um camundongo de 40 dias de idade. Ossos individuais estão coloridos para melhor visualização. Os ossos que definem a porção óssea da cavidade nasal estão identificados sublinhados: dorsalmente os ossos frontal e nasal, ventralmente o vômer, caudalmente o osso etmoidal e ventrocaudalmente o osso palatino.



Fonte: Modificado de Dunston et al. (2013)¹⁴⁰.

Imediatamente rostral à nasofaringe, nota-se uma abertura no septo nasal que consiste em uma comunicação ventral entre ambas as câmaras. A cavidade nasal é dividida em quatro regiões, de rostral a caudal: o vestíbulo, a válvula nasal ou óstio, a câmara nasal e a nasofaringe¹⁴¹.

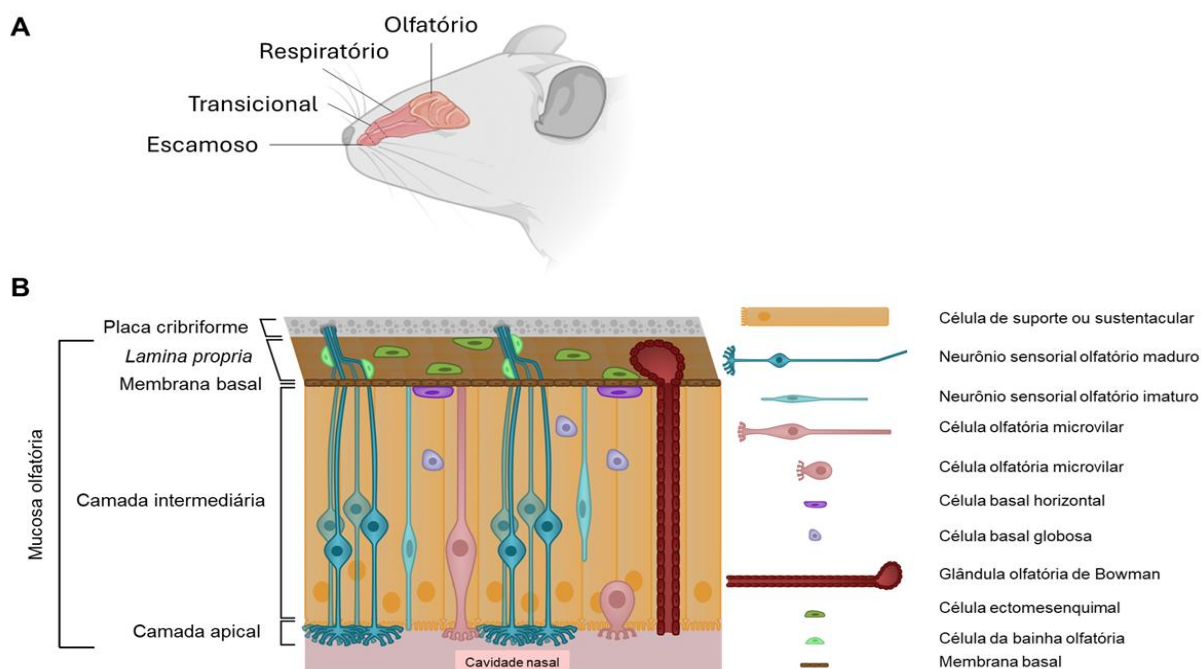
Nos roedores, a mucosa olfatória é restrita a um recesso localizado em topografia caudal e dorsal da cavidade nasal. A lâmina transversa (*Lamina transversa*) é o osso que separa a porção cranial da nasofaringe e divide o fluxo de ar em respiratório (ventralmente) e olfatório (dorsalmente, no mencionado recesso). Ao contrário de outras espécies de mamíferos, os roedores respiram somente pelo nariz. A fração do ar inspirado que alcança a região olfatória corresponde a 20%. A região olfatória é protegida de fluxo de ar direto pela lâmina transversa, sendo abastecida com partículas em suspensão¹⁴².

Na cavidade nasal, encontram-se quatro tipos de epitélio desde o vestíbulo até a nasofaringe: escamoso, transicional, respiratório e olfatório (Figura 2A). Cada um deles apresenta grande especialização e vários subtipos celulares. O epitélio olfatório cobre a maior porcentagem da cavidade nasal nos roedores, alcançando até 50% de sua área, e isso se reflete diretamente na grande capacidade olfatória desses animais. Esse tecido se estende pelo terço caudal e dorsal do septo nasal, por partes das turbinas nasais e maxilares, pela região caudal e lateral da parede nasal e também pela parte dorsal das turbinas etmoidais¹⁴³.

A mucosa olfatória consiste no epitélio olfatório propriamente dito e a *lamina propria* adjacente. Ela é composta por três tipos celulares: neurônios olfatórios sensoriais (subdivididos em maduros e imaturos), células de sustentação e células basais (subdivididas em células basais globosas e células basais horizontais)¹³³. Na *lamina propria*, encontram-se as CE (Figura 2B)¹⁴⁴.

Uma revisão sobre a anatomia da cavidade nasal do rato é apresentada no Anexo A desta tese.

Figura 2 – (A) Ilustração da distribuição e tipos de epitélios (escamoso, transicional, respiratório e olfatório) na cavidade nasal do rato. (B) Ilustração da mucosa olfatória, constituída pelo próprio neuroepitélio olfatório (camadas apical e intermediária) e pela lâmina própria adjacente, separados por uma membrana basal. A placa cribriforme e a cavidade nasal estão posicionadas na parte superior e inferior da figura, respectivamente. Células da bainha olfatória e células ectomesenquimais são retratadas na lâmina própria, bem como no ácino da glândula de Bowman olfatória. Os axônios dos neurônios sensoriais olfatórios se reúnem em feixes de nervos olfatórios que atravessam a lâmina própria e a placa cribriforme. As células do ducto da glândula de Bowman, bem como células de suporte sustentaculares e microvilares, e neurônios são vistos no neuroepitélio, onde suas células progenitoras (células basais globosas e horizontais) também são observadas.



Fonte: (A) Criado com biorender.com. (B) Araujo e Haddad (artigo ainda não publicado).

O sistema olfatório periférico é capaz de se recuperar quando lesionado, como mencionado anteriormente, incluindo reconstituição do epitélio olfatório, regeneração celular

neurosensorial e reinervação do bulbo olfatório, em particular devido à contínua exposição a substâncias irritativas e danosas. A renovação celular e a neurogênese associada é mantida pela presença de células basais progenitoras, sinalização inflamatória e, como descoberto mais recentemente, pelo papel das CE¹⁴⁵.

Os roedores apresentam-se como animais muito apropriados para modelos experimentais, principalmente os ratos. Kjell e Olson (2016)¹⁴⁶ fizeram longa revisão da patologia envolvida nos modelos de lesão medular traumática e nos potenciais tratamentos desenvolvidos a partir de experimentos que se baseiam nessa linha. Apesar de grande semelhança e paralelos bem definidos entre os modelos de roedores e os humanos, os autores destacaram que existem limitações a serem superadas para o aprimoramento desses modelos, como as dificuldades de manipulação genética dos ratos e também à incongruência de tamanho relativo aos humanos, o que dificulta o entendimento sobre os mecanismos de regeneração axonal em longas distâncias (sendo um reflexo disso o tempo de recuperação pós lesão, que em humanos oscila entre 6-12 meses aproximadamente e nos ratos, 6-8 semanas).

1.7 Conceito da pesquisa

Diferentes materiais têm sido empregados como matrizes em combinação com células-tronco para avaliar a recuperação motora de lesões na medula espinal em modelos animais¹⁴⁷⁻¹⁵². Matrigel® (Corning) é um produto da purificação da membrana basal extraída do sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm do camundongo — um tumor rico em proteínas da matriz extracelular, incluindo laminina (seu principal componente), colágeno tipo IV, proteoglicanos de heparan sulfato, entactina/nidogênio e diversos fatores de crescimento¹⁵³. Ele promove a diferenciação de diferentes tipos celulares e a manutenção de células diferenciadas a partir de explantes de tecido. Linhagens celulares primárias e estabelecidas apresentam um fenótipo mais diferenciado em contato com Matrigel®, ao aumentar o contato célula-célula e a agregação celular¹⁵⁴.

Um estudo recente, desenvolvido pela equipe do Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de São Paulo (USP), demonstrou que Matrigel®, com ou sem células de neuroesferas não diferenciadas, associa-se, a partir do final da segunda semana pós-operatória, à melhora funcional em ratos com contusão moderada da medula espinal ao nível torácico (T8/T9). Como primeira abordagem do nosso grupo de pesquisa nessa área de terapia celular para lesões raquimedulares, optou-se pelo cultivo de

neuroesferas a partir do tecido cérebro-cortical de ratos neonatos, padrão-ouro para transplante de neuroesferas, apesar de seu acesso restrito. O efeito foi superior quando, no enxerto imediatamente após lesão, Matrigel® foi combinado a células não diferenciadas de neuroesferas. Quando neuroesferas em início de diferenciação neuronal foram enxertadas, os efeitos motores foram inferiores aos do Matrigel®. Esses dados corroboraram a literatura em relação a: (i) Matrigel® por si tem um efeito reparador; e (ii) neuroesferas indiferenciadas têm efeitos superiores para regeneração tecidual aos daquelas que iniciaram a diferenciação neuronal antes do transplante¹⁵⁵.

Buscando atenuar ao máximo o devastador impacto na qualidade de vida de vítimas de lesão da medula espinal^{156,157}, a pesquisa sobre o tema deve ser mais amplamente explorada. A padronização de modelos animais experimentais suscitará terapêuticas futuras e reprodutibilidade de achados. Valendo-se desta motivação e do mais fácil acesso à mucosa olfatória, a linha geral do projeto consiste em isolar CEs a partir da dissociação da mucosa olfatória, expandi-las *in vitro* em suspensão como neuroesferas e então transplantá-las ao sítio de LME.

2 OBJETIVOS

2 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a ação das células-tronco oriundas da mucosa olfatória de ratos *Wistar* adultos (células ectomesenquimais) quando instiladas em meio de Matrigel® (veículo gelatinoso que mantém as células na localização pretendida de forma mais consistente), por via aberta e em aplicação única, imediatamente após a lesão contusiva de medula espinal em ratos *Wistar* adultos.

Os objetivos específicos foram:

- a) Aprimorar técnica de dissecação para isolamento do septo nasal de rato;
- b) Padronizar condições de cultivo celular para obtenção *in vitro* de neuroesferas a partir de CEs da *lamina propria* do epitélio olfatório de ratos;
- c) Comparar a função motora de animais submetidos ao procedimento cirúrgico, baseada na escala BBB e na marcha em plano horizontal, entre grupos experimentais e ao longo do período pós-operatório;
- d) Comparar parâmetros histológicos da medula espinal obtida da necrópsia dos animais seis semanas após o procedimento cirúrgico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os primeiros estudos experimentais que vislumbram entender a lesão neurológica medular datam do século XIX. Schmaus (1890)¹⁵⁸ estuda a lesão medular e as alterações dela decorrentes em modelo experimental utilizando coelhos.

Allen (1911 e 1914)^{159,160} elabora um método de lesão experimental medular em cães baseado em contusões medulares a partir da queda de objeto sobre a medula. Ele descreve qualitativamente as diferentes gravidades de lesão proporcionalmente à massa que era solta sobre a medula. Descreve ainda que a pressão exercida sobre a medula por hemorragia e edema elevavam a necrose tecidual pós-traumática e que o alívio desta pressão proporcionava melhora clínica.

McVeigh (1923)¹⁶¹ elabora um modelo experimental com lesão por pressão digital direta na medula de cães e descreve a progressão temporal do edema medular após a lesão, que se instala principalmente oito horas após o evento e progride até o segundo dia.

Tarlov et al. (1953)¹⁶² estudam a perda e a recuperação neurológicas em cães submetidos à compressão medular gradativa com uso de balão inflável extradural. Eles apresentam um método de avaliação funcional após lesão e conclui que os ganhos neurológicos pós-traumáticos têm relação direta com o tempo de compressão a que a medula foi submetida.

Ducker e Hamit (1969)¹⁶³ avaliam a resposta a tratamentos após lesão medular provocada pela incidência de 25g a partir de 15cm de altura na medula de cães. A melhor recuperação neurológica pós-traumática ocorreu nos indivíduos que receberam hipotermia local e corticoide (dexametasona) por via intramuscular.

Holdsworth (1970)¹⁶⁴ estuda centenas de pacientes paraplégicos ou tetraplégicos pós-traumáticos e enuncia noções anatômicas, de imagem e de diagnóstico da lesão neurológica. Reforça o conceito de lesão medular incompleta nos casos que há sensibilidade sacral e função motora distal à lesão e faz ressalva quanto ao emprego da laminectomia no tratamento destes pacientes por observar o desenvolvimento de deformidades pós-cirúrgicas e limitação no retorno às funções motoras e sensitivas.

Ducker et al. (1971)¹⁶⁵ estudam de modo prospectivo e randomizado um grupo de 32 macacos *Rhesus* submetidos a lesões medulares traumáticas por incidência de massas de 10 a 25 gramas a partir de altura de 20cm na medula torácica. Houve separação em grupos de animais com lesão aguda e subaguda, e estudo subsequente histológico *post mortem* e também funcional. Os pesquisadores estabelecem gradação qualitativa para os achados de microscopia: leve, moderado, grave. Os achados para os animais que sofreram lesão aguda incluíam edema,

hemorragia e hematoma. Nos animais com lesão subaguda, identificam-se, além desses achados, necrose, desmielinização e deformidade vascular. Avaliam funcionalmente os animais em 4 gradações, que variavam desde paraplegia completa à plena capacidade funcional para marcha. O estudo postula que não havia paralelo definido entre as alterações patológicas e o status clínico, pois à medida que a patologia tecidual poderia progredir, o animal poderia apresentar simultaneamente melhora clínica. Ainda, define-se que quanto mais central for o dano medular, menor o agravo funcional estaria presente, e vice-versa.

Fairholm e Turnbull (1971)¹⁶⁶ estudam modelo de lesão medular experimental usando coelhos e cães, também com contusão de objeto em queda a partir de altura pré-determinada. Analisam a vascularização das lesões em análises *post mortem*, delimitando as zonas de lesão da medula espinal e concluem que a recuperação neuronal depende da preservação da microcirculação.

Dohrmann e Panjabi (1976)¹⁶⁷ criam um modelo padronizado de lesão medular (no nível T5-T6) com aparelho que liberava diferentes massas a partir de diferentes alturas dentro de um tubo plástico com haste interna, de modo que todos gerassem um trauma de 400 g-cm sobre a medula. Postulam que a quantidade de energia transferida para o tecido era diretamente dependente de fatores como velocidade, massa e altura.

Yeo et al. (1976)¹⁶⁸ estudam modelo experimental de lesão medular controlada em ovelhas e comparam parâmetros histológicos de grupo controle e grupo que recebeu tratamento com oxigênio hiperbárico. Há melhora mais relevante na motricidade e na regeneração tecidual no grupo tratado com a intervenção com oxigênio hiperbárico, sugerindo que a isquemia tem papel razoável na composição do quadro sequelar.

Balentine (1978)¹⁶⁹ estuda modelo de lesão medular experimental em ratos adultos e analisa a evolução temporal da necrose que acomete substâncias branca e cinzenta após o trauma. Ele postula que a necrose decorre da ruptura de veias e artérias quando do trauma.

Tator e Rowed (1979)¹⁷⁰ descrevem que raramente o trauma espinal causa transecção anatômica da medula, embora isso não seja necessário para parada completa ou incompleta das funções neurológicas. Os pesquisadores descrevem as fases de lesão medular como primária, logo após o trauma, e secundária, com os efeitos deletérios da isquemia persistente. Postulam que o tratamento da fase aguda iria dirimir os efeitos de infarto secundário, e colocam o corticosteroide como ferramenta útil nesse contexto.

De la Torre (1981)¹⁷¹ escreve artigo de revisão em que detalha o progresso dos 25 anos anteriores à publicação no campo dos estudos da lesão medular. Analisa os avanços como a neurofisiologia e o potencial evocado, e traz luz à aplicação da ciência básica na regeneração

axonal. A sobrevivência de células fetais e a presença de fatores de crescimento consolidam-se como promotores de regeneração neurológica, ainda que timidamente.

Hall et al. (1984)¹⁷² realizam estudo com 25 gatos adultos submetidos à contusão medular. Após a lesão, objetivam estudar o fluxo sanguíneo neurológico e os gatos foram separados em 4 grupos: controle, infusão de 15 mg/kg de metilprednisolona, infusão de 30 mg/kg de metilprednisolona e infusão de 60mg/kg de metilprednisolona. Aqueles que receberam 30 mg/kg de corticoide mantiveram o fluxo sanguíneo dentro dos padrões de normalidade, enquanto os que receberam a dose menor, tiveram menos benefícios e os que receberam dose maior, nenhum benefício. Concluem que a dose de 30mg/kg diminui a isquemia medular pós-traumática.

Noble e Wrathall (1987)¹⁷³ desenvolvem um modelo de aparelho para provocar lesão experimental por contusão medular em ratos, a partir da queda de objeto de altura predeterminada. Utilizam fixadores nos processos espinhosos adjacentes ao nível de interesse para lesão e buscaram reduzir os fatores variáveis que poderiam, porventura, produzir lesões assimétricas. O efeito de amortecimento dissipador de energia do arcabouço torácico foi reduzido.

Nockels e Young (1992)¹⁷⁴ estudam estratégias farmacológicas de tratamento de lesão medular aguda e crônica. Notam que, na fase crônica, a mielina apresenta fatores inibidores da regeneração axonal, sendo o bloqueio desses fatores um possível alvo terapêutico.

Basso et al. (1995)¹⁶ estudam a progressão da funcionalidade pós lesão medular em ratos, estabelecendo uma escala locomotora que modifica aquela proposta por Tarlov em 1953. A escala se mostra válida como medida preditiva da recuperação motora, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais em decorrência de distintas lesões e de inferir as alterações patológicas no centro da lesão. A variedade de testes realizados com examinadores treinados mostrou que é possível obter consistência na obtenção de resultados.

Basso et al. (1996)¹⁷⁵ utilizam um instrumento de impacto da *New York University* para avaliar a constância na reprodutibilidade de lesões medulares em ratos adultos. Essa característica é importante na confecção de modelos experimentais pois permite maior fidelidade na avaliação de desfechos. Neste estudo, contundem a medula com uma haste de 10g liberada a partir de alturas diferentes e avaliaram desfechos funcionais utilizando a escala por eles desenvolvida (escala BBB – Basso, Beattie e Bresnahan). Comparam ratos que sofreram contusão medular seguida de transecção com ratos que sofreram apenas transecção. O grupo de ratos que sofreu contusão primariamente apresentou melhor evolução funcional, especialmente com alturas menores como 6.25mm, 12.5mm e 25mm. Postulam que quanto mais poupados

forem os tratos descendentes, ainda que por algum tempo (antes de eventual transecção), melhores as chances de recuperação motora.

Bregman et al. (1997)¹⁷⁶ realizam estudo experimental utilizando ratos adultos submetidos a hemissecção da medula cervical e torácica e que recebem transplante, para o sítio da lesão, de tecido medular fetal juntamente a fatores neurotróficos. Atribuem a estes fatores o aumento das interações entre as células neuronais hospedeiras e transplantadas, e observam que os efeitos disso decorrentes, como aumento da extensão do crescimento axonal das células transplantadas, levam à melhora, mesmo que limitada, da função motora.

Ramon-Cueto et al. (1998)¹⁷⁷ estudam os efeitos da terapia celular em ratos adultos submetidos à lesão medular traumática. O objeto do interesse dos pesquisadores é o tecido glial do bulbo olfatório, já que diferentemente do restante do SNC nos mamíferos adultos, este tecido permite e realiza a regeneração axonal. A presença de células gliais é o diferencial do bulbo olfatório, e sua aplicação em transplante para o sítio lesional mostrou integração e crescimento neuronal à longa distância. Os pesquisadores concluem que este achado criaria possibilidades de tratamento para lesões do SNC.

Rodrigues (1999)¹⁷⁸ padroniza modelo de lesão experimental medular em ratos Wistar adultos, utilizando equipamento eletrônico para geração do trauma a partir dos parâmetros estabelecidos pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)*. Estabelece relação estatisticamente significativa entre os parâmetros mecânicos e o volume de lesão e conclui que seu modelo é capaz de gerar padrões de lesões em ratos.

Yoon et al. (1999)¹⁷⁹ verificam que a infusão de metilprednisolona a 30 mg/kg, realizada após 10 minutos de trauma medular em ratos pelo NYU impactor, é capaz de reduzir importantemente o volume lesional em 24 horas, em comparação a grupo controle. Blight e Zimmer (2001) reforçam que não há drogas que atuem diretamente sobre a lesão medular, sendo o grande ponto de interferência a cascata da lesão secundária. Nesse aspecto, enfatizam a metilprednisolona como droga de escolha.

Cristante et al. (2002)¹⁸⁰ realizam estudo experimental prospectivo com 20 ratos adultos. Destes, 15 sofreram lesão medular traumática e receberam transplante de células de sistema nervoso fetal no sítio lesional. Os cinco animais restantes foram considerados grupo controle, tendo sofrido lesão mas não recebido transplante celular. Transcorridas 48 horas do trauma, há sacrifício dos animais e realização de exame histológico. Em 60% dos casos, permaneceram viáveis as células exógenas, e a reação inflamatória local mostrou-se mais intensa comparativamente ao grupo controle.

Marcon (2006)¹⁸¹ desenvolveu estudo experimental de lesão medular em ratos *Wistar*, usando o modelo de queda de massa *NYU impactor* e a escala BBB para avaliação funcional pós-traumática. A premissa do estudo é avaliar o possível efeito benéfico da metilprednisolona infundida previamente à lesão. Não se observam efeitos benéficos desta intervenção e ainda descrevem as complicações a ela associadas.

Cristante et al. (2009)¹⁸² infundem células-tronco coletadas no sangue periférico desdiferenciadas autógenas em sítio lesional, com auxílio de arteriografia, em pacientes com lesão medular crônica. Ao longo de dois anos e meio de seguimento, observam que dois terços dos pacientes apresentam melhores respostas na avaliação com potencial evocado somatossensitivo.

Lindsay et al. (2010)⁸², em um estudo fundacional do tema que versamos nesta tese, trazem à luz da discussão o papel da mucosa olfatória e, particularmente, das células da bainha olfatória como protagonistas na estratégia de reparo do tecido neurológico a partir de seu uso em transplante. Eles frisam que o papel neuroprotetor das células gliais da bainha olfatória estão bem estabelecidos, bem como o auxílio à regeneração axonal e remielinização axonal. Entretanto, de modo interessante, postulam que a mucosa olfatória é um tecido complexo e heterogêneo, em que há vários tipos celulares que poderiam, inclusive, atuar na sua capacidade regenerativa, além das células da bainha olfatória. Este estudo ainda estabelece que existe um paralelo de equivalência quanto aos tipos celulares presentes na mucosa olfatória de roedores e humanos.

Centenaro et al. (2011)⁸³ estudam os efeitos do transplante da *lamina propria* dos epitélios olfatório e respiratório em ratos *Wistar* adultos submetidos à transecção medular. O epitélio olfatório contém células gliais da bainha olfatória, creditadas, então, pela capacidade regenerativa axonal do tecido olfatório. O epitélio respiratório é desprovido dessas células. Os pesquisadores procuraram entender o quanto a presença destas células promoveria melhora em termos funcionais em comparação ao transplante do epitélio respiratório. Adicionalmente, testam o transplante em três janelas de tempo distintas: agudamente, duas semanas após lesão e quatro semanas após lesão. A análise funcional utiliza a escala BBB.

Neste estudo, o resultado funcional foi muito similar ao longo das 12 semanas de análise dos animais, em ambos os grupos, havendo discreta melhora motora ao final do estudo. As diferentes janelas de tempo para o transplante também pouco influenciaram nos resultados analisados. Os pesquisadores concluem que as células da bainha olfatória não são uma panaceia para a terapia celular nos casos de lesão pós-traumática da medula, e que elas são apenas um dos tipos celulares presentes no epitélio olfatório, que, por sua vez, compartilha uma arquitetura

celular complexa com o epitélio respiratório (como células de Schwann, endotélio, fibroblastos intersticiais, células residentes imunológicas, entre outras).

Rui et al. (2017)¹³¹ tecem comentários sobre o papel das células mesenquimais como estratégia de terapia celular, abordando suas propriedades regenerativas e também de modulação imunológica. Comentam que as células mesenquimais são originalmente encontradas na medula óssea, mas que uma linhagem promissora de células, subtipos do grupo mesenquimal, as chamadas células ectomesenquimais (distribuídas na *lamina propria*) do epitélio olfatório emergiam como promissoras para uso em terapia celular. Os autores ponderam, entretanto, que os benefícios e aplicações ainda carecem de validações e estudos adicionais.

Lindsay et al. (2017)¹²⁷ conduzem estudo experimental em que transplantaram células ectomesenquimais de epitélio olfatório humano para sítio lesional crônico de lesão medular cervical incompleta de roedores. Os pesquisadores observam remielinização e melhor coordenação de membros dianteiros e traseiros na marcha dos sujeitos de pesquisa que receberam a terapia celular. Outras avaliações realizadas, como a escala BBB, não mostraram diferenças significativas entre grupos controle e intervenção.

Jaloux et al. (2022)¹⁸³ realizam estudo experimental em que isolaram células ectomesenquimais a partir de biópsias nasais de indivíduos humanos, reconhecendo suas características de células-tronco mesenquimais e neurais. Após sucesso na definição de protocolo de coleta e cultivo, utilizaram as células para caracterizar seu uso na diferenciação de células neuronais, com sucesso.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no LETRAN do IOT-FMUSP. O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Genômica Funcional do Instituto de Biociências (IB) da USP, São Paulo.

4.1 Aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais

Esta pesquisa foi aprovada para ser desenvolvida, conforme parecer emitido pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA, FMUSP) em reunião de 10/03/2021. O estudo foi registrado por esta Comissão sob o número 1600/2020 (Anexo B).

4.2 Animais

Os animais deste estudo foram provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP, onde há rígido controle sanitário, minimizando a chance de prevalência de doenças. A manipulação dos animais foi realizada por técnico experiente, devidamente treinado, vinculado ao LETRAN do IOT, FMUSP.

Toda a pesquisa foi realizada de forma ética segundo as normas de cuidados e experimentação animal, estabelecidos pela *Canadian Council on Animal Care* (CCAC)¹⁸⁴ e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)¹⁸⁵.

Para cultivo celular, foram utilizados 12 ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 gramas e com idade entre 6 e 8 semanas, em quatro experimentos distintos.

Para o procedimento cirúrgico, avaliaram-se 60 ratos Wistar. No momento da recepção, todos os ratos foram avaliados quanto às condições gerais (pelagem e estado clínico normais) e à motricidade (motricidade normal), condições para inclusão no estudo.

Cada gaiola (40 x 60 cm) acondiciona até cinco ratos de uma mesma ninhada, em ambiente climatizado, sob condições de higiene, alimentação e hidratação adequadas no LETRAN (IOT, FMUSP).

4.3 Material

Foi empregada a matriz de membrana basal, reduzida em fatores de crescimento, referido como Matrigel® (Corning, Merck KGaA, Alemanha). Matrigel® é um composto resultante da solubilização da membrana basal do sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de

camundongo, enriquecido em componentes da matriz extracelular, notadamente laminina. O composto é líquido a 4°C e gelifica à temperatura ambiente^{153,154}.

GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) foi usado como marcador de astrócitos, por marcar astrogliose reativa após lesão medular, com aumento em astrócitos próximos ao sítio lesional, poucas horas após a lesão podendo durar várias semanas. À imunoistoquímica, a marcação fortemente positiva de GFAP indica a presença de astrócitos reativos¹⁸⁶. O anticorpo anti-GFAP (GA524, DaKo, Agilent) foi gerado em coelho e reconhece o epítipo de mamíferos.

CD11B (*Integrin alpha M / Mac-1*) foi empregado como marcador da ativação precoce e sustentada da microglia e macrófagos, pois é aumentado após lesão medular. Marcador de neuroinflamação e peça-chave na fagocitose, liberação de citocinas, *clearance* de debris de mielina e de células apoptóticas, crucial em processo regenerativo. Sua expressão aumenta um dia após a lesão, atingindo pico em 3 a 7 dias após o evento. À imunoistoquímica, o aumento de marcação de CD11B ao redor do sítio lesional indica a presença de microglia e macrófagos ativados¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. O anticorpo anti-CD11B (clone M1/70, ab8878, Abcam) foi gerado em rato e reconhece o epítipo humano e de roedores.

Olig1 (*Oligodendrocyte transcription factor 1*) foi utilizado como marcador de células precursoras de oligodendrócitos e de oligodendrócitos imaturos. Este marcador está ligado à diferenciação e maturação de oligodendrócitos, e apresenta expressão aumentada após lesão medular promovendo remielinização. Está expresso em células da substância branca próxima à lesão¹⁹⁰⁻¹⁹². O anticorpo anti-Olig1 (O1) (clone 59, MAB344, Chemicon, Merck KGaA, Alemanha) foi gerado em camundongo e reconhece o epítipo de mamíferos e aves.

Olig2 (*Oligodendrocyte transcription factor 2*) foi empregado como marcador de células da linhagem madura de oligodendrócitos. Atua como fator de transcrição crítico para a maturação dos oligodendrócitos. Persistem nas células precursoras de oligodendrócitos pós-lesão e estão envolvidos na resposta de remielinização. Sua expressão surge entre 5 e 14 dias após o evento lesional. Na reação de imunoistoquímica, marcam-se os núcleos das células precursoras de oligodendrócitos. O aumento de sua expressão indica o potencial de atividade de remielinização e recuperação funcional¹⁹³. O anticorpo anti-Olig2 (AB9610, Chemicon, Merck KGaA, Alemanha) foi gerado em coelho e reconhece o epítipo de mamíferos.

O proteoglicano sulfato de condroitina NG2 (*Neuron-glia antigen 2 / CSPG4*) é marcador de glia NG2 precursoras de oligodendrócitos, que se proliferam e migram ao sítio lesional. Apresenta pico de expressão entre 3 e 7 dias após lesão, e sustenta sua presença por várias semanas. Sua expressão indica potencial de remielinização e inibe a formação de cicatriz glial. Na reação de imunohistoquímica, aumento da expressão indica recrutamento das células

precursoras de oligodendrócitos, geralmente ao redor do sítio lesional^{194,195}. O anticorpo anti-NG2 (clone 132.38, MAB5384, Chemicon, Merck KGaA, Alemanha) foi gerado em camundongo e reconhece o epítipo de roedores.

Os anticorpos empregados na citometria de fluxo reconheciam os marcadores de células hematopoiéticas CD34 (anticorpo ab24904, Abcam, Eugene, OR) e CD45 (anticorpo 553135, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), o marcador de células endoteliais CD31 (anticorpo ab25644, Abcam, Eugene, OR) e os marcadores de células-tronco mesenquimais CD73 (anticorpo 127207, BioLegend, San Diego, CA) e CD90 (anticorpo ab23830, Abcam, Eugene, OR).

4.4 Métodos

4.4.1 Coleta e processamento da mucosa olfatória dos roedores

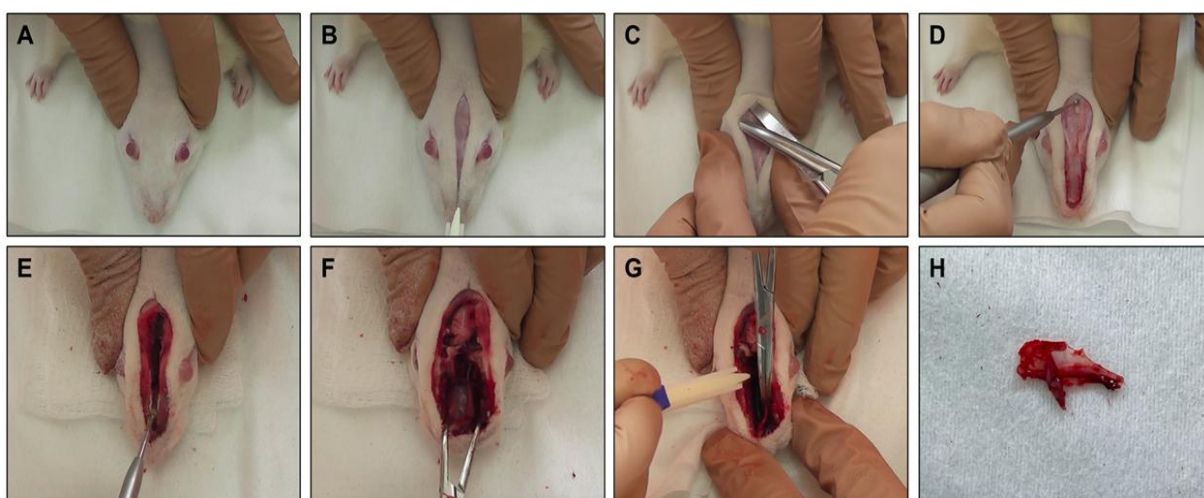
Foi inicialmente adotado o protocolo de isolamento do septo nasal original de Alvites et al. (2018)¹³³. Para facilitar o procedimento, realizou-se a tricotomia da cabeça do animal. Posicionou-se o roedor em decúbito esternal. Inseriu-se uma das lâminas de uma tesoura delicada em uma das narinas, até o ponto em que se sentiu uma resistência (fenda de acesso à cavidade nasal). A tesoura pode ser rodada para melhor adaptação à forma da narina, mas jamais forçada para dentro da cavidade nasal, sob o risco de trauma e sangramento. Uma vez bem posicionada a lâmina da tesoura, procedeu-se ao corte desde a prega alar estendendo-se ao longo da parede nasal lateral. As suturas nasomaxilares podem ser usadas como guia para facilitar o corte ósseo. Realizou-se o mesmo procedimento no lado contralateral. Por fim, realizou-se um terceiro corte perpendicular aos tubérculos nasais, avançando vagarosamente na cavidade nasal ao longo das turbinas nasais, septo nasal e turbinas etmoidais. Este último passo é crítico em termos de destruição traumática e contaminação da mucosa olfatória. Alcançado o limite caudal da cavidade, os ossos nasais puderam ser rebatidos caudalmente ou removidos com auxílio de pinça atraumática. Assim, todo o assoalho da cavidade nasal foi exposto, assim como o recesso olfatório e a respectiva mucosa, caudalmente. Estando a mucosa olfatória evidente, a coleta deve prosseguir cautelosamente. Com pinça atraumática, pôde-se destacar o epitélio que reveste o recesso olfatório e parte do septo nasal.

O protocolo de Alvites et al. (2018)¹³³ foi modificado como se segue. Posicionou-se o rato em decúbito esternal, imediatamente após eutanásia conduzida e verificada de acordo com o protocolo do estudo. Incisou-se a pele longitudinalmente ao longo do crânio. Com auxílio de

tesoura para dissecação, melhorou-se o afastamento das estruturas de partes moles que circundam a área central da incisão. Com auxílio de broca diamantada de 2mm em aparelho de alta rotação (Medtronic®, Minneapolis, EUA), a 80.000 rpm, realizaram-se craniotomia e osteotomia longitudinal na linha média do crânio e ossos nasais. Com auxílio de pinça delicada, afastou-se a estrutura óssea em sentido bilateral e obteve-se vista direta da cavidade olfatória com o septo nasal em destaque. Utilizando bisturi delicado, lâmina número 15, destacou-se e coletou-se o septo, com mínima ou nenhuma contaminação hemorrágica.

Cumprida esta etapa, colocou-se a amostra no tubo, em gelo, reservado no início do procedimento. Amostras de diferentes animais podem ser depositadas e transportadas no mesmo tubo, em gelo, por um período de até 2 horas. A Figura 3 ilustra o procedimento com imagens realizadas pelo autor no LETRAN (IOT, FMUSP).

Figura 3 – Aspectos técnicos do isolamento do septo nasal de rato adulto *post-mortem*: (A) rato posicionado em decúbito esternal, (B) incisão longitudinal, (C) dissecação de partes moles, (D e E) craniotomia e osteotomia nasal, (F) retração óssea, com cavidade nasal evidente, (G) coleta de septo nasal e (H) septo nasal isolado.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.4.2 Cultivo de CEs e neuroesferas

O cultivo de CEs foi de acordo com Mackay-Sim e Sutharsan (2012)¹⁹⁶. O tecido isolado foi lavado com tampão fosfato salina (Gibco; NY, EUA) e fragmentado em pequenos pedaços, transferido para um microtubo e digerido enzimaticamente com 500 µL de TrypLE Express (Gibco; NY, EUA) por 20 minutos a 37°C. Para a inativação da enzima, adicionou-se soro fetal bovino (Gibco; NY, EUA) no mesmo volume, que foi removido após sedimentação,

repetindo-se o processo duas vezes. Após a ressuspensão do tecido em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12; Gibco; CA, EUA) suplementado com soro fetal bovino a 10%, 2X GlutaMAX (Gibco; NY, EUA), 1X piruvato de sódio (Neon; Brasil) e 100U de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco; NY, EUA), a dissociação mecânica foi realizada por pipetagem repetida usando diâmetros decrescentes de ponta de pipeta (P1000 e P200). A suspensão celular resultante foi filtrada através de um filtro de células de 40 µm (Falcon; NC, EUA) para remover quaisquer agregados remanescentes. As células foram plaqueadas em uma placa de Petri de 60 mm com 6 mL de meio para células-tronco e mantidas em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. O meio completo suplementado com fungizona (1:1000) foi adicionado, repostado no dia seguinte e mantido durante os três primeiros dias *in vitro*. Duas trocas de meio, sem lavagem, foram realizadas nos dias 1 e 4 de cultivo *in vitro* (DIV 1 e DIV 4). O meio da primeira troca foi transferido para outra placa de 60 mm e mantido em cultura. Uma lavagem com PBS foi realizada no DIV 8. A passagem das células foi feita lavando-as duas vezes com PBS, seguido de incubação com aproximadamente 10 µL/cm² de TrypLE por 5 minutos a 37°C. As células foram congeladas em P2 e em P3. As CEs em P5 foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo, e em P3 foram utilizadas para ensaios de neuroesferas.

A população aderente de CEs (origem mesenquimal) da quinta passagem foi analisada por citometria de fluxo. As células foram incubadas com TrypLE e 9 x 10⁵ células ressuspensas em 100 µL de PBS foram analisadas quanto à expressão de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo. Para cada anticorpo testado, 1 × 10⁵ células foram inicialmente utilizadas. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) em PBS por 15 minutos a 4°C e permeabilizadas com o kit de permeabilização celular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram lavadas com PBS, bloqueadas em BSA a 2% (albumina de soro bovino, Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30 minutos à temperatura ambiente e incubadas durante uma hora a 4°C, na presença do anticorpo primário conjugado com fluoróforo numa diluição de 1:500 em PBS com BSA a 2%. Um mínimo de 50.000 eventos foi analisado no citômetro de fluxo FACS Aria II e no software FACS Diva (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Para formação de neuroesferas, células CEs em P3 foram descongeladas e mantidas em cultura em placas de ultra-baixa aderência, em meio DMEM/F-12, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF, 20 ng/ml), fator de crescimento epidérmico (EGF, 20 ng/ml), 1X B-27 (Gibco), penicilina e estreptomicina a 20 ng/ml, 2X L-alanil-L-glutamina (GlutaMAX,

Gibco). e piruvato de sódio 1X (Neon, São Paulo, Brasil). Neuroesferas foram passadas uma vez, por dissociação enzimática com dispase.

Neuroesferas de 7 DIV foram medidas utilizando um microscópio com aumento de 100x. As imagens foram adquiridas em um microscópio de luz invertido Zeiss Axiovert 40 CFL (Zeiss, Alemanha) equipado com uma câmera CCD AxioCam MRC5 (Zeiss, Alemanha) e processadas com o software AxioVision Rel. 4.7. A análise dos dados e a sobreposição de gráficos foram realizadas utilizando o software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences). As esferas foram contadas e medidas usando o software AxioVision (Zeiss) ou ImageJ, e os painéis foram construídos com o plugin QuickFigures e analisados estatisticamente entre os grupos (ANOVA, $P < 0,05$) ou entre os grupos (teste post-hoc de Tukey, $P < 0,05$).

4.4.3 Modelo experimental da lesão medular

4.4.3.1 Animais para o procedimento cirúrgico

Os ratos utilizados no estudo foram acomodados previamente no laboratório e foram manuseados frequentemente de forma a acostumá-los ao manejo dos experimentadores e estimulá-los a movimentarem-se, sem sentir medo (agachando-se, afastando-se do examinador, pouca ou nenhuma locomoção, defecação e micção frequentes, piloereção, vocalizações e falha no preparo), facilitando a avaliação dos desfechos de capacidade motora após a lesão.

Todas as complicações foram registradas para análise estatística e foram excluídos os casos de: óbito após lesão medular experimental, anomalias na área lesada da medula observadas macroscopicamente, autofagia ou mutilação entre os animais ou movimentação preservada na primeira avaliação após lesão (superior a 15 pontos na escala Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de avaliação funcional).

4.4.3.2 Grupos experimentais

Para o procedimento cirúrgico, 60 animais foram incluídos e divididos em cinco grupos de 12 animais cada.

Grupo 1: Os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia e não foram submetidos à contusão medular.

Grupo 2: Os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia, seguida de durotomia e não foram submetidos à contusão medular.

Grupo 3: Os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia, seguida de durotomia, seguida de contusão medular por queda de peso (10g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor.

Grupo 4: Os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia, seguida de durotomia, seguida de contusão medular por queda de peso (10g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor. Uma injeção de Matrigel® foi instilada no sítio lesional agudamente, em aplicação única por via aberta.

Grupo 5: Os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia, seguida de durotomia, seguida de contusão medular por queda de peso (10g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor. Uma injeção contendo neuroesferas derivadas de 1×10^5 CEs em solução com Matrigel® foi instilada no sítio lesional agudamente, em aplicação única por via aberta.

4.4.3.3 Protocolo de anestesia

Para a realização da lesão medular, os animais foram submetidos à anestesia com isoflurano por máscara na dose de 2% em oxigênio¹⁹⁷.

Após sedação leve, uma máscara foi fixada de modo a cobrir todo o focinho do animal levando a um plano anestésico mais profundo para então realizar-se a tricotomia e limpeza da região dorsal em que sofreram incisão.

4.4.3.4 Procedimento cirúrgico

Confirmado o plano anestésico, a exposição da medula para contusão controlada foi realizada com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Após tricotomia, foi realizada uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, de T8 a T12.

Os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de T9 a T11, foram descolados das suas inserções ósseas.

A hemostasia, quando necessária, foi realizada com um coagulador bipolar. Foram removidos com um micro saca-bocados o processo espinhoso, a lâmina da vértebra T8 até expor a medula e permitir o posicionamento da ponta da haste do NYU-Impactor (New York University, 1993)¹⁹⁸.

4.4.3.5 Contusão medular

As lesões foram produzidas obedecendo o protocolo internacional MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*)¹⁹⁹ pelo sistema *NYU Impactor*²⁰⁰. Após o posicionamento do animal, o equipamento foi devidamente calibrado na altura de 12,5 mm, causando uma contusão moderada¹⁶. O sítio lesionado foi irrigado com soro fisiológico à temperatura ambiente, seguindo-se à inspeção. Após confirmação da contusão medular, foi instituído o tratamento de acordo com os grupos experimentais, realizada sutura em bloco da musculatura paravertebral e posteriormente sutura cutânea.

4.4.3.6 Pós-operatório

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 x 60 cm), mantidos em grupos de até cinco animais, nas mesmas condições ambientais (manejo, alimentação *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola) até o final do experimento. Os ratos foram observados quanto a mutilações, infecções ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações). Após a lesão medular, os animais apresentaram bexiga neurogênica, sendo necessário a realização de massagem para esvaziamento vesical 2 vezes ao dia durante 5 dias²⁰⁰.

4.4.3.7 Analgesia

Foi ministrado cloridrato de tramadol na dose de 50 mg/kg a cada 8 horas durante 5 dias, pentabiótico na dose 5 mg/Kg a cada 12 horas durante 5 dias, Meloxicam na dose 5 Mg/kg 1 x ao dia durante 3 dias²⁰¹.

4.4.3.8 Antibioticoprofilaxia

Foi realizado protocolo de antibiótico profilaxia com amoxicilina 15 mg/100 gramas a cada 12 horas durante 7 dias, por via subcutânea.

4.4.3.9 Protocolo de eutanásia

Realizou-se o mesmo protocolo de anestesia e, após confirmação do plano anestésico, foi realizada perfusão intracardíaca com solução de paraformaldeído, seguindo protocolo de

fixação tecidual e preparo para lâminas de imunohistoquímica. Após três minutos de perfusão, ocorreu parada cardíaca (dispensando uso de cloreto de potássio).

4.4.3.10 Descarte das carcaças

Após o procedimento de ressecção medular, os animais são acondicionados em sacos plásticos brancos, devidamente identificados e encaminhados para o descarte seguindo apostila de descarte de carcaças da FMUSP.

4.4.4 Avaliações

4.4.4.1 Avaliação funcional

Durante o período pós-operatório de 42 dias, a recuperação da capacidade locomotora após lesão medular é medida pela escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) de avaliação funcional¹⁶ e também pela avaliação em plano horizontal²⁰².

A aplicação e interpretação da escala BBB foi padronizada em nosso laboratório por Santos et al. (2011)²⁰⁰. A avaliação é visual e é realizada por dois observadores treinados, cegos quanto ao grupo de estudo de cada animal. Para efeito de registro, é escolhida a menor nota entre os dois avaliadores. Todos os ratos dos grupos são avaliados antes da lesão medular e nos seguintes dias do período pós-operatório: 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 42.

A aplicação e interpretação do método de plano horizontal ou escada horizontal também foi realizada por dois avaliadores independentes. Para este método, utilizamos uma escada horizontal suspensa com 75cm de comprimento, com filetes metálicos espaçados a 1.5cm entre si. Os animais são treinados para caminhar nesta escada por 5 dias antes da intervenção experimental. Após a intervenção designada para cada grupo, são reconduzidos à escada e sua caminhada é observada, por dois avaliadores que computam acertos (passos em que houve pisada no filete metálico) e erros (escorregões, quando pisam no vão entre os filetes)²⁰². As avaliações são realizadas no momento pré-operatório e também nos dias de pós-operatório 21, 28, 35 e 42.

Houve ainda anotação e avaliação do tempo que os animais apresentaram bexiga neurogênica após a lesão medular.

4.4.4.2 Necrópsia e avaliação macroscópica

O exame necroscópico dos camundongos é realizado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal.

Na inspeção inicial, é observada externamente a presença de possíveis lesões associadas à autofagia ou mutilação. É então realizada a retirada da coluna vertebral através de uma via de acesso dorsal extensa. Após a exposição, realiza-se uma incisão entre o segmento de T8 a T12. Com um micro saca bocados, as estruturas ósseas e partes moles adjacentes à medula são ressecadas de forma a obter-se a exposição completa da medula espinal. A medula espinal é inspecionada macroscopicamente no local da contusão para verificar se há anomalias estruturais que preencham critérios de exclusão.

Realiza-se incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Os pulmões são inspecionados para a identificação de possíveis alterações, como a presença de empiema ou condensação. No abdômen, é realizada a inspeção da bexiga, para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante do volume da mesma) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e hematúria). Os dados assim coletados são listados para posterior análise estatística de complicações associadas.

A seguir, a medula retirada é encaminhada em frascos, devidamente identificados, em soluções fixadoras para o Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O estudo anatomopatológico consiste de uma análise microscópica (óptica) de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

São realizados cortes histológicos no plano axial no segmento medular com intervalos de dois milímetros, representando toda a área lesada, numa extensão de um centímetro a partir do centro da lesão. Este material é processado e desidratado em bateria de álcoois, e depois sofre processo de diafanização em xilol e posteriormente incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, são feitos cortes histológicos de cinco micras em micrótomo. Estes cortes são realizados meio centímetro acima e meio centímetro abaixo da área central da lesão. Este material é então fixado em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

Assim, são preparadas 3 lâminas para cada medula, denominadas A, B e C. As lâminas A e C correspondem, respectivamente, às regiões proximal e distal ao sítio de lesão e são colhidas como forma de controle individual em cada camundongo. Já o fragmento B

corresponde ao sítio de lesão propriamente dito, sendo diferente dos fragmentos A e C. Cada segmento A, B ou C é tratado e avaliado distintamente.

4.4.4.3 Análise histológica e imunohistoquímica

A avaliação pelos patologistas é feita de forma cega, sem que sejam informados a que grupo pertence cada material estudado. O segmento de medula espinal de oito animais é fixado em paraformaldeído a 10% e analisado por HE e imunofluorescência. O tecido dos demais animais (quatro) é submetido à avaliação axonal, cujo preparo difere dos demais. Para essa análise, a medula é fixada em paraformaldeído a 1% em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,3. Após uma hora, o tecido é pós-fixado por duas horas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato. As etapas de desidratação do tecido seguem como explicado acima, embora o tecido seja infiltrado em óxido de propileno e incluído em resina Epoxi (Burlington, VT) até polimerização.

4.4.4.4 Histologia

Análise de coloração por hematoxilina-eosina (HE) e imunoistoquímica seguiram procedimentos de rotina e foram realizadas como serviço (HistoCell, São Paulo). A análise das lâminas foi realizada por patologistas experientes (FM-USP). Na análise microscópica por HE, são observados sinais de rejeição celular (infiltrado inflamatório abundante) ou malignação (núcleos hipercromáticos com pleomorfismo, elevada atividade mitótica, áreas necróticas, invasão vascular e/ou a tecidos vizinhos).

Em nosso estudo, um sistema de escore semiquantitativo foi empregado para avaliar a expressão de marcadores específicos (NG2, GFAP, Olig1, Olig2 e CD11B) em cortes de medula espinal dos grupos experimentais. As regiões com marcação imunohistoquímica foram acessadas independentemente sob microscópio óptico por dois patologistas com cegamento das amostras analisadas. Os escores variaram de 0 a 4, de acordo com os seguintes critérios:

- 0: Negativo (0%; sem marcação detectável);
- 1: Marcação leve/focal (0–25%, áreas limitadas);
- 2: Marcação moderada (25–50%, detectável mas não difusa);
- 3: Marcação intensa e difusa (50–75%); e
- 4: Marcação muito intensa e homogênea (75–100%, por toda a amostra).

Esta avaliação semiquantitativa foi previamente descrita e validada para a avaliação da expressão de proteínas em secções de tecidos²⁰³.

4.4.5 Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado de forma baseada no objetivo principal - comparar os resultados do BBB após 6 semanas de tratamento com células tronco ectomesenquimal aos grupos controle. O estudo foi composto por cinco grupos de ratos, supondo uma diferença entre valores da escala BBB de pelo menos 1,5 pontos. Sabendo que a variação no BBB é de 0,9 pontos⁸³, a amostra necessária para a realização do estudo, com poder de 80% e confiança de 95%, foi estimada em 12 ratos para cada grupo com base na comparação via análise de variância (ANOVA) assumindo teste bicaudal²⁰⁴.

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos e momentos de avaliação com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana e quartis)²⁰⁵ e comparados os parâmetros com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1)²⁰⁶, as variações de peso dos animais e o tempo de bexiga neurogênica foram descritas segundo grupos e comparadas com uso de análise de variâncias (ANOVA) e teste Kruskal-Wallis respectivamente, sendo o teste Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn para identificar entre quais grupos ocorrem as diferenças²⁰⁴ e as análises do BBB e plano horizontal foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos ou momentos ocorreram as diferenças²⁰⁴. Os dados de imunohistoquímica foram descritos segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e comparados com uso de testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn e foram calculadas as correlações de Spearman entre os dados de imunohistoquímica e os testes funcionais na 6ª semana e tempo de bexiga neurogênica.

Para realização das análises foi utilizado o *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 22.0 e para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2013. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

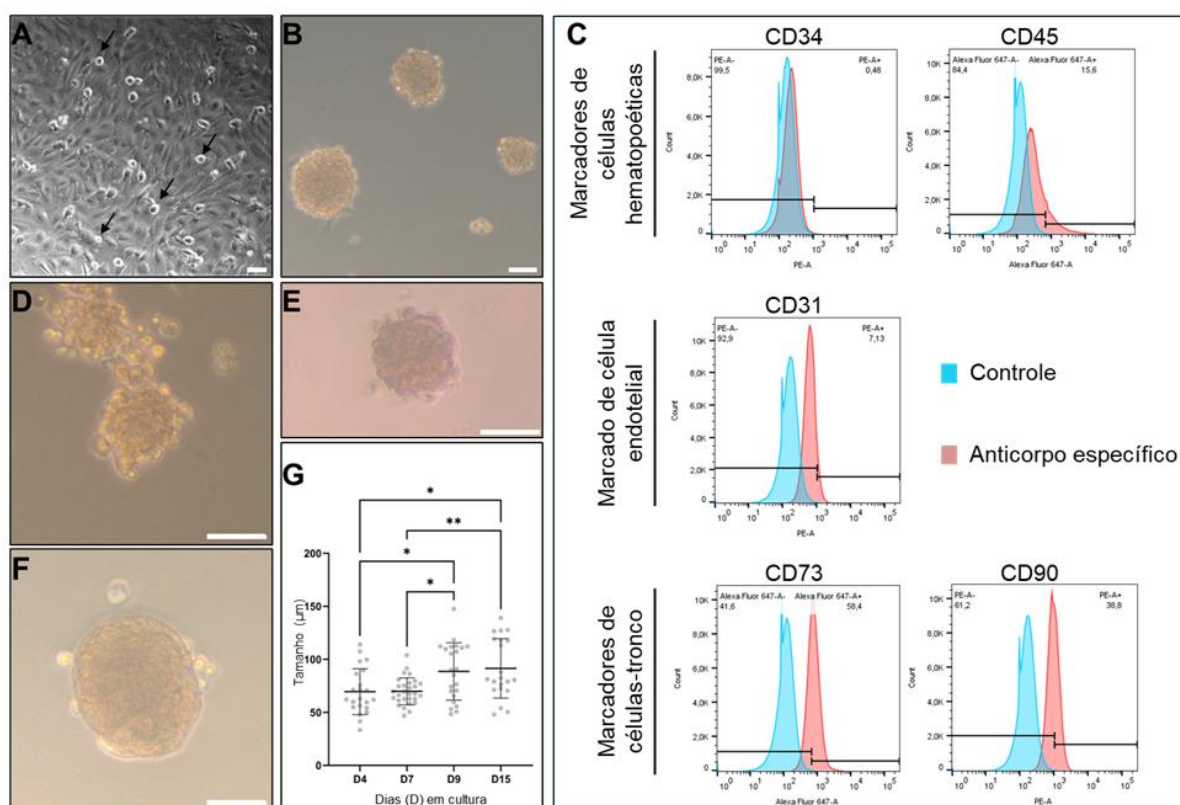
O procedimento de coleta da mucosa olfatória deve ser realizado em sua totalidade em no máximo dez minutos após o óbito do animal¹³²; caso contrário, há grande risco de alterações biológicas e estruturais nas CE. Estas alterações tornam inviáveis seu isolamento, sua expansão e, por consequência, seu emprego em cultivo celular. A partir da técnica inicialmente empregada, como descrito por Alvites et al. (2018)¹³³, observaram-se dois problemas principais: a contaminação hemorrágica do material retirado e as alterações estruturais deste material decorrentes seja da demora em retirar o tecido nasal, seja da própria manipulação da tesoura no interior da cavidade nasal (não mostrado). Nesse contexto, desenvolvemos técnica original, não descrita na literatura, para a retirada do septo nasal de ratos adultos (Anexo C). A inovação no procedimento de dissecação foi a craniotomia assistida por uma broca diamantada de alta precisão. Seguiu-se osteotomia na linha média do crânio e dos ossos nasais e isolamento do septo nasal com sangramento mínimo (Figura 3H).

Quando cultivada primariamente em meio completo, a mucosa olfatória dissociada fornece populações mistas de células, observadas como células aderentes de crescimento rápido (Figura 4A) e células brilhantes em suspensão (Figura 4A, setas). Células aderentes de passagem 5 submetidas a análises de citometria com anticorpos que identificam marcadores de células-tronco mesenquimais, notadamente CD73 e CD90, apresentaram taxas de detecção de 58,4% e 38,8%, respectivamente, confirmando um enriquecimento no tipo de célula-tronco mesenquimal esperado (Figura 4C). Em concordância, essa população de células aderentes apresentou taxas de detecção mais baixas para marcadores de células hematopoiéticas, CD34 (0,48%) e CD45 (15,6%) ou para o marcador de células endoteliais CD31 (7,13%; Figura 4C). O número total de eventos foi de 268.322, 268.265, 267.178, 267.118 e 270.252, respectivamente para CD34, CD45, CD31, CD73 e CD90. Os dados mostraram, portanto, que a passagem celular enriqueceu a população de células aderentes em células-tronco mesenquimais, embora na passagem 5 ela fosse heterogênea.

Foi medido o tamanho de neuroesferas obtidas em cultivo sob condições não aderentes e que favorecem a proliferação de células-tronco neurais. Em meio de cultura, o diâmetro de esferas individuais foi medido no DIV 4 (N=22; média de 69,47 $\mu\text{m} \pm 21,61$; Figura 4D), no DIV 7 (N=29; média de 69,83 $\pm 12,69$; Figura 4E), no DIV 9 (N=23; média de 88,61 $\pm 26,95$) e no DIV 15 (N=21; média de 91,47 $\pm 28,05$; Figura 4F). O diâmetro das esferas aumentou entre os grupos (ANOVA, $P < 0,05$), evidenciando mudanças específicas no tamanho do DIV

4 para o DIV 9, do DIV 4 para o DIV 15, do DIV 7 para o DIV 9 e do DIV 7 para o DIV 15 (Figura 4G; teste post-hoc de Tukey, $P < 0,05$).

Figura 4 – Análise de populações de células aderentes e flutuantes. (A) Imagens de contraste de fase mostrando células aderentes confluentes em DIV 7 e células flutuantes brilhantes (setas). (B) Estruturas esféricas formadas em cultura em suspensão de células P3 10 dias após o plaqueamento. (C) Análise citométrica de fluxo de células aderentes P5 coletadas em 90% de confluência, analisadas para a expressão dos marcadores de células hematopoiéticas CD34 e CD45, o marcador de células endoteliais CD31 e os marcadores de tronco mesenquimais CD73 e CD90. (D-F) Imagens representativas de esferas flutuantes de células observadas após quatro (D), sete (E) ou 15 dias em cultura. (G) Diagrama de pontos do tamanho da esfera (μm) mostrando medições individuais feitas no dia indicado em cultura. ANOVA unidirecional com teste post hoc de Tukey ($\mu = 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barras de escala = 50 μm .



Fonte: Arquivo pessoal do autor

5.1. Análises da função motora dos animais no período pós-operatório

Cinco grupos experimentais, cada um composto por 12 ratos machos, foram estabelecidos para o procedimento cirúrgico. Os animais de todos os grupos (1 a 5) foram submetidos à laminectomia, e os animais dos grupos 2 a 5 foram também submetidos à

durotomia. Os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram submetidos à contusão da medula espinal. O grupo 3 foi o controle negativo, pois os animais não receberam tratamento com células nem com o veículo. Os animais dos grupos 4 e 5 receberam veículo Matrigel® a 90% antes da sutura do tecido, enquanto os do grupo 5 também receberam células neuroesferas indiferenciadas, suspensas em Matrigel® a 90% imediatamente após a contusão e antes da sutura do tecido. Nos grupos 2, 3 e 5, um animal foi excluído de cada grupo devido à autofagia ou à ineficácia da lesão.

O peso corporal dos animais foi avaliado no início e ao final do experimento. O tônus da bexiga e a função motora foram avaliados antes e depois da cirurgia no dia 2 (D2) e ao término das semanas 1 (S1), 2 (S2), 3 (S3), 4 (S4), 5 (S5) e 6 (S6). Os efeitos da lesão na função motora (D2) e na recuperação motora pós-operatória (D2 – S6) foram avaliados usando a escala desenvolvida por Basso, Beattie e Bresnahan (escala BBB) com base em dez categorias de comportamento, que variam do movimento dos membros à posição da cauda no espaço, resultando em uma pontuação final de 0 (zero) a 21 (11). Como todos os animais dos grupos 1 (apenas laminectomia) e 2 (laminectomia mais durotomia) obtiveram pontuação 21 na escala BBB ao longo do estudo (Tabela 1), os dois procedimentos, laminectomia e durotomia, foram considerados seguros e esses grupos de controle não foram levados em consideração em análises posteriores.

Tabela 1 – Descrição da escala BBB segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.

Variável/Grupo	Momento							p Grupo	p Momento	p Interação
	2 dias	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas			
BBB								<0,001	<0,001	<0,001
Laminectomia (N = 12)										
média ± DP	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0			
mediana (p25; p75)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)			
Laminectomia + Durotomia Micro (N = 11)										
média ± DP	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0			
mediana (p25; p75)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 11)										
média ± DP	0,4 ± 0,5	0,9 ± 0,7	2 ± 0,6	3,1 ± 0,9	4,6 ± 1	6,7 ± 1,7	8,8 ± 1,8			
mediana (p25; p75)	0 (0; 1)	1 (0; 1)	2 (2; 2)	3 (2; 4)	4 (4; 6)	7 (5; 8)	8 (8; 10)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 12)										
média ± DP	0,2 ± 0,4	0,5 ± 0,5	2,6 ± 0,8	4,5 ± 1,2	7,2 ± 1	9,8 ± 1,7	11,9 ± 1,7			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0)	0,5 (0; 1)	2 (2; 3)	4,5 (4; 5,8)	7,5 (6,3; 8)	10 (8; 11,8)	12 (11,3; 13)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 11)										
média ± DP	0,5 ± 0,5	3,3 ± 1	5,4 ± 1,2	6,5 ± 1,7	10,1 ± 1,8	12,4 ± 0,9	13 ± 1,1			
mediana (p25; p75)	0 (0; 1)	4 (2; 4)	5 (4; 6)	7 (5; 8)	10 (8; 12)	12 (12; 13)	13 (12; 14)			

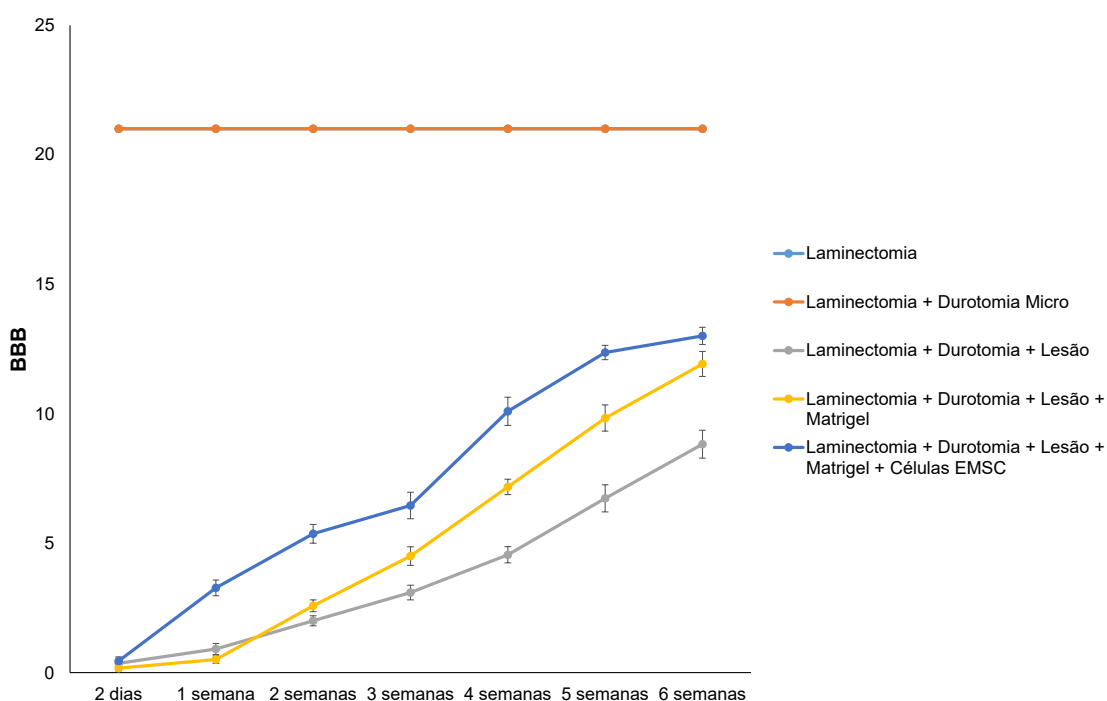
Na análise foram considerados os grupos 3, 4 e 5 e os momentos 2 dias, 3 semanas e 6 semanas; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Ao longo do estudo, não houve diferença no peso corporal entre os animais dos três grupos (ANOVA, $P=0,896$). Bexiga neurogênica foi observada em todos os animais submetidos à compressão da medula espinhal e persistiu até a quinta semana para os animais do grupo 3 e até a quarta semana para os grupos 3 e 4, com diferença significativa entre os três grupos ($P=5 \times 10^{-9}$, teste de Kruskal-Wallis).

Em D2, pelo menos 50% de todos os animais de cada grupo 2, 3 ou 4 obtiveram pontuação zero na escala BBB, e os demais obtiveram pontuação 1 ou 2 (Gráfico 1). Não houve diferença entre os três grupos no D2 (Tabela 1). Esses dados demonstraram a eficácia da contusão na medula espinhal e a homogeneidade entre os animais de cada grupo. Comparações não pareadas e pareadas do valor da escala BBB ao longo do período pós-operatório, do D2 até a S6, revelaram melhora da função motora em cada grupo 3, 4 ou 5 (Tabela 2; Gráfico 2).

Gráfico 1 – Perfis médios do BBB e respectivos erros padrões segundo grupos.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

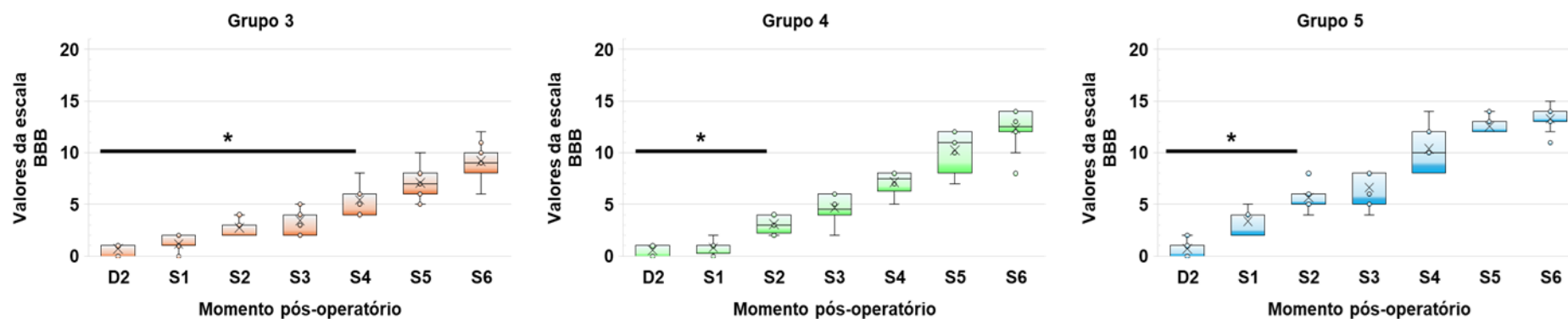
Tabela 2 – Resultado das comparações múltiplas do BBB entre grupos e momentos avaliados conforme as diferenças encontradas.

Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Só Lesão	2 dias - 3 semanas	-2.73	0.51	<0,001	-4.35	-1.11
	2 dias - 6 semanas	-8.45	0.52	<0,001	-10.10	-6.81
	3 semanas - 6 semanas	-5.73	0.51	<0,001	-7.35	-4.11
Lesão + Matrigel	2 dias - 3 semanas	-4.33	0.49	<0,001	-5.88	-2.78
	2 dias - 6 semanas	-11.75	0.49	<0,001	-13.33	-10.17
	3 semanas - 6 semanas	-7.42	0.49	<0,001	-8.97	-5.87
Lesão + Matrigel + Células EMSC	2 dias - 3 semanas	-6.00	0.51	<0,001	-7.62	-4.38
	2 dias - 6 semanas	-12.55	0.52	<0,001	-14.19	-10.90
	3 semanas - 6 semanas	-6.55	0.51	<0,001	-8.17	-4.93
2 dias	Só Lesão - Lesão + Matrigel	0.20	0.51	>0,999	-1.42	1.81
	Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-0.09	0.52	>0,999	-1.74	1.56
	Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-0.29	0.51	>0,999	-1.90	1.33
3 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	-1.41	0.51	0.190	-3.02	0.21
	Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-3.36	0.52	<0,001	-5.01	-1.71
	Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-1.95	0.51	0.004	-3.57	-0.34
6 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	-3.10	0.51	<0,001	-4.71	-1.48
	Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-4.18	0.52	<0,001	-5.83	-2.53
	Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-1.08	0.51	>0,999	-2.70	0.53

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 2 – Valores da escala BBB para cada grupo (G3, G4 e G5) momento do estudo (D2, S1 - S6) permitindo a comparação entre os momentos. No box plot, X representa a mediana. Pequenos círculos indicam valores discrepantes e valores internos. Cada caixa colorida indica os valores do primeiro e terceiro interquartis. Os valores mínimo e máximo estão indicados (*) $P < 0,05$ para o pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni. Está indicado somente a primeira diferença significativa ao longo do período pós-operatório para cada grupo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Ao considerar os tempos individuais, foram observadas diferenças entre as pontuações BBB dos grupos nas semanas 1 e 2 (teste de Kruskal-Wallis, $P = 2,89 \times 10^{-5}$ e $2,39 \times 10^{-5}$, respectivamente), com os valores mais altos para os animais do grupo 5, que receberam células em Matrigel® (média de 3,63 na semana 1 e 5,36 na semana 2), significativamente diferentes dos animais do grupo 3 (média de 1,25 na semana 1 e 2,18 na semana 2) ou do grupo 4 (média de 0,83 na semana 1 ou 2,75 na semana 2) (Tabela 3). No geral, os dados BBB nas semanas 1 e 2 mostram que os grupos 3 e 4 foram semelhantes, enquanto os animais do grupo 4 apresentaram pontuações significativamente mais altas do que qualquer um dos outros dois grupos.

Tabela 3 – Diferenças dos valores da escala BBB entre os grupos dentro de cada período pós-operatório*.

	Grupo 4	Grupo 5
Dia 2**		
Grupo 3	1	1
Grupo 4		1
Semana 1**		
Grupo 3	1	0.0022
Grupo 4		0.000036
Semana 2		
Grupo 3	1	0.000054
Grupo 4		0.00078
Semana 3		
Grupo 3	0.20	0.00021
Grupo 4		0.079
Semana 4**		
Grupo 3	0.025	1.45×10^{-6}
Grupo 4		0.037
Semana 5**		
Grupo 3	0.042	2.91×10^{-6}
Grupo 4		0.033
Semana 6**		
Grupo 3	0.005	0.00014
Grupo 4		0.96

* Valores de p do teste *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni. **Resultados do teste de Kruskal-Wallis para Dia 2 ($P = 0.82$), Semana 1 ($P = 2.89 \times 10^{-5}$), Semana 2 ($P = 2.39 \times 10^{-5}$), Semana 3 ($P = 3.5 \times 10^{-4}$), Semana 4 ($P = 3.15 \times 10^{-6}$), Semana 5 ($P = 6.17 \times 10^{-6}$) e Semana 6 (1.2×10^{-4}).

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Cada um dos dois grupos-teste de animais (grupos 4 e 5) apresentou pontuações BBB significativamente mais altas na semana 3 quando comparadas aos seus próprios valores no dia 2 (Tabela 4). Vale ressaltar que os grupos 2 e 3 foram semelhantes ($P=0,19$). Os valores de BBB no D2 diferiram dos valores na S4 dentro de cada grupo (grupos 3, 4 ou 5; Tabela 2). Na S4, o Matrigel® isoladamente (grupo 4) foi superior ao controle, mas ainda inferior ao grupo 5 (teste post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni, $P = 0,03$ e $P = 0,04$, respectivamente). O mesmo perfil de pontuação de BBB por grupo persistiu até a S5. Na S6, os grupos 4 e 5 diferiram do grupo 3 (Bonferroni, $P<0,05$), que apresentou a menor pontuação de BBB entre os três grupos ($8,8 \pm 1,8$). O grupo 5 ($13 \pm 1,1$) apresentou a maior pontuação média de BBB entre todos os grupos de animais submetidos à SCC e valores semelhantes aos do grupo 4 ($11,9 \pm 1,7$).

Tabela 4 – Diferenças dos valores da escala BBB entre os períodos pós-operatórios dentro de cada grupo*.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Grupo 3 (N = 11)**						
D2	1	0.53	0.09	0.0002	1.66×10^{-6}	4.59×10^{-9}
S1		1	0.48	0.0027	0.000033	1.56×10^{-7}
S2			1	0.66	0.035	0.00084
S3				1	0.24	0.0097
S4					1	1
S5						1
Grupo 4 (N = 12)**						
D2	1	0.73	0.047	0.0002	2.94×10^{-7}	1.25×10^{-9}
S1		1	0.11	0.0006	1.43×10^{-6}	7.74×10^{-9}
S2			1	0.39	0.008	0.0001
S3				1	0.18	0.01
S4					1	0.78
S5						1
Grupo 5 (N = 11)**						
D2	1	0.19	0.039	0.000029	9.65×10^{-8}	2.26×10^{-9}
S1		1	1	0.0065	0.000074	3.49×10^{-6}
S2			1	0.55	0.024	0.0025
S3				1	0.13	0.017
S4					1	1
S5						1

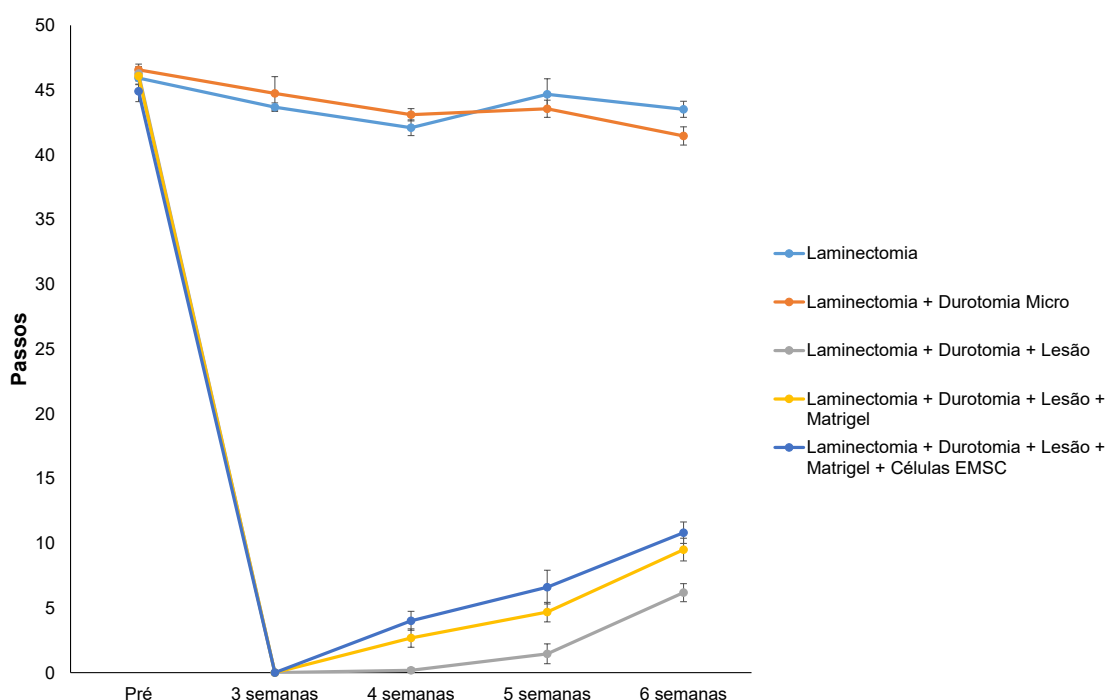
* Valores de p do teste *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni. **Resultados do teste de Kruskal-Wallis para o grupo 3 ($P = 8.67 \times 10^{-13}$), group 4 ($P = 1.04 \times 10^{-14}$) e grupo 5 (6.9×10^{-13}).

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Analisando os dados referentes à análise do plano horizontal, as Tabelas 6 e 7 mostram que os acertos, escorregões e erros percentuais apresentaram comportamentos médios dos grupos estatisticamente diferentes ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Interação}} = 0,05$), já os passos diferiram ao longo dos momentos de avaliação apenas independente do grupo ($p_{\text{Momento}} < 0,001$).

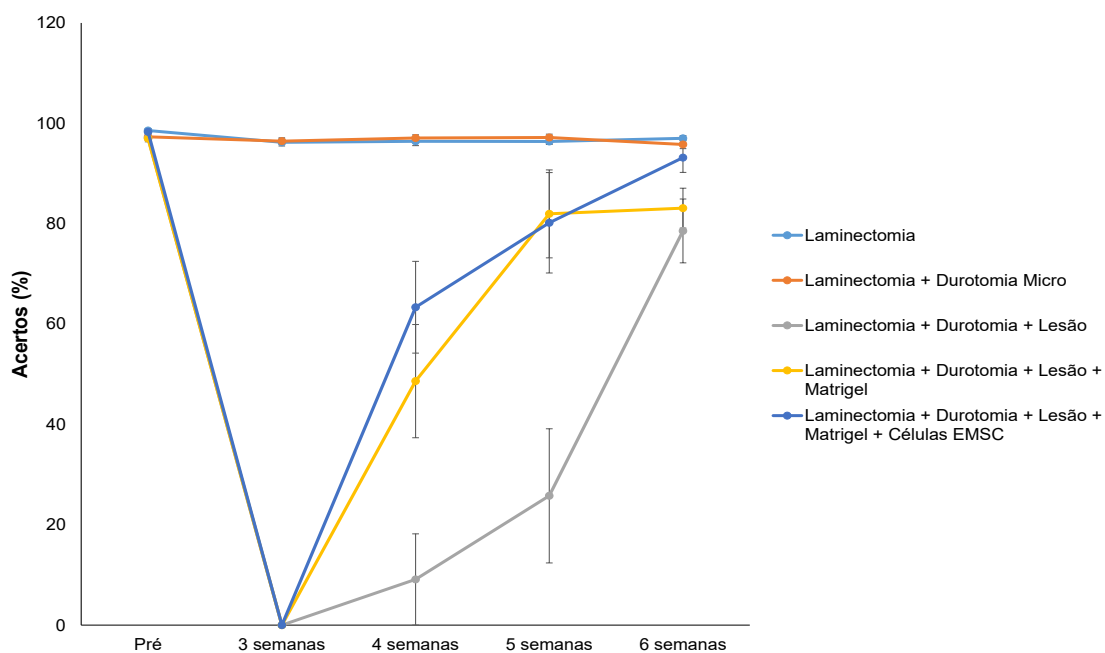
A Tabela 5 mostra que os passos médios diminuíram estatisticamente do pré para os demais momentos avaliados em todos os grupos ($p < 0,001$) e aumentaram novamente de 4 para 6 semanas ($p < 0,001$). Os escorregões e erros percentuais foram em média estatisticamente maiores na semana 4 que no pré e 6ª semana ($p < 0,05$), havendo maior média estatisticamente significativa de escorregões e erros no grupo lesão + matrigel que no grupo lesão + matrigel + células EMSC no pré e menor que no grupo só lesão em 4 semanas ($p < 0,001$). O percentual de acertos apresentou redução média estatisticamente significativa do pré para 6 semanas no grupo só lesão ($p = 0,033$), no grupo lesão + matrigel houve redução média do pré para 4 semanas apenas ($p = 0,001$) e no grupo lesão + matrigel + células EMSC houve redução média na 4ª semana em relação ao pré ($p < 0,001$), mas voltou a aumentar de 4 para 6 semanas ($p = 0,002$), porém, em nenhum momento houve diferença média estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Os Gráficos 3, 4, 5 e 6 ilustram os dados em forma gráfica.

Gráfico 3 – Perfis médios e respectivos erros padrões do número de passos segundo grupo.



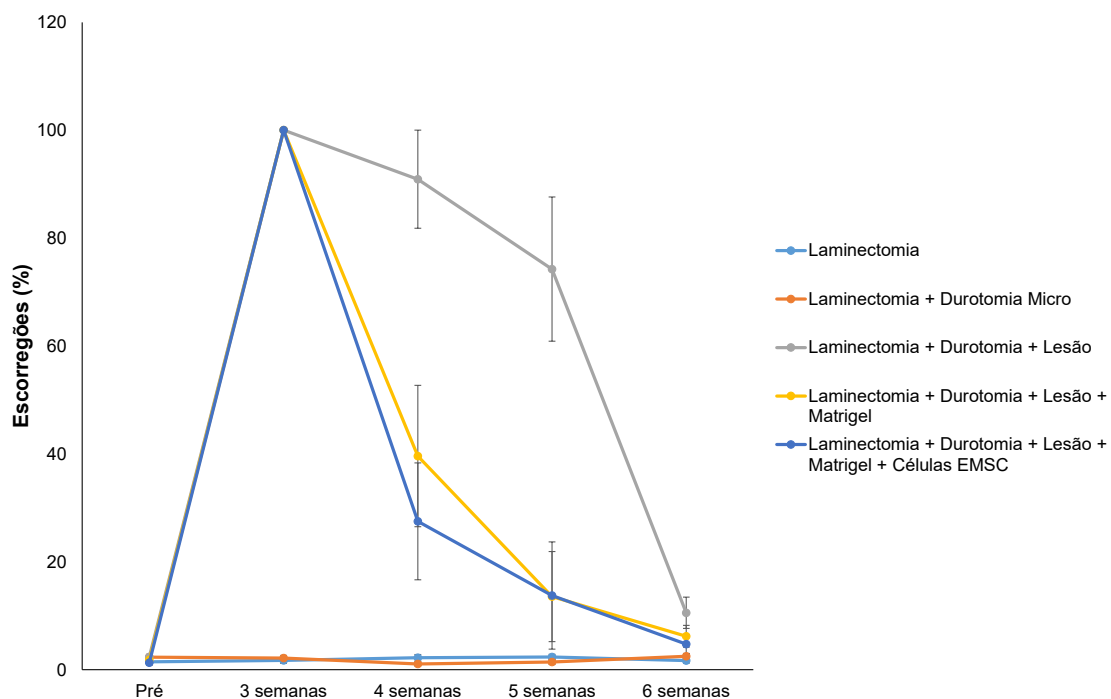
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 4 – Perfis médios e respectivos erros padrões do percentual de acertos segundo grupo.



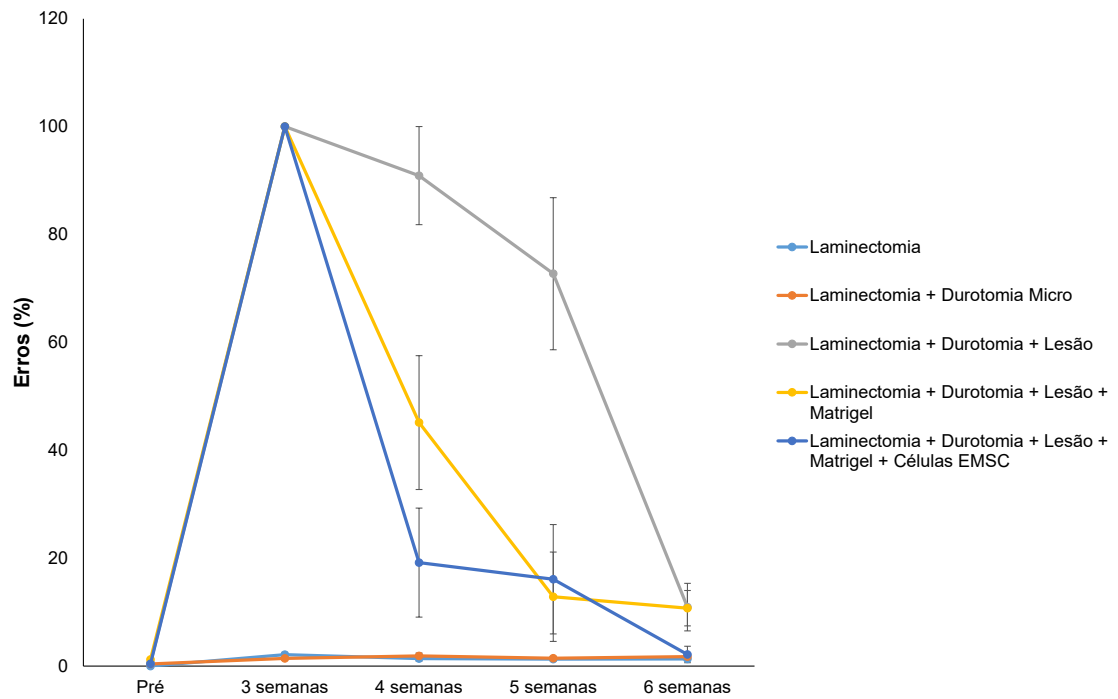
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 5 – Perfis médios e respectivos erros padrões do percentual de incorreções segundo grupo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Gráfico 6 – Perfis médios e respectivos erros padrões do percentual de erros segundo grupo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 5 – Resultado das comparações múltiplas dos parâmetros do plano horizontal entre grupos e momentos avaliados conforme diferenças apresentadas.

Variável	Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	P	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Passos	Todos os grupos	Pré - 4 semanas	43.5	1.2	<0,001	40.6	46.4
		Pré - 6 semanas	36.9	1.3	<0,001	33.8	40.0
		4 semanas - 6 semanas	-6.5	0.6	<0,001	-7.9	-5.2
Acertos (%)	Só Lesão	Pré - 4 semanas	-3.3	13.5	>0,999	-46.4	39.8
		Pré - 6 semanas	18.5	5.6	0.033	0.6	36.4
		4 semanas - 6 semanas	21.8	13.5	>0,999	-21.3	64.9
	Lesão + Matrigel	Pré - 4 semanas	24.5	5.7	0.001	6.2	42.7
		Pré - 6 semanas	13.9	5.4	0.343	-3.2	31.0
		4 semanas - 6 semanas	-10.6	5.7	>0,999	-28.8	7.7
	Lesão + Matrigel + Células EMSC	Pré - 4 semanas	28.0	5.7	<0,001	9.8	46.2
		Pré - 6 semanas	5.1	5.9	>0,999	-13.6	23.9
		4 semanas - 6 semanas	-22.8	5.7	0.002	-41.1	-4.6
	Pré	Só Lesão - Lesão + Matrigel	0.1	5.5	>0,999	-17.5	17.7
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-1.2	5.8	>0,999	-19.7	17.2
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-1.3	5.7	>0,999	-19.4	16.8
	4 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	27.8	13.8	>0,999	-16.4	72.0
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	30.0	13.8	>0,999	-13.9	74.0
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	2.2	6.4	>0,999	-18.2	22.7
	6 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	-4.5	5.5	>0,999	-22.2	13.1
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-14.6	5.8	0.411	-33.1	3.9
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-10.1	5.7	>0,999	-28.1	8.0

Continua

Variável	Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	Continuação IC (95%)	
						Inferior	Superior
Escorregões (%)	Só Lesão	Pré - 4 semanas	-88.6	9.5	<0,001	-119.1	-58.1
		Pré - 6 semanas	-8.2	9.4	>0,999	-38.4	22.0
		4 semanas - 6 semanas	80.4	9.5	<0,001	49.9	110.9
	Lesão + Matrigel	Pré - 4 semanas	-37.8	9.1	0.001	-67.0	-8.6
		Pré - 6 semanas	-4.4	9.0	>0,999	-33.3	24.5
		4 semanas - 6 semanas	33.4	9.1	0.009	4.2	62.6
	Lesão + Matrigel + Células EMSC	Pré - 4 semanas	-26.2	10.0	0.316	-58.2	5.8
		Pré - 6 semanas	-3.4	9.9	>0,999	-35.1	28.2
		4 semanas - 6 semanas	22.8	10.0	0.820	-9.2	54.8
	Pré	Só Lesão - Lesão + Matrigel	0.5	9.2	>0,999	-29.0	30.1
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	1.1	9.7	>0,999	-29.9	32.0
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	51.3	9.2	<0,001	21.8	80.9
	4 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	63.4	9.7	<0,001	32.5	94.3
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	4.4	9.2	>0,999	-25.2	33.9
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	5.8	9.7	>0,999	-25.1	36.7
	6 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	0.5	9.5	>0,999	-29.8	30.8
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	12.1	9.5	>0,999	-18.2	42.4
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	1.5	9.5	>0,999	-28.8	31.8
Erros (%)	Só Lesão	Pré - 4 semanas	-90.3	8.5	<0,001	-117.5	-63.1
		Pré - 6 semanas	-10.3	9.1	>0,999	-39.5	18.9
		4 semanas - 6 semanas	80.0	8.5	<0,001	52.8	107.2
	Lesão + Matrigel	Pré - 4 semanas	-43.9	8.1	<0,001	-69.9	-17.9
		Pré - 6 semanas	-9.5	8.8	>0,999	-37.5	18.5
		4 semanas - 6 semanas	34.4	8.1	0.001	8.4	60.4
	Lesão + Matrigel + Células EMSC	Pré - 4 semanas	-18.7	8.9	>0,999	-47.2	9.8
		Pré - 6 semanas	-1.7	9.6	>0,999	-32.4	28.9

Variável	Grupo/Momento	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	Conclusão	
						IC (95%)	
						Inferior	Inferior
Erros (%)	Lesão + Matrigel + Células EMSC	4 semanas - 6 semanas	17.0	8.9	>0,999	-11.5	45.5
		Só Lesão - Lesão + Matrigel	-0.6	9.1	>0,999	-29.6	28.3
	Pré	Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	0.2	9.5	>0,999	-30.1	30.5
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	45.8	9.1	<0,001	16.8	74.7
	4 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel	71.7	9.5	<0,001	41.4	102.1
		Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	0.2	9.1	>0,999	-28.8	29.2
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	8.8	9.5	>0,999	-21.5	39.1
		Só Lesão - Lesão + Matrigel	0.8	9.3	>0,999	-28.9	30.5
	6 semanas	Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	26.0	9.3	0.187	-3.7	55.7
		Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	8.6	9.3	>0,999	-21.1	38.3

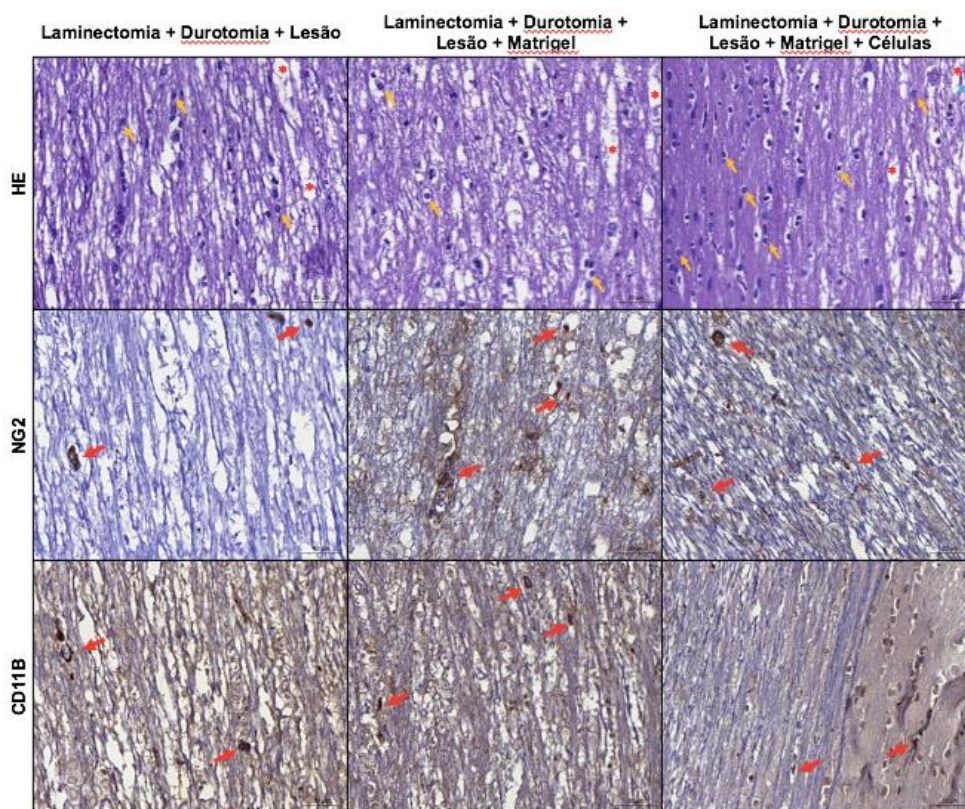
Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

5.2 Análises histológicas e de imunohistoquímica

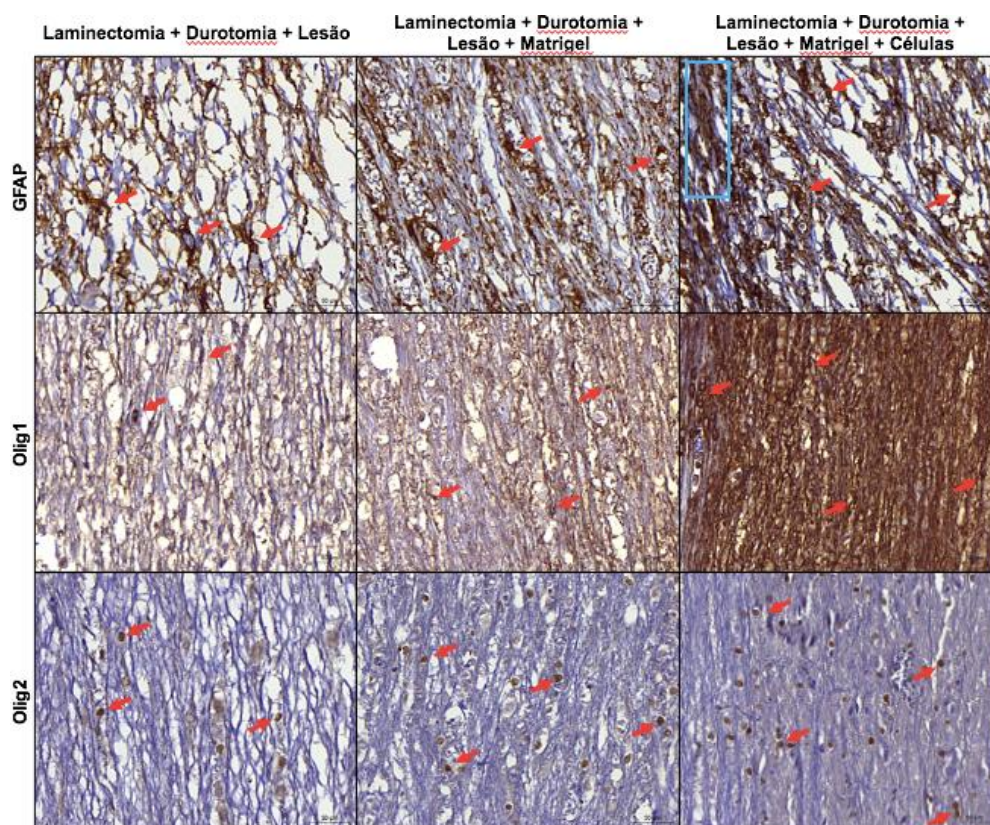
Foram realizadas análises histológicas da medula espinal, depois da eutanásia que ocorreu 42 dias após a contusão. O grupo 3 (controle) foi a referência para descrever a cicatrização espontânea da lesão avaliada pela coloração HE. Neste grupo, o exame histológico da medula espinal revelou uma arquitetura fibrilar esparsa e desorganização no local da lesão. Além disso, foram observadas regiões de vacuolização na substância branca; entretanto, não havia evidências de necrose, hemorragia ou edema (Figuras 5 e 6). Nos animais tratados com Matrigel, o exame histológico revelou alterações teciduais leves em comparação ao grupo controle (não tratado). Houve vacuolização na substância branca perilesional, mas não foi observada necrose significativa. Na análise histológica do grupo tratado com células-tronco, observou-se uma população mais densa de células gliais, juntamente com áreas de vacuolização. De modo notável, algumas bordas dessas áreas mostravam núcleos achatados.

Figura 5 – Painel de Histologia da Medula Espinal nos Grupos Experimentais, com amostras representativas de tecido medular com lesão; lesão e Matrigel; e lesão, Matrigel e células ectomesenquimais, após 6 semanas.



Fonte: Arquivo pessoal do autor
Barras de escala: 50 µm.

Figura 6 – Painel de Imunohistoquímica da Medula Espinal nos Grupos Experimentais, com amostras representativas de tecido medular com lesão; lesão e Matrigel; e lesão, Matrigel e células ectomesenquimais, após 6 semanas.



Fonte: Arquivo pessoal do autor
Barras de escala: 50 µm.

Os resultados de imunohistoquímica para o grupo 3 indicaram baixos níveis de expressão dos marcadores de linhagem glial e de oligodendrócitos. Astrócitos GFAP-positivos eram escassos e exibiam morfologia estelar típica. Microglia e macrófagos (CD11B-positivos) estavam presentes em pequeno número e apresentavam morfologia ramificada de repouso. A imunorreatividade para Olig1, Olig2 e NG2 foi mínima, com distribuição dispersa de células da linhagem de oligodendrócitos e de células precursoras de oligodendrócitos.

Para o grupo 4, a imunorreatividade para GFAP estava moderadamente aumentada ao redor do canal central e em áreas perivasculares, indicando astroglioses reativas iniciais. A microglia CD11B-positiva apresentou hipertrofia leve, sugerindo uma resposta inflamatória sutil. Além disso, o número de células positivas para Olig1, Olig2 e NG2 foi ligeiramente maior do que nos controles, indicando um recrutamento modesto de células da linhagem de oligodendrócitos.

A imunohistoquímica do tecido de animais do grupo 5 revelou uma forte resposta de células gliais e progenitoras. Os astrócitos GFAP-positivos estavam significativamente aumentados, apresentando morfologia hipertrófica e formando uma densa cicatriz glial na borda da lesão, caracterizada por intensa marcação. Além disso, a imunorreatividade para CD11B estava aumentada, com microglia/macrófagos ativados exibindo morfologia ameboide tanto no epicentro da lesão quanto nas regiões perilesionais. A expressão de Olig1 e Olig2 aumentou de forma acentuada próxima à lesão, indicando recrutamento e proliferação de células da linhagem de oligodendrócitos.

Após a atribuição dos escores imunohistoquímicos, comparamos a intensidade da imunomarcação entre os grupos. Os resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa na expressão de Olig1, com valor de $p = 0,019$ (Kruskal-Wallis). Essa diferença foi posteriormente analisada por meio das comparações múltiplas de Dunn, revelando a diferença real nos níveis de expressão entre o grupo controle (não tratado) e o grupo tratado com células-tronco ($p = 0,045$) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Descrição dos dados de imunohistoquímica segundo grupos e resultado das comparações.

Variável	Grupo			Total (N = 15)	p
	Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 5)	Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 5)	Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 5)		
NG2					0.188
Negativo	1 (20)	0 (0)	1 (20)	2 (13,3)	
0% a 25%	2 (40)	0 (0)	1 (20)	3 (20)	
25% a 50%	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33,3)	
50% a 75%	0 (0)	2 (40)	1 (20)	3 (20)	
75% a 100%	1 (20)	1 (20)	0 (0)	2 (13,3)	
GFAP					0.104
25% a 50%	4 (80)	2 (40)	1 (20)	7 (46,7)	
50% a 75%	1 (20)	3 (60)	2 (40)	6 (40)	
75% a 100%	0 (0)	0 (0)	2 (40)	2 (13,3)	
OLIG2					0.101
Negativo	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)	
25% a 50%	2 (40)	0 (0)	1 (20)	3 (20)	
50% a 75%	2 (40)	4 (80)	2 (40)	8 (53,3)	
75% a 100%	0 (0)	1 (20)	2 (40)	3 (20)	
CD11B					0.106
Negativo	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)	
0% a 25%	4 (80)	4 (80)	2 (40)	10 (66,7)	
25% a 50%	0 (0)	0 (0)	3 (60)	3 (20)	
50% a 75%	0 (0)	1 (20)	0 (0)	1 (6,7)	
OLIG1					0.019
Negativo	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)	
25% a 50%	3 (60)	1 (20)	0 (0)	4 (26,7)	
50% a 75%	1 (20)	3 (60)	2 (40)	6 (40)	
75% a 100%	0 (0)	1 (20)	3 (60)	4 (26,7)	

Dados expressos como n (%); Teste Kruskal-Wallis

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 7 – Resultado das comparações múltiplas do OLIG1 entre os grupos.

Comparação	Valor Z	p
Só Lesão - Lesão + Matrigel	-1.20	0.229
Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-2.00	0.045
Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-0.80	0.423

Comparações múltiplas de Dunn

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Ainda nas Figuras 5 e 6, a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) revelou uma arquitetura fibrilar esparsa no grupo controle (animais não tratados). Os animais tratados com Matrigel apresentaram vacuolização (asterisco) na substância branca perilesional. Os animais que receberam tratamento com células-tronco exibiram uma população mais densa de células gliais (setas laranja), embora também tenha sido observada vacuolização (asterisco) nesse grupo, com núcleos achatados (triângulo azul) observados em algumas bordas.

A análise imunohistoquímica indicou presença principalmente mínima (<25%) ou reduzida (<50%) de astrócitos GFAP+, microglia CD11B+ e células da linhagem de oligodendrócitos Olig1+, Olig2+ e NG2+ no grupo controle não tratado. O tratamento com Matrigel resultou em aumento moderado da expressão de astrócitos GFAP+ (setas vermelhas) e um modesto incremento no recrutamento de células da linhagem de oligodendrócitos; entretanto, o padrão de marcação de CD11B permaneceu semelhante ao do grupo controle. No grupo tratado com células-tronco, astrócitos GFAP+ formaram cicatrizes gliais densas na borda da lesão (retângulo azul), enquanto a microglia CD11B+ exibiu morfologia ameboide (setas vermelhas), indicando forte ativação inflamatória. Além disso, houve um aumento acentuado de células Olig1+, Olig2+ e NG2+ nas áreas perilesionais, consistente com o recrutamento de precursores de oligodendrócitos e tentativas de remielinização. A pontuação semiquantitativa (escala de 0–4) revelou uma diferença significativa na imunorreatividade para Olig1 ($p = 0,019$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A lesão medular é uma condição incapacitante, irreversível e de elevado impacto econômico e social. Está associada a efeitos devastadores sobre a qualidade de vida dos pacientes, levando a diversos distúrbios fisiopatológicos nos diversos sistemas biológicos. A gravidade dessas alterações está diretamente relacionada ao grau de comprometimento neurológico. Esta lesão existe no contexto de compressão, contusão ou transecção da medula e sua principal causa é o trauma, embora possa também resultar de processos infecciosos, vasculares, inflamatórios, neoplásicos ou de origem iatrogênica²⁰⁷. O manejo clínico desses pacientes ainda representa um desafio significativo atualmente.

No presente estudo, foi induzida uma contusão na medula espinal de ratos nos segmentos T8–T9, caracterizada como uma lesão aguda de intensidade moderada. Para o tratamento, empregou-se o biomaterial Matrigel® associado a neuroesferas derivadas de CEs coletadas a partir do septo nasal de ratos Wistar pesando entre 250 e 300g e com 6 a 8 semanas de vida, transplantadas imediatamente após a indução da lesão. O modelo experimental selecionado foi o de lesão medular por queda de massa (*MASCIS Impactor NYU, 1992*), aplicado em ratos Wistar, por promover um padrão de lesão uniforme entre os animais.

A opção por uma lesão torácica de intensidade moderada (12,5 mm), baseada na técnica descrita por Rodrigues, foi fundamentada no desempenho funcional observado¹⁷⁸. Após a contusão provocada pela queda da haste a partir de altura de 12,5 mm, os animais tornaram-se paraplégicos, mas preservaram capacidade motora suficiente para alimentação e hidratação, o que possibilitou a análise da função residual. O sistema de impacto permite ajuste para alturas de 6,25, 12,5, 25 e 50 mm. Impactos de 50 mm resultam em paraplegia com elevada mortalidade na primeira semana pós-operatória, enquanto quedas de 6,25 mm levam à recuperação funcional quase completa em até dez dias, independentemente de qualquer intervenção terapêutica^{175,181,208-211}.

A escala BBB é amplamente utilizada em centros de pesquisa que empregam o *MASCIS NYU Impactor*. Assim como o próprio equipamento, ela possibilita a padronização metodológica e a comparação entre resultados experimentais. Entre suas vantagens, destaca-se a rápida e objetiva avaliação visual realizada por dois observadores cegos. Conforme descrito por Basso et al., em caso de divergência entre as pontuações, deve-se adotar o menor valor¹⁶. A escala BBB apresenta excelente reprodutibilidade e definição precisa, favorecendo análises mais criteriosas do desempenho motor.

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o desempenho funcional como desfecho principal na análise da terapia celular experimental em um modelo animal de lesão medular, já consolidado em nosso laboratório. Estudos prévios sobre o transplante de células-tronco neurais não modificadas geneticamente em ratos também relataram resultados funcionais relevantes¹⁴⁷.

Coletar a mucosa olfatória, que contém as células-tronco mesenquimais, é um desafio. Sua localização, nos confins de uma cavidade adornada por turbinas labirínticas, faz com que a biópsia deste tecido seja dificultada em animais do porte dos roedores. Na literatura, há relato de protocolo para coleta *in vivo* de amostra da mucosa olfatória, mas as dimensões reduzidas do animal e a complexidade do procedimento inibem sua realização de modo prático e rotineiro²¹².

Os métodos *post-mortem* aplicados são os mais frequentemente utilizados, mas ainda engenhosos e demorados, o que se transcreve em um desafio para células tão sensíveis quanto as de que tratamos. As células-tronco mesenquimais devem ser coletadas em um curto período de tempo após a morte do animal doador, sendo necessário valer-se de método simples, rápido e eficaz para sua adequada coleta e posterior processamento. É importante, ainda, evitar-se a contaminação hemorrágica, um problema frequente em alguns protocolos¹³².

Para a obtenção das células de interesse de nosso estudo, houve a necessidade de padronizar a obtenção do septo nasal em que elas se localizam. Identificamos algumas técnicas já existentes na literatura, mas que apresentavam como principal problema a contaminação hemorrágica comprometendo a viabilidade do tecido coletado e por consequência, das células obtidas. Desse modo, desenvolvemos técnica própria que rendeu publicação anteriormente exposta.

Stamegna et al. (2014)²¹² propuseram um protocolo para biópsia *in vivo* da mucosa olfatória, no qual todos os animais se recuperaram imediatamente após a cirurgia, sem sinais de dor ou desconforto. Embora a coleta de amostras da mucosa olfatória em animais vivos seja relativamente rápida, o método mostrou-se complexo para o isolamento rotineiro de células-tronco da mucosa olfatória.

Embora frequentemente empregados, os métodos para obtenção da mucosa olfatória em roedores pós-morte ainda são engenhosos e demorados, o que representa um desafio para a viabilidade celular. Tomé et al. (2009)¹²⁴ propuseram uma técnica *post-mortem* para obtenção do tecido de ratos, com decapitação e incisão sagital, que resultou em células viáveis para cultivo com sucesso. A natureza cartilaginosa dos ossos permite a incisão descrita pelos autores

sem grandes dificuldades; entretanto, em ratos adultos, o procedimento torna-se mais difícil de executar.

Girard et al. (2011)¹³² descreveram uma técnica *post-mortem* para obtenção da mucosa nasal de ratos adultos, em estudo que visava o cultivo de células-tronco olfatórias de roedores ou humanos. Todo o procedimento foi concluído em até dez minutos após a eutanásia, a fim de evitar danos estruturais e alterações biológicas na mucosa. Segundo os autores, o protocolo, embora funcional, exige tempo excessivo. Além disso, a decapitação do animal aumenta o risco de hemorragia ascendente nas vias respiratórias superiores, com consequente aumento da contaminação dos recessos e da mucosa olfatória.

Ercolin et al. (2016)²¹³ descreveram uma técnica de dissecação *post-mortem* em embriões de coelho, que também pode ser aplicada a roedores. O septo nasal foi acessado por meio de uma incisão sagital, e o tecido foi fragmentado sem o isolamento completo do septo nasal. De forma semelhante a Tomé et al. (2009)¹²⁴, a técnica é de difícil aplicação em animais adultos devido à maior resistência óssea.

Alvites et al. (2018)¹³³ descreveram uma técnica de dissecação *post-mortem* da cavidade nasal de ratos. A etapa mais longa da dissecação envolveu o corte da prega alar, estendendo-se ao longo da parede nasal lateral. Ao final, toda a cavidade nasal, bem como o recesso olfatório e a mucosa correspondente, foram expostos caudalmente. Quando a mucosa olfatória se tornava evidente, a coleta deveria ser realizada com cautela. O epitélio que revestia o recesso olfatório e parte do septo nasal foi destacado com uma pinça atraumática.

Ao tentar reproduzir essa técnica, encontramos dificuldades na obtenção de amostras não contaminadas. A hemorragia foi um problema, e o cultivo celular subsequente apresentou limitações de viabilidade. Portanto, introduzimos inovações no procedimento para obtenção do septo nasal, sendo a craniotomia assistida por uma broca diamantada de alta rotação o passo principal. Em seguida, realizou-se a osteotomia na linha média do crânio e dos ossos nasais, com isolamento do septo nasal e sangramento mínimo, conforme descrito.

A Tabela 8 traz um resumo das alternativas técnicas possíveis para obtenção do tecido de interesse.

Tabela 8 – Análise comparativa das técnicas para obtenção de tecido do septo nasal de roedores.

Referência	Animais	Craniotomia	Acesso ao septo nasal	Isolamento do tecido
Anexo C	Ratos adultos	Sim, broca diamantada a 80.000 rpm	Incisão sagital	Excisão tecidual
Stamegna et al. (2014) ²¹²	Ratos com 10 semanas ¹	Sim	Com broca guiada, fazendo janela anterior à placa cribriforme	Biópsia de mucosa olfatória com micro-fórceps
Tomé et al. (2009) ¹²⁴	Ratos em E15, P7 e adultos	Não	Decapitação e incisão sagital	Microdissecção seguida de dissociação química
Girard et al. (2011) ¹³²	Ratos adultos	Não	Decapitação e remoção dos músculos faciais e das turbinas olfatórias	Dissecação com agulha da mucosa olfatória septal seguindo referências ósseas
Ercolin et al. (2016) ²¹³	Coelhos com 3 dias de vida	Não	Decapitação e incisão sagital	Coleta por fragmentação do epitélio olfatório
Alvites et al. (2018) ¹³³	Ratos adultos	Não	Incisão longitudinal bilateral ao longo da parede lateral da cavidade nasal	Microdissecação atraumática com pinça

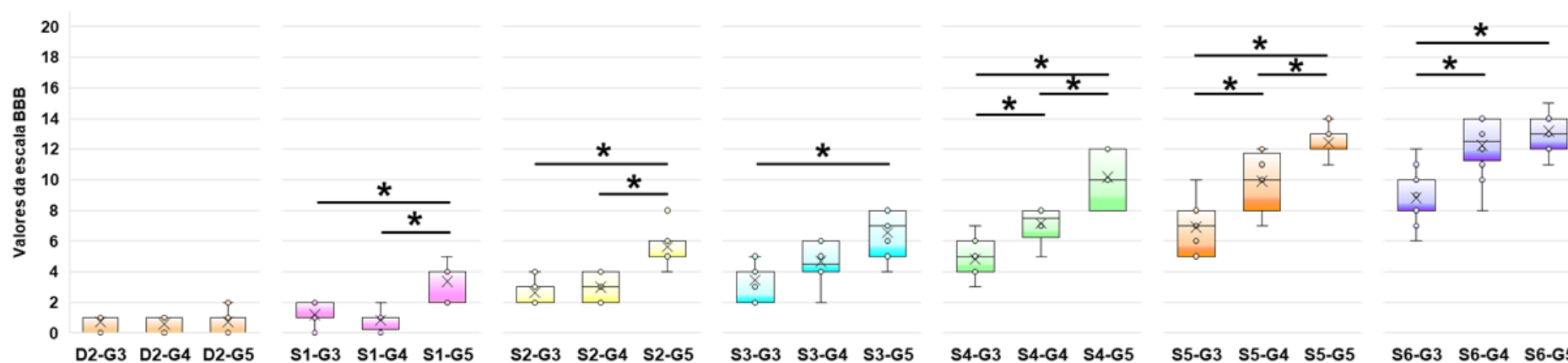
¹*In vivo***Fonte:** Arquivo pessoal do autor

Animais dos grupos 1 e 2 não sofreram a contusão da medula espinal. Em ambos os grupos, a função motora foi mantida com valores máximos na escala BBB (Gráfico 1) nos sujeitos de pesquisa. Esse dado é animador pois a durotomia não vinha sendo realizada nos trabalhos prévios desta mesma linha de pesquisa e consiste em um avanço técnico que viabiliza a comprovação mais efetiva do estabelecimento de via de chegada das células e do veículo ao sítio lesional nos grupos que contarão com esta intervenção.

A partir dos dados organizados e expostos nos resultados, podemos realizar algumas análises que permitem conclusões sobre os experimentos realizados.

A Tabela 1 mostra que o comportamento médio do BBB nos grupos foi estatisticamente diferente ao longo dos momentos de avaliação ($p_{\text{Interação}} < 0,001$). Já a Tabela 2 mostra que todos os grupos melhoraram em média o BBB ao longo do seguimento ($p < 0,001$), mas em 3 semanas o grupo que recebeu neuroesferas de CEs apresentou em média resultado do BBB estatisticamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$) e em 6 semanas apenas o grupo 3 (lesão) apresentou resultado em média estatisticamente inferior que os demais grupos ($p < 0,001$). Estes dados são importantes pois demonstram a dinâmica de evolução cicatricial da medula, que é esperada após o contexto lesional, e também demonstram de maneira importante que a evolução funcional foi melhor no grupo que recebeu matrigel isoladamente e melhor ainda no grupo que recebeu células (Gráficos 2 e 7).

Gráfico 7 – Valores da escala BBB para cada momento do estudo (D2, S1 - S6) permitindo a comparação entre os grupos (G3, G4 e G5) a cada momento. No box plot, X representa a mediana. Pequenos círculos indicam valores discrepantes e valores internos. Cada caixa colorida indica os valores do primeiro e terceiro interquartis. Os valores mínimo e máximo estão indicados (*) $P < 0,05$ para o pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni.



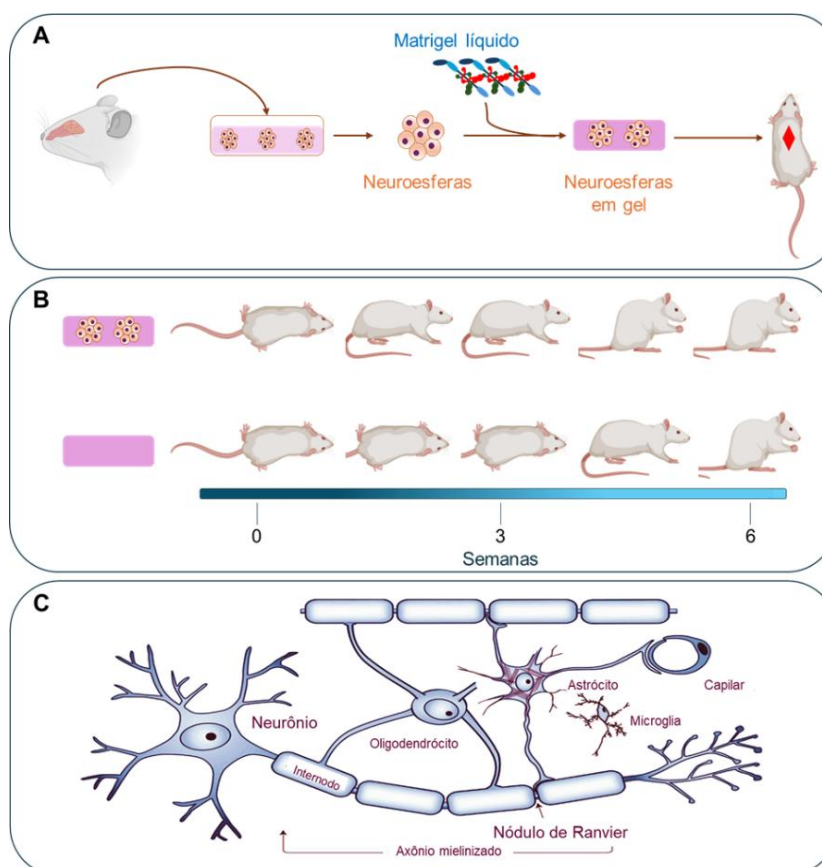
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Diversos tipos de meios ou veículos têm sido utilizados em associação com células-tronco para investigar a recuperação motora em modelos experimentais de lesão medular^{149-152,214,215}. O Matrigel® favorece a diferenciação de múltiplos tipos celulares e o crescimento de células diferenciadas a partir de explantes teciduais. Linhagens celulares primárias e estabelecidas adquirem um fenótipo mais diferenciado quando em contato com o Matrigel®, o que estimula o contato célula-célula e a agregação celular¹⁵⁴. Além disso, o Matrigel® contribui para a sobrevivência celular, migração e crescimento de prolongamentos neurais, além de reduzir a resposta imune ao enxerto.

Sabe-se que o Matrigel® apresenta uma composição variável de componentes da matriz extracelular e de fatores de crescimento residuais. O produto utilizado neste estudo possui teor reduzido, mas não completamente isento, desses fatores. Combinações específicas de fatores de crescimento e Matrigel® podem induzir neurogênese *in vitro*. A resposta do tecido medular lesionado ao Matrigel®, com ou sem o uso de células-tronco, depende do lote do material, do microambiente local e do protocolo cirúrgico aplicado. A investigação de tais fatores em modelos animais é essencial para identificar moléculas que desempenham papéis reguladores na resposta inflamatória e imune, bem como na mobilização de células-tronco endógenas envolvidas no processo de reparo^{216,217}.

As terapias celulares aplicadas à lesão medular que demonstram melhora funcional no período pós-operatório provavelmente atuam por meio de um efeito parácrino, mediado pela secreção de fatores tróficos capazes de modular o microambiente lesional. Alterações na expressão gênica, tanto em nível de mRNA quanto proteico, já foram observadas no local da lesão poucos dias ou semanas após o transplante de células-tronco neurais²¹⁸. Esses achados sugerem que um conjunto de fatores secretados — incluindo pequenas moléculas solúveis e longas cadeias de componentes da matriz extracelular — exerce papel essencial na mediação do reparo e regeneração bem-sucedidos da medula espinal lesionada²¹⁹. Nossos resultados reforçam a hipótese de um efeito parácrino como principal mecanismo subjacente (Figura 7, Anexo D).

Figura 7 – Diagramas ilustrativos dos procedimentos e dados obtidos neste trabalho. (A) Diagrama da obtenção de neuroesferas a partir da mucosa olfatória de ratos, sua introdução em Matrigel® líquido e gelificação a temperatura ambiente e enxerto aos animais que sofreram LME. (B) Ratos que receberam neuroesferas em Matrigel® apresentaram melhores funções motoras do que os que receberam somente Matrigel®. À sexta semana, suas funções motoras não diferiram entre os dois grupos. (C) Representação esquemática dos principais elementos celulares da substância branca. Neste desenho, o corpo celular de um neurônio na substância cinzenta estende vários processos dendríticos curtos e um único processo axonal longo. O axônio, na substância branca, é circundado por uma bainha de mielina isolante. Essa bainha é produzida pelos oligodendrócitos. Geralmente, os oligodendrócitos estendem muitos processos, cada um dos quais envolve um segmento do axônio para formar um internodo. Os internodos são separados uns dos outros por pequenas regiões amielinizadas chamadas nódulos de Ranvier. Essa organização especializada das bainhas de mielina promove a condução saltatória, na qual os impulsos elétricos "saltam" de nódulo para nódulo à medida que percorrem o axônio, do corpo celular do neurônio até a terminação axonal. A substância branca também contém astrócitos e microglia. Os astrócitos são células gliais em forma de estrela que ajudam a manter a homeostase, regulando as concentrações iônicas locais e o volume do fluido extracelular dentro do SNC. Na substância branca, estendem prolongamentos até os nódulos de Ranvier e os vasos sanguíneos, onde contribuem para a função da barreira hematoencefálica. As células da microglia, consideradas as células imunes do SNC, ajudam a remover detritos e células mortas²²⁰.



Fonte: (A e B) Criado por Biorender.com, modificado. (C) Edgar e Griffiths (2014)²²⁰, modificado.

Pela Tabela 9, tem-se que a variação percentual média do peso dos animais não diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,896$), dado que mostra uniformidade na capacidade de os animais se alimentarem e sobreviverem após a lesão experimental.

Tabela 9 – Descrição dos pesos dos animais segundo grupos no início e ao final do estudo e das variações de peso e resultado das comparações das variações entre os grupos.

Grupo	Peso Inicial	Peso Final	Peso (%)
Laminectomia (N = 12)			
média $\pm$ DP	306,4 $\pm$ 16,6	330 $\pm$ 16	7,8 $\pm$ 3,1
mediana (p25; p75)	310 (289,3; 320)	323 (321,3; 344,8)	8,2 (4,4; 10,7)
Laminectomia + Durotomia Micro (N = 11)			
média $\pm$ DP	293,3 $\pm$ 20,2	317,2 $\pm$ 19,5	8,3 $\pm$ 4,1
mediana (p25; p75)	300 (280; 305)	320 (306; 325)	8,3 (4,2; 10,9)
Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 11)			
média $\pm$ DP	290,1 $\pm$ 37	313,4 $\pm$ 33,8	8,3 $\pm$ 4,2
mediana (p25; p75)	298 (265; 321)	312 (288; 344)	7,9 (4,7; 13,1)
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 12)			
média $\pm$ DP	293,6 $\pm$ 14,8 296,5 (280,5;	320,7 $\pm$ 20,5	9,2 $\pm$ 3
mediana (p25; p75)	303,3)	319,5 (307,5; 340)	8,8 (7,1; 10,3)
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 11)			
média $\pm$ DP	300 $\pm$ 11,3	324 $\pm$ 16,6	8 $\pm$ 3,4
mediana (p25; p75)	300 (296; 304)	318 (312; 343)	7,3 (6; 10,6)
p			0.896

ANOVA

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Já a Tabela 10 mostra que o tempo de presença de bexiga neurogênica entre os grupos com lesão diferiu estatisticamente ($p = 0,002$). E que este tempo foi menor nos grupos que receberam como intervenção matrigel isolado ou com células ectomesenquimais. Pela Tabela 11, tem-se que no grupo controle (só lesão) o tempo de bexiga neurogênica foi estatisticamente maior que nos demais grupos ($p < 0,05$). Esses dados também coadunam com os dados funcionais da escala BBB, mostrando maior reabilitação nos animais que receberam matrigel ou matrigel em associação com as células ectomesenquimais. Os dados brutos de análise da

escala BBB e bexiga neurogênica podem ser encontrados nos Anexos E e F desta tese, respectivamente.

Tabela 10 – Descrição do tempo de bexiga neurogênica presente segundo grupos e resultado da comparação.

Variável	Laminectomia	Laminectomia + Durotomia Micro	Laminectomia + Durotomia + Lesão	Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel	Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC	p
Bexiga neurogênica (dias até ausente)						0.002
média ± DP	0 ± 0	0 ± 0	35 ± 3,1	24,5 ± 8,2	24,8 ± 8,5	
mediana (p25; p75)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	35 (35; 35)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	

Na análise foram considerados os grupos 3, 4 e 5; Teste Kruskal-Wallis

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 11 – Resultado das comparações múltiplas entre os grupos do tempo de bexiga neurogênica.

Comparação	Valor Z	p
Só Lesão - Lesão + Matrigel	2.85	0.004
Só Lesão - Lesão + Matrigel + Células EMSC	2.71	0.007
Lesão + Matrigel - Lesão + Matrigel + Células EMSC	-0.08	0.935

Comparações múltiplas de Dunn

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Analisando os dados referentes à análise do plano horizontal, as Tabelas 12 e 13 mostram que os acertos, escorregões e erros percentuais apresentaram comportamentos médios dos grupos estatisticamente diferentes ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Interação}} = 0,05$), já os passos diferiram ao longo dos momentos de avaliação apenas independente do grupo ($p_{\text{Momento}} < 0,001$).

Tabela 12 – Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.

Variável/Grupo	Momento					p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas			
Passos						0.067	<0,001	0.446
Laminectomia (N = 12)								
média ± DP	45,9 ± 1,8	43,7 ± 1,2	42,1 ± 2,1	44,7 ± 4,1	43,5 ± 2,2			
mediana (p25; p75)	46 (44,3; 48)	44 (43; 44,8)	43 (40,3; 44)	44 (41,3; 47,3)	43,5 (42; 45)			
Laminectomia + Durotomia Micro (N = 11)								
média ± DP	46,6 ± 1,5	44,7 ± 4,3	43,1 ± 1,6	43,6 ± 2,2	41,5 ± 2,3			
mediana (p25; p75)	47 (45; 48)	44 (41; 48)	43 (42; 44)	43 (42; 45)	43 (39; 43)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 11)								
média ± DP	46,3 ± 1,8	0 ± 0	0,2 ± 0,6	1,5 ± 2,5	6,2 ± 2,3			
mediana (p25; p75)	46 (45; 48)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 4)	6 (4; 8)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 12)								
média ± DP	46,1 ± 2,2	0 ± 0	2,7 ± 2,5	4,7 ± 2,6	9,5 ± 3			
mediana (p25; p75)	46 (44; 48)	0 (0; 0)	2 (0; 5,5)	4 (2,5; 7,5)	10 (6,3; 12)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 10)								
média ± DP	44,9 ± 2,5	0 ± 0	4 ± 2,3	6,6 ± 4,1	10,8 ± 2,6			
mediana (p25; p75)	45,5 (42,8; 47)	0 (0; 0)	4 (2; 6)	7 (3,5; 10,5)	11 (8; 12,5)			
Acertos (%)						0.335	<0,001	0.036
Laminectomia (N = 12)								
média ± DP	98,6 ± 1,4	96,2 ± 2,4	96,4 ± 3	96,4 ± 2	97 ± 1,9			
mediana (p25; p75)	97,9 (97,7; 100)	95,5 (95,4; 97,7)	97,6 (93,5; 97,7)	95,5 (95,1; 97,7)	97,6 (95,5; 97,8)			

Continua

						Conclusão		
Variável/Grupo	Momento					p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas			
Laminectomia + Durotomia Micro (N = 11)								
média ± DP	97,3 ± 1,9	96,4 ± 2,1	97,1 ± 2,1	97,2 ± 2,2	95,8 ± 2,8			
mediana (p25; p75)	95,9 (95,7; 100)	95,6 (95; 97,8)	95,6 (95,5; 100)	97,6 (95,5; 100)	97,6 (93; 97,7)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 11)								
média ± DP	97,1 ± 1,5	0 ± 0	9,1 ± 30,2	25,8 ± 44,3	78,5 ± 21,1			
mediana (p25; p75)	97,8 (95,7; 97,9)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 83,3)	80 (50; 100)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 12)								
média ± DP	97 ± 2,3	0 ± 0	48,6 ± 39,1	81,9 ± 30,3	83,1 ± 13,8			
mediana (p25; p75)	97,7 (95,7; 98)	0 (0; 0)	58,3 (0; 75)	100 (75; 100)	88,3 (67,9; 92,1)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 10)								
média ± DP	98,3 ± 2	0 ± 0	63,3 ± 28,9	80,2 ± 31,6	93,1 ± 9,3			
mediana (p25; p75)	98,9 (95,8; 100)	0 (0; 0)	66,7 (50; 81,3)	95,8 (71,3; 100)	96,7 (88,9; 100)			

Na análise foram considerados os grupos 3, 4 e 5 e os momentos pré, 4 semanas e 6 semanas; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 13 – Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.

Variável/Grupo	Momento					P Grupo	P Momento	P Interação
	Pré	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas			
Escorregões (%)						<0,001	<0,001	<0,001
Laminectomia (N = 12)								
média ± DP	1,4 ± 1,4	1,7 ± 2	2,2 ± 2,1	2,4 ± 1,7	1,7 ± 1,7			
mediana (p25; p75)	2,1 (0; 2,3)	2,2 (0; 2,3)	2,3 (0; 2,5)	2,3 (0,5; 4,1)	2,2 (0; 2,4)			
Laminectomia + Durotomia Micro (N = 11)								
média ± DP	2,3 ± 1,8	2,2 ± 1,6	1,1 ± 1,2	1,4 ± 1,5	2,5 ± 1,7			
mediana (p25; p75)	2,1 (0; 4,3)	2,2 (0; 3,8)	0 (0; 2,3)	2,2 (0; 2,3)	2,3 (2,3; 2,6)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 11)								
média ± DP	2,3 ± 1,1	100 ± 0	90,9 ± 30,2	74,2 ± 44,3	10,5 ± 9,6			
mediana (p25; p75)	2,2 (2,1; 2,3)	100 (100; 100)	100 (100; 100)	100 (16,7; 100)	12,5 (0; 16,7)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 12)								
média ± DP	1,8 ± 1,8	100 ± 0	39,6 ± 45,4	13,5 ± 28,9	6,2 ± 7			
mediana (p25; p75)	2,1 (0; 2,3)	100 (100; 100)	16,7 (0; 100)	0 (0; 21,9)	4,2 (0; 13,2)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 10)								
média ± DP	1,3 ± 1,5	100 ± 0	27,5 ± 34,3	13,8 ± 31,4	4,7 ± 5,4			
mediana (p25; p75)	1 (0; 2,2)	100 (100; 100)	12,5 (0; 50)	0 (0; 15,6)	3,3 (0; 9,3)			
Erros (%)						<0,001	<0,001	<0,001
Laminectomia (N = 12)								
média ± DP	0 ± 0	2,1 ± 1,5	1,4 ± 1,6	1,3 ± 1,1	1,3 ± 1,2			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0)	2,3 (0,6; 2,4)	1,1 (0; 2,5)	1,9 (0; 2,3)	2,2 (0; 2,3)			

Continua

Variável/Grupo	Momento					Conclusão		
	Pré	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas	P Grupo	P Momento	P Interação
Laminectomia + Durotomia Micro (N = 11)								
média ± DP	0,4 ± 0,9	1,4 ± 1,1	1,9 ± 1,7	1,4 ± 1,1	1,8 ± 1,9			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0)	2 (0; 2,3)	2,3 (0; 2,4)	2,2 (0; 2,3)	2,3 (0; 2,6)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão (N = 11)								
média ± DP	0,6 ± 1	100 ± 0	90,9 ± 30,2	72,7 ± 46,7	10,9 ± 14,6			
mediana (p25; p75)	0 (0; 2,1)	100 (100; 100)	100 (100; 100)	100 (0; 100)	0 (0; 25)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel (N = 12)								
média ± DP	1,2 ± 1,1	100 ± 0	45,1 ± 43	12,8 ± 28,7	10,7 ± 11,4			
mediana (p25; p75)	2 (0; 2,1)	100 (100; 100)	29,2 (4,2; 100)	0 (0; 15,6)	9,5 (0; 16,1)			
Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC (N = 10)								
média ± DP	0,4 ± 0,9	100 ± 0	19,2 ± 31,9	16,1 ± 32	2,1 ± 4,8			
mediana (p25; p75)	0 (0; 0,5)	100 (100; 100)	0 (0; 33,3)	0 (0; 19,4)	0 (0; 1,8)			

Na análise foram considerados os grupos 3, 4 e 5 e os momentos pré, 4 semanas e 6 semanas; EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A Tabela 5 mostra que os passos médios diminuíram estatisticamente do pré para os demais momentos avaliados em todos os grupos ($p < 0,001$) e aumentaram novamente de 4 para 6 semanas ($p < 0,001$). Os escorregões e erros percentuais foram em média estatisticamente maiores na semana 4 que no pré e 6ª semana ($p < 0,05$), havendo maior média estatisticamente significativa de escorregões e erros no grupo lesão + matrigel que no grupo lesão + matrigel + células EMSC no pré e menor que no grupo só lesão em 4 semanas ($p < 0,001$). O percentual de acertos apresentou redução média estatisticamente significativa do pré para 6 semanas no grupo só lesão ($p = 0,033$), no grupo lesão + matrigel houve redução média do pré para 4 semanas apenas ($p = 0,001$) e no grupo lesão + matrigel + células EMSC houve redução média na 4ª semana em relação ao pré ($p < 0,001$), mas voltou a aumentar de 4 para 6 semanas ($p = 0,002$), porém, em nenhum momento houve diferença média estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Estes resultados elucidam, ainda que não tenha havido diferença estatística significativa, que há uma dissonância em relação aos dados analisados com a escala BBB e os dados de bexiga neurogênica. O plano horizontal é uma medida de avaliação funcional experimental com menor validação que a escala BBB e com maior variação interobservador, que pode conduzir a resultados mais imprecisos.

Seguindo a análise, observando os biomarcadores empregados na análise imunohistoquímica, de acordo com o observado na Tabela 6, tem-se que apenas o OLIG1 diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,019$) e teve sua expressão aumentada nos grupos de intervenção com matrigel isolado e com neuroesferas de CEs, sendo maior inclusive neste último grupo. A Tabela 7 mostra que o grau de OLIG1 foi estatisticamente maior no grupo lesão + matrigel + células EMSC que no grupo só lesão ($p = 0,045$). A Tabela 14 mostra que houve correlação direta estatisticamente significativa do OLIG1 com o BBB na 6ª semana e com o número de passos na 6ª semana ($r > 0,6$ e $p < 0,05$), ou seja, quanto maior o grau de OLIG1 maiores foram o número de passos e o BBB dos animais²⁰⁴⁻²⁰⁶.

Tabela 14 – Resultado das correlações dos dados de imunohistoquímica e os dados funcionais dos animais.

Correlação		NG2	GFAP	OLIG2	CD11B	OLIG1
BBB (6a semana)	r	0.065	0.219	0.395	0.381	0.633
	p	0.817	0.433	0.145	0.161	0.011
Bexiga neurogênica (dias até ausente)	r	0.197	-0.427	-0.148	-0.245	-0.490
	p	0.481	0.113	0.599	0.379	0.064
Passos (6a semana)	r	0.012	0.331	0.360	0.144	0.667
	p	0.966	0.228	0.188	0.608	0.007
Acertos (%) (6a semana)	r	-0.391	0.253	0.114	0.080	0.460
	p	0.149	0.363	0.687	0.778	0.084
Escorregões (%) (6a semana)	r	0.185	-0.325	-0.262	0.087	-0.321
	p	0.509	0.237	0.346	0.758	0.243
Erros (%) (6a semana)	r	0.449	-0.298	0.216	-0.139	-0.362
	p	0.093	0.281	0.439	0.621	0.185

Correlação de Spearman

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Este resultado é animador pois o OLIG1 é marcador de células precursoras de oligodendrócitos e de oligodendrócitos imaturos e está ligado à diferenciação e maturação de oligodendrócitos, apresentando expressão aumentada após lesão medular para promover remielinização. Isso indica que tanto matrigel quanto matrigel com as células ajudaram no processo de recuperação lesional medular, dado que pode ser correlacionado à melhora funcional observada nestes grupos conforme exposto anteriormente.

Ao realizar a análise histológica e imunohistoquímica dos sujeitos da pesquisa, pudemos avaliar conforme exposto na seção de resultados. A coloração com hematoxilina e eosina (H&E) revelou uma arquitetura fibrilar esparsa no grupo controle (animais não tratados). Os animais tratados com Matrigel apresentaram vacuolização na substância branca perilesional. Os animais que receberam tratamento com células-tronco exibiram uma população mais densa de células gliais, embora também tenha sido observada vacuolização nesse grupo, com núcleos achatados observados em algumas bordas.

A análise imunohistoquímica indicou presença principalmente mínima (<25%) ou reduzida (<50%) de astrócitos GFAP+, microglia CD11B+ e células da linhagem de oligodendrócitos Olig1+, Olig2+ e NG2+ no grupo controle não tratado. O tratamento com Matrigel resultou em aumento moderado da expressão de astrócitos GFAP+ e um modesto

incremento no recrutamento de células da linhagem de oligodendrócitos; entretanto, o padrão de marcação de CD11B permaneceu semelhante ao do grupo controle. No grupo tratado com células-tronco, astrócitos GFAP⁺ formaram cicatrizes gliais densas na borda da lesão, enquanto a microglia CD11B⁺ exibiu morfologia ameboide, indicando forte ativação inflamatória. Além disso, houve um aumento acentuado de células Olig1⁺, Olig2⁺ e NG2⁺ nas áreas perilesionais, consistente com o recrutamento de precursores de oligodendrócitos e tentativas de remielinização. A pontuação semiquantitativa (escala de 0-4) revelou uma diferença significativa na imunoreatividade para Olig1 ($p = 0,019$).

Nos animais controle (não tratados), o exame histológico da medula espinal revelou uma arquitetura fibrilar esparsa e desorganização no local da lesão. Além disso, foram observadas regiões de vacuolização na substância branca; entretanto, não havia evidências de necrose, hemorragia ou edema. Os resultados de imunohistoquímica para este grupo indicaram baixos níveis de expressão dos marcadores de linhagem glial e de oligodendrócitos. Astrócitos GFAP-positivos eram escassos e exibiam morfologia estelar típica. Microglia e macrófagos (CD11B-positivos) estavam presentes em pequeno número e apresentavam morfologia ramificada de repouso. A imunoreatividade para Olig1, Olig2 e NG2 foi mínima, com distribuição dispersa de células da linhagem de oligodendrócitos e de células precursoras de oligodendrócitos.

Nos animais tratados com Matrigel, o exame histológico revelou alterações teciduais leves em comparação ao grupo controle (não tratado). Houve vacuolização na substância branca perilesional, mas não foi observada necrose significativa. A imunoreatividade para GFAP estava moderadamente aumentada ao redor do canal central e em áreas perivasculares, indicando astroglioses reativas iniciais. A microglia CD11B-positiva apresentou hipertrofia leve, sugerindo uma resposta inflamatória sutil. Além disso, o número de células positivas para Olig1, Olig2 e NG2 foi ligeiramente maior do que nos controles, indicando um recrutamento modesto de células da linhagem de oligodendrócitos.

Na análise histológica do grupo tratado com células-tronco, observou-se uma população mais densa de células gliais, juntamente com áreas de vacuolização. De modo notável, algumas bordas dessas áreas mostravam núcleos achatados. A imunohistoquímica revelou uma forte resposta de células gliais e progenitoras. Os astrócitos GFAP-positivos estavam significativamente aumentados, apresentando morfologia hipertrófica e formando uma densa cicatriz glial na borda da lesão, caracterizada por intensa marcação. Astrócitos contribuem para formação da cicatriz glial, limitando regeneração mas também protegendo o tecido de danos adicionais. Além disso, a imunoreatividade para CD11B estava aumentada,

com microglia/macrófagos ativados exibindo morfologia ameboide tanto no epicentro da lesão quanto nas regiões perilesionais. A expressão de Olig1 e Olig2 aumentou de forma acentuada próxima à lesão, indicando recrutamento e proliferação de células da linhagem de oligodendróцитos.

A análise morfológica inclusive da distribuição de positividade dos biomarcadores revela organização melhor ocorrida da cicatriz glial nos animais que receberam matrigel e matrigel com células. No grupo tratado com células ectomesenquimais, houve resposta acentuada na proliferação das células da linhagem de oligodendróцитos, indicador da resposta parácrina que essas células são capazes de provocar. De forma mais específica, os progenitores de oligodendróцитos são cruciais para a remielinização, visando restaurar a condução axonal.

As células precursoras de oligodendróцитos são as células mais proliferativas de todo o SNC. Os oligodendróцитos, que se originam dessas células precursoras, são um tipo importante de célula glial e são cruciais para a produção e manutenção da bainha de mielina. A mielina é essencial para a rápida transmissão de sinais elétricos ao longo dos axônios e fornece suporte trófico aos neurônios. A integridade da mielina, é crucial para o adequado funcionamento do SNC e para a restauração funcional após a LME. Os astróцитos contribuem com um papel de suporte, embora a sua participação na formação da cicatriz glial requeira uma modulação mais complexa²²¹.

O papel do oligodendróцитo na fisiopatologia da LME é central no contexto do dano secundário e dos déficits funcionais de longo prazo. Especificamente, a desmielinização após a lesão é causada pela morte celular estendida e distribuída dos oligodendróцитos. Durante as fases aguda e subaguda da lesão secundária, a morte celular de oligodendróцитos e a subsequente degradação da mielina levam ao dano axonal crônico e à perda de funções. A população de oligodendróцитos ao redor do local da lesão chega a diminuir pela metade já no primeiro dia após o trauma. Mecanismos como hemorragia, isquemia, excitotoxicidade e inflamação causam a morte por necrose ou apoptose dos oligodendróцитos²²². Além disso, a microglia residente no local da lesão assume desde cedo um fenótipo inflamatório e, ainda, uma barreira de matriz extracelular composta por proteoglicanos é depositada pela microglia ativada, macrófagos e astróцитos, gerando cicatriz glial que inibe a regeneração axonal¹⁰. Este momento do processo após a lesão é crucial para atuação de estratégias terapêuticas visando evitar os desdobramentos crônicos morfológicos e funcionais e suas consequências.

A terapia com células-tronco é uma dessas estratégias. Antigamente, pensava-se que as células-tronco deveriam suplementar a falha tecidual gerada pela lesão ao se diferenciarem e ocuparem o lugar vago deixado pelas células mortas. Entretanto, de acordo com o

entendimento mais recente, este papel ainda que exista é complementar a uma atuação parácrina dessas células que são colocadas no sítio lesional, de modo que efetivamente elas não precisam por vezes nem chegar diretamente no local da lesão²⁷. Essa era uma preocupação de nosso estudo, pois em trabalhos prévios de nosso grupo, não havia duotomia e houve terapias celulares com resultados funcionais positivos^{180,200,208}. Aqui, garantimos ambas as vias de chegada da terapia celular ao foco lesional. As células ectomesenquimais residem em um nicho neurogênico e apresentam como capacidade importante promover a diferenciação de oligodendrócitos e a mielinização do SNC²²³. Este efeito implica em benefícios estruturais com reposição de células perdidas. Mas, ainda e de modo mais importante, estas células são capazes de liberar fatores de crescimento que favorecem a neuroproteção e neuroregeneração, que explicam os resultados funcionais positivos que obtivemos em nosso estudo.

Pesquisas futuras permitirão elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na recuperação funcional, incluindo a neurogênese e a melhor resolução da cicatriz glial de maneira mais detalhada. Como passos futuros de nossa pesquisa, buscaremos avaliar a permanência das células no sítio lesional e realizar uma análise morfológica mais abrangente, imunológica, transcriptômica e proteômica da medula nos dias D2, D5, e nas semanas 1, 3 e 6 para uma compreensão mais profunda dos mecanismos fisiopatológicos e de reparo. Além disso, vislumbramos a translação para a terapia humana no contexto experimental, pois a mucosa olfatória pode ser facilmente obtida através de biópsias nos seres humanos^{127,183} e adquirimos com este estudo a expertise para o isolamento das células ectomesenquimais.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Foi aprimorada uma técnica de dissecação e isolamento *post-mortem* do septo nasal de ratos, com baixa contaminação sanguínea.
2. As condições de cultivo celular permitiram o isolamento de neuroesferas em suspensão a partir do cultivo de células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos.
3. A laminectomia e a durotomia não afetaram a medula espinal.
4. Os animais submetidos à contusão da medula espinal torácica tiveram ao longo de seis semanas de pós-operatório melhora da função motora de acordo com a escala BBB.
5. Os animais que receberam neuroesferas em Matrigel® apresentaram diferenças significativas em relação aos ratos com contusão da medula que não receberam neuroesferas ou Matrigel®: valores BBB mais elevados nas semanas 1 e 2 e mais elevada marcação de Olig1 no sítio da lesão na sexta semana de pós-operatório.
6. Na sexta semana do período pós-operatório, animais que receberam Matrigel® tiveram funções motoras semelhantes e melhores do que o grupo controle.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Spinal cord injury [Internet]. 2021 [cited 2025 Feb 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>
2. Golestani A, Shobeiri P, Sadeghi-Naini M, Jazayeri SB, Maroufi SF, Ghodsi Z, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries from 2009 to 2020: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*. 2022;56(4):219-39.
3. Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 SUPPL.):2-12.
4. Wang K, Wu Q, Chen M-Q, Jiang C, Li Z. Global, regional, and national burdens of cervical spinal cord injuries from 1990 to 2021: findings from Global Burden of Disease Study 2021. *Eur Spine J*. 2025;34(8):1-15.
5. Yokota K, Sakai H, Kawano O, Morishita Y, Masuda M, Hayashi T, et al. Changing trends in traumatic spinal cord injury in an aging society: epidemiology of 1152 cases over 15 years from a single center in Japan. *PLoS One*. 2024;19(5):e0298836.
6. Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*. 2014;52(2):110–116.
7. Chen Y, He Y, DeVivo MJ. Changing Demographics and Injury Profile of New Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States, 1972–2014. *Arch Phys Med Rehabil*. 2016;97(10):1610-9.
8. National Spinal Cord Injury Statistical Center. National spinal cord injury statistical center [Internet]. Birmingham, AL: Facts and Figures at a Glance. University of Alabama at Birmingham; 2016 [cited 2025 Feb 14]. Available from: <https://sites.uab.edu/nscisc/>
9. Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermsler LA, Ho CH. Spinal Cord Injury Medicine. 6. Economic and Societal Issues in Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007;88(3 SUPPL.1):84-8.
10. Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A, et al. Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17018.
11. Hall Ed, Yonkers PA, Horan KL, Braughler JM. Correlation between attenuation of posttraumatic spinal cord ischemia and preservation of tissue vitamin E by the 21-aminosteroid U74006F: evidence for an in vivo antioxidant mechanism. *J Neurotrauma* 1989; 6(3):169-76.
12. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991;75(1):15-26.
13. Fawcett, J. W. Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J. Neurotrauma*. 2006;23(3-4):371-83.

14. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol.* 2019;10:282.
15. Lindsay SL, McCanney GA, Willison AG, Barnett SC. Multi-target approaches to CNS repair: olfactory mucosa-derived cells and heparan sulfates. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(4):229-40.
16. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1-21.
17. Kim BG, Hwang DH, Lee SI, Kim EJ, Kim SU. Stem cell-based cell therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2007;16(4):355-64.
18. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus.* 2008;25(5):E2.
19. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature.* 1997;390(6661):680-3.
20. Aguayo AJ, David S, Bray GM. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol.* 1981;95:231-40.
21. Chen K, Marsh BC, Cowan M, Al'Joboori YD, Gigout S, Smith CC, et al. Sequential therapy of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training leads to cumulative improvements after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2017;292:135-44.
22. García-Álías G, Fawcett JW. Training and anti-CSPG combination therapy for spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2012;235(1):26-32.
23. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Schut D, Fehlings MG. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *J Neurosci.* 2010;30(5):1657-76.
24. Zhao RR, Andrews MR, Wang D, Warren P, Gullo M, Schnell L, et al. Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. *Eur J Neurosci.* 2013;38(6):2946-61.
25. Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2012;235(1):78-90.
26. Siddiqui AM, Khazaei M, Fehlings MG. Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2015;218:15-54.
27. Vismara I, Papa S, Rossi F, Forloni G, Veglianesi P. Current Options for Cell Therapy in Spinal Cord Injury. *Trends Mol Med.* 2017;23(9):831-49.

28. Badner A, Siddiqui AM, Fehlings MG. Spinal cord injuries: how could cell therapy help? *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(5):529-41.
29. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med.* 2018;7(1):3.
30. Hutson TH, Di Giovanni S. The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(12):732-45.
31. Courtine G, Sofroniew MV. Spinal cord repair: advances in biology and technology. *Nat Med.* 2019;25(6):898-908.
32. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.* 2002;416(6881):636-40.
33. Ito S, Nagoshi N, Tsuji O, Shibata S, Shinozaki M, Kawabata S, et al. LOTUS inhibits neuronal apoptosis and promotes tract regeneration in contusive spinal cord injury model mice. *eNeuro.* 2018.
34. Sato Y, Iketani M, Kurihara Y, Yamaguchi M, Yamashita N, Nakamura F, et al. Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science.* 2011;333(6043):769-73.
35. McKerracher L, Higuchi H. Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(3-4):309-17.
36. Nomura H, Tator CH, Shoichet MS. Bioengineered strategies for spinal cord repair. *J Neurotrauma.* 2006;23(3-4):496-507.
37. Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, et al. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet.* 2011;377(9781):1938-47.
38. Terson de Paleville DGL, Harkema SJ, Angeli CA. Epidural stimulation with locomotor training improves body composition in individuals with cervical or upper thoracic motor complete spinal cord injury: A series of case studies. *J Spinal Cord Med.* 2019;42(1):32-8.
39. Houle JD, Côté MP. Axon regeneration and exercise-dependent plasticity after spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1279(1):154-63
40. Laroni A, de Rosbo NK, Uccelli A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases: Immunoregulation beyond neuroprotection. *Immunol Lett.* 2015;168(2):183-90.
41. Lindsay SL, Barnett SC. Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? *Neurochem Int.* 2017;106:101-7.

42. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110(4):1001-20.
43. Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003;349(6):570-82.
44. Bjugstad KB, Redmond DE Jr, Teng YD, Elsworth JD, Roth RH, Blanchard BC, et al. Neural stem cells implanted into MPTP-treated monkeys increase the size of endogenous tyrosine hydroxylase-positive cells found in the striatum: a return to control measures. *Cell Transplant*. 2005;14(4):183-92.
45. Bjugstad KB, Teng YD, Redmond DE Jr, Elsworth JD, Roth RH, Cornelius SK, et al. Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2008;211(2):362-9.
46. Sedý J, Urdžíková L, Likavcanová K, Hejcl A, Burian M, Jendelová P, et al. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*. 2007;24(9):1487-501.
47. Iwai H, Shimada H, Nishimura S, Kobayashi Y, Itakura G, Hori K, et al. Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(7):708-19.
48. Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC, Sheikh S, Allan DB, Clark L, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia*. 2013;61(3):368-82.
49. Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(10):1917-29.
50. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*. 1999;5(12):1410-2.
51. Yousefifard M, Nasirinezhad F, Shardi Manaheji H, Janzadeh A, Hosseini M, et al. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:36.
52. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci*. 2007;27(36):9545-59.
53. Sparling JS, Bretzner F, Biernaskie J, Assinck P, Jiang Y, Arisato H, et al. Schwann cells generated from neonatal skin-derived precursors or neonatal peripheral nerve improve functional recovery after acute transplantation into the partially injured cervical spinal cord of the rat. *J Neurosci*. 2015;35(17):6714-30.

54. Toft A, Tome M, Barnett SC, Riddell JS. A comparative study of glial and non-neural cell properties for transplant-mediated repair of the injured spinal cord. *Glia*. 2013;61(4):513-28.
55. Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair--what can it achieve? *Nat Clin Pract Neurol*. 2007;3(3):152-61.
56. Brock JH, Graham L, Staufenberg E, Im S, Tuszynski MH. Rodent Neural Progenitor Cells Support Functional Recovery after Cervical Spinal Cord Contusion. *J Neurotrauma*. 2018;35(9):1069-78.
57. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):14069-74.
58. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2005;25(19):4694-705.
59. Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16825-30.
60. Willison AG, Smith S, Davies BM, Kotter MRN, Barnett SC. A scoping review of trials for cell-based therapies in human spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2020;58(8):844-56.
61. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1045-56.
62. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000;11(13):3001-5.
63. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2199-204.
64. Matyas JJ, Stewart AN, Goldsmith A, Nan Z, Skeel RL, Rossignol J, et al. Effects of Bone-Marrow-Derived MSC Transplantation on Functional Recovery in a Rat Model of Spinal Cord Injury: Comparisons of Transplant Locations and Cell Concentrations. *Cell Transplant*. 2017;26(8):1472-82.
65. Allahdadi KJ, de Santana TA, Santos GC, Azevedo CM, Mota RA, Nonaka CK, et al. IGF-1 overexpression improves mesenchymal stem cell survival and promotes neurological recovery after spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):146.
66. Oh SK, Choi KH, Yoo JY, Kim DY, Kim SJ, Jeon SR. A Phase III Clinical Trial Showing Limited Efficacy of Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*. 2016;78(3):436-47; discussion 447.

67. Geffner LF, Santacruz P, Izurieta M, Flor L, Maldonado B, Auad AH, et al. Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes is safe and improves their quality of life: comprehensive case studies. *Cell Transplant*. 2008;17(12):1277-93.
68. Awidi A, Al Shudifat A, El Adwan N, Alqudah M, Jamali F, Nazer F, et al. Safety and potential efficacy of expanded mesenchymal stromal cells of bone marrow and umbilical cord origins in patients with chronic spinal cord injuries: a phase I/II study. *Cytotherapy*. 2024;26(8):825-31.
69. Akhlaghpasand M, Tavanaei R, Allameh F, Hosseinpour M, Toreyhi H, Golmohammadi M, et al. Improvement of Neurogenic Bladder Dysfunction Following Combined Cell Therapy with Mesenchymal Stem Cell and Schwann Cell in Spinal Cord Injury: A Randomized, Open-Label, Phase II Clinical Trial. *World Neurosurg*. 2025;194:123402.
70. Akhlaghpasand M, Tavanaei R, Hosseinpour M, Heidari R, Mohammadi I, Chamanara M, et al. Effects of Combined Intrathecal Mesenchymal Stem Cells and Schwann Cells Transplantation on Neuropathic Pain in Complete Spinal Cord Injury: A Phase II Randomized Active-Controlled Trial. *Cell Transplant*. 2025;34:9636897241298128.
71. Huang L, Fu C, Xiong F, He C, Wei Q. Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. *Cell Transplant*. 2021;30:963689721989266.
72. Kim SG, George NP, Hwang JS, Park S, Kim MO, Lee SH, et al. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Applications in Neurodegenerative Disease Treatment and Integrated Omics Analysis for Successful Stem Cell Therapy. *Bioengineering*. 2023;10(5):621.
73. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2006;15(4):583-94.
74. Boulland JL, Mastrangelopoulou M, Boquest AC, Jakobsen R, Noer A, Glover JC, et al. Epigenetic regulation of nestin expression during neurogenic differentiation of adipose tissue stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(7):1042-52.
75. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
76. Gao S, Guo X, Zhao S, Jin Y, Zhou F, Yuan P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron/motoneuron-like cells for cell replacement therapy of spinal cord injury. *Cell Death Dis*. 2019;10:597.
77. Maqueda A, Rodriguez. Efficacy of human HC016 cell transplants on neuroprotection and functional recovery in a rat model of acute spinal cord injury. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(2):319-33.
78. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60. doi: 10.1634/stemcells.21-1-50. Erratum in: *Stem Cells*. 2003;21(2):247.

79. Akhlaghpasand M, Tavanaei R, Hosseinpour M, Yazdani KO, Soleimani A, Zoshk MY, et al. Safety and potential effects of intrathecal injection of allogeneic human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes in complete subacute spinal cord injury: a first-in-human, single-arm, open-label, phase I clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):264.
80. Kaplan N, Kabatas S, Civelek E, Savrunlu EC, Akkoc T, Boyalı O, et al. Multiroute administration of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in chronic complete spinal cord injury: A phase I safety and feasibility study. *World J Stem Cells.* 2025;17(5):101675.
81. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25(1):100-6.
82. Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury? *Glia.* 2010;58(2):125-34.
83. Centenaro LA, Jaeger Mda C, Ilha J, de Souza MA, Kalil-Gaspar PI, Cunha NB, et al. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: effects on functional recovery and axonal regeneration. *Brain Res.* 2011;1426:54-72.
84. Hur JW, Cho TH, Park DH, Lee JB, Park JY, Chung YG. Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. *J Spinal Cord Med.* 2016;39(6):655-64.
85. Diaz-Ruiz A, Vergara P, Perez-Severiano F, Segovia J, Guizar-Sahagún G, Ibarra A, et al. Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and endothelial nitric oxide synthase expressions after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res.* 2005;30(2):245-51.
86. Park SI, Lim JY, Jeong CH, Kim SM, Jun JA, Jeun SS, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy promotes functional recovery of contused rat spinal cord through enhancement of endogenous cell proliferation and oligogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:362473.
87. Graziadei PP, Monti Graziadei AG. Regeneration in the olfactory system of vertebrates. *Am J Otolaryngol.* 1983;4(4):228-33.
88. Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec.* 2002;269(1):33-49.
89. Doucette R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia.* 1990;3(6):433-49.
90. Pellitteri R, Russo A, Stanzani S, Zaccheo D. Olfactory ensheathing cells protect cortical neuron cultures exposed to hypoxia. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(1):68-76.
91. Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, Lankford KL, Wewetzer K, Fodor WL, et al. Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-

- transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J.* 2004;18(2):335-7.
92. Tabakow P, Raisman G, Fortuna W, Czyz M, Huber J, Li D, et al. Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell Transplant.* 2014;23(12):1631-55.
 93. Witheford M, Westendorf K, Roskams AJ. Olfactory ensheathing cells promote corticospinal axonal outgrowth by a L1 CAM-dependent mechanism. *Glia.* 2013;61(11):1873-89.
 94. Ruiz-Mendoza S, Macedo-Ramos H, Santos FA, Quadros-de-Souza LC, Paiva MM, Pinto TC, et al. *Streptococcus pneumoniae* infection regulates expression of neurotrophic factors in the olfactory bulb and cultured olfactory ensheathing cells. *Neuroscience.* 2016;317:149-61.
 95. Bonfanti R, Musumeci T, Russo C, Pellitteri R. The protective effect of curcumin in Olfactory Ensheathing Cells exposed to hypoxia. *Eur J Pharmacol.* 2017;796:62-8.
 96. López-Vales R, García-Álías G, Forés J, Vela JM, Navarro X, Verdú E. Transplanted olfactory ensheathing cells modulate the inflammatory response in the injured spinal cord. *Neuron Glia Biol.* 2004;1(3):201-9.
 97. Chuah MI, Hale DM, West AK. Interaction of olfactory ensheathing cells with other cell types in vitro and after transplantation: glial scars and inflammation. *Exp Neurol.* 2011;229(1):46-53.
 98. Torres-Espín A, Hernández J, Navarro X. Gene expression changes in the injured spinal cord following transplantation of mesenchymal stem cells or olfactory ensheathing cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e76141.
 99. Sasaki M, Lankford KL, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination after olfactory ensheathing cell transplantation into diverse demyelinating environments. *Exp Neurol.* 2011;229(1):88-98.
 100. Franklin RJ, Gilson JM, Franceschini IA, Barnett SC. Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS. *Glia.* 1996;17(3):217-24.
 101. Woodhall E, West AK, Chuah MI. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;88(1-2):203-13.
 102. Au E, Richter MW, Vincent AJ, Tetzlaff W, Aebbersold R, Sage EH, et al. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci.* 2007;27(27):7208-21.
 103. Lipson AC, Widenfalk J, Lindqvist E, Ebendal T, Olson L. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Exp Neurol.* 2003;180(2):167-71.

104. Richter MW, Roskams AJ. Olfactory ensheathing cell transplantation following spinal cord injury: hype or hope? *Exp Neurol*. 2008;209(2):353-67.
105. Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev*. 2007;56(1):236-58.
106. Nazareth L, Lineburg KE, Chuah MI, Tello Velasquez J, Chehrehasa F, St John JA, et al. Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system. *J Comp Neurol*. 2015;523(3):479-94.
107. Su Z, Chen J, Qiu Y, Yuan Y, Zhu F, Zhu Y, et al. Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris. *Glia*. 2013;61(4):490-503.
108. Toft A, Scott DT, Barnett SC, Riddell JS. Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain*. 2007;130(Pt 4):970-84.
109. Deumens R, Koopmans GC, Honig WM, Hamers FP, Maquet V, Jérôme R, et al. Olfactory ensheathing cells, olfactory nerve fibroblasts and biomatrices to promote long-distance axon regrowth and functional recovery in the dorsally hemisected adult rat spinal cord. *Exp Neurol*. 2006;200(1):89-103.
110. Watzlawick R, Rind J, Sena ES, Brommer B, Zhang T, Kopp MA, et al. Olfactory Ensheathing Cell Transplantation in Experimental Spinal Cord Injury: Effect size and Reporting Bias of 62 Experimental Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Biol*. 2016;14(5):e1002468.
111. Féron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain*. 2005;128(Pt 12):2951-60.
112. Ramón-Cueto A, Muñoz-Quiles C. Clinical application of adult olfactory bulb ensheathing glia for nervous system repair. *Exp Neurol*. 2011;229(1):181-94.
113. Gómez RM, Ghotme K, Botero L, Bernal JE, Pérez R, Barreto GE, et al. Ultrastructural analysis of olfactory ensheathing cells derived from olfactory bulb and nerve of neonatal and juvenile rats. *Neurosci Res*. 2016;103:10-7.
114. Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*. 1997;277(5334):2000-2.
115. Raisman G, Li Y. Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(4):312-9.
116. Reshamwala R, Shah M, Belt L, Ekberg JAK, St John JA. Reliable cell purification and determination of cell purity: crucial aspects of olfactory ensheathing cell transplantation for spinal cord repair. *Neural Regen Res*. 2020;15(11):2016-26.

117. Cheng I, Park DY, Mayle RE, Githens M, Smith RL, Park HY, et al. Does timing of transplantation of neural stem cells following spinal cord injury affect outcomes in an animal model? *J Spine Surg.* 2017;3(4):567-71.
118. Barnett SC, Alexander CL, Iwashita Y, Gilson JM, Crowther J, Clark L, et al. Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons. *Brain.* 2000;123 (Pt 8):1581-8.
119. Féron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(8):861-6.
120. Choi D, Law S, Raisman G, Li D. Olfactory ensheathing cells in the nasal mucosa of the rat and human. *Br J Neurosurg.* 2008;22(2):301-2.
121. Lim F, Martín-Bermejo MJ, García-Escudero V, Gallego-Hernández MT, García-Gómez A, Rábano A, et al. Reversibly immortalized human olfactory ensheathing glia from an elderly donor maintain neuroregenerative capacity. *Glia.* 2010;58(5):546-58.
122. García-Escudero V, Gargini R, Gallego-Hernández MT, García-Gómez A, Martín-Bermejo MJ, Simón D, et al. A neuroregenerative human ensheathing glia cell line with conditional rapid growth. *Cell Transplant.* 2011;20(2):153-66.
123. Choi D, Li D, Law S, Powell M, Raisman G. A prospective observational study of the yield of olfactory ensheathing cells cultured from biopsies of septal nasal mucosa. *Neurosurgery.* 2008;62(5):1140-4; discussion 1144-5.
124. Tomé M, Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells.* 2009;27(9):2196-208.
125. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):519.
126. Lindsay SL, Johnstone SA, McGrath MA, Mallinson D, Barnett SC. Comparative miRNA-Based Fingerprinting Reveals Biological Differences in Human Olfactory Mucosa- and Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports.* 2016;6(5):729-42.
127. Lindsay SL, Toft A, Griffin J, M M Emraja A, Barnett SC, Riddell JS. Human olfactory mesenchymal stromal cell transplants promote remyelination and earlier improvement in gait co-ordination after spinal cord injury. *Glia.* 2017;65(4):639-56.
128. Pandit SR, Sullivan JM, Egger V, Borecki AA, Oleskevich S. Functional effects of adult human olfactory stem cells on early-onset sensorineural hearing loss. *Stem Cells.* 2011;29(4):670-7.
129. Nivet E, Vignes M, Girard SD, Pierrisnard C, Baril N, Devèze A, et al. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2808-20.

130. Rui K, Zhang Z, Tian J, Lin X, Wang X, Ma J, et al. Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(3):401-8.
131. Rui K, Lin X, Tian J, Wang X, Sun L, Hong X, et al. Ecto-mesenchymal stem cells: a new player for immune regulation and cell therapy. *Cell Mol Immunol*. 2017;15(1):82-84.
132. Girard SD, Devéze A, Nivet E, Gepner B, Roman FS, Féron F. Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *J Vis Exp*. 2011;(54):2762.
133. Alvites RD, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho ME, Varejão ASP, Maurício AC. The Nasal Cavity of the Rat and Mouse-Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018;301(10):1678-89.
134. Bonnet M, Trimaille T, Brezun JM, Feron F, Gigmes D, Marqueste T, et al. Motor and sensitive recovery after injection of a physically cross-linked PNIPAAm-g-PEG hydrogel in rat hemisectioned spinal cord. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;107:110354.
135. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*. 2013;110(3):207-11.
136. Keck T, Lindemann J. Numerical simulation and nasal air-conditioning. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010;9:Doc08.
137. Eiting TP, Smith TD, Perot JB, Dumont ER. The role of the olfactory recess in olfactory airflow. *J Exp Biol*. 2014;217(Pt 10):1799-803.
138. Reece WO, Rowe EW. Functional anatomy and physiology of domestic animals. USA: Wiley; 2017.
139. Haidarliu S, Golomb D, Kleinfeld D, Ahissar E. Dorsorostral snout muscles in the rat subserve coordinated movement for whisking and sniffing. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012;295(7):1181-91.
140. Dunston D, Ashby S, Krosnowski K, Ogura T, Lin W. An effective manual deboning method to prepare intact mouse nasal tissue with preserved anatomical organization. *J Vis Exp*. 2013;(78):50538.
141. Sankaran S, Khot LR, Panigrahi S. 2012. Biology and applications of olfactory sensing system: a review. *Sens Actuators B*. 2012;171-172:1-17.
142. Chamanza R, Wright JA. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *J Comp Pathol*. 2015;153(4):287-314.
143. Uraih LC, Maronpot RR. Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques. *Environ Health Perspect*. 1990;85:187-208.

144. Delorme B, Nivet E, Gaillard J, Häupl T, Ringe J, Devèze A, et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* 2010;19(6):853-66.
145. Goldstein BJ, Goss GM, Choi R, Saur D, Seidler B, Hare JM, et al. Contribution of Polycomb group proteins to olfactory basal stem cell self-renewal in a novel c-KIT⁺ culture model and in vivo. *Development.* 2016;143(23):4394-404.
146. Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Dis Model Mech.* 2016;9(10):1125-37.
147. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res.* 2002;69(6):925-33.
148. Zhang HT, Cheng HY, Cai YQ, Ma X, Liu WP, Yan ZJ, et al. Comparison of adult neurospheres derived from different origins for treatment of rat spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 2009;458(3):116-21.
149. Fan C, Li X, Xiao Z, Zhao Y, Liang H, Wang B, et al. A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair. *Acta Biomater.* 2017;51:304-16.
150. Jiao G, Lou G, Mo Y, Pan Y, Zhang Z, Guo R, et al. A combination of GDNF and hUCMSC transplantation loaded on SF/AGs composite scaffolds for spinal cord injury repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;74:230-7.
151. Liu X, Hao M, Chen Z, Zhang T, Huang J, Dai J, et al. 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair. *Biomaterials.* 2021;272:120771.
152. Ma D, Zhao Y, Huang L, Xiao Z, Chen B, Shi Y, et al. A novel hydrogel-based treatment for complete transection spinal cord injury repair is driven by microglia/macrophages repopulation. *Biomaterials.* 2020;237:119830.
153. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 1986;25(2):312-8.
154. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5):378-86.
155. Santos GB. Estudo do uso de células-tronco de linhagem neuronal em modelo experimental de lesão medular aguda [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.
156. Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of life of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res.* 2008;31(3):247-51.
157. Pearcey TE, Yoshida KK, Renwick RM. Personal relationships after a spinal cord injury. *Int J Rehabil Res.* 2007;30(3):209-19.

158. Schmaus H. Beiträge zur pathologischen Anatomie der Rückenmarkerschütterung. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin 1890;122(3):470-95.
159. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. JAMA. 1911;57(11):878-80.
160. Allen AR. Remarks on histopathological changes in spinal cord due to impact: an experimental study. J Nerv Ment Dis. 1914;41(3):141-7.
161. McVeigh JF. Experimental cord crushes with special reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cords affected. Arch Surg. 1923;7(3):573-600.
162. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. AMA Arch Neurol Psychiatry. 1953;70(6):813-9.
163. Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. J Neurosurg. 1969;30(6):693-7.
164. Holdsworth F. Fractures, dislocations, and fracture-dislocations of the spine. J Bone Joint Surg Am. 1970;52(8):1534-51.
165. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. J Neurosurg. 1971;35(6):700-8.
166. Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. J Neurosurg. 1971;35(3):277-86.
167. Dohrmann GJ, Panjabi MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. Surg Neurol. 1976;6(5):263-7.
168. Yeo, JD, McKenzie B, Hindwood B, Kidman, A. Treatment of paraplegic sheep with hyperbaric oxygen. Med J Aust. 1976;1(15):538-40.
169. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma: I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. Lab Invest. 1978;39(3):236-53.
170. Tator CH, Rowed IW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. Can Med Assoc J. 1979;121(11):1453-64.
171. De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. Spine (Phila Pa 1976). 1981;6(4):315-35.
172. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose response and time-action analysis. J Neurosurg. 1984; 61(1):124-30.
173. Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. Exp Neurol. 1987;95(2):530-3.

174. Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992;9(Suppl 1):211-7.
175. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996;139(2):244-56.
176. Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol*. 1997;148(2):475-94.
177. Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci*. 1998;18(10):3803-15.
178. Rodrigues NR. Padronização da lesão medular espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
179. Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J*. 1999;40(4):313-20.
180. Cristante AF, Tsanaclis AM, Santos CV, Barros EMKP, Marcon RM, Oliveira RP, et al. Estudo do implante e viabilidade de células do sistema nervoso central fetal no tratamento da lesão de medula espinal em ratos. *Folha Ortop Traumatol*. 2002;11(34).
181. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
182. Cristante AF, Barros Filho TEP, Tetsui N, Mendroni A, Caldas JG, Camargo AJS, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord*. 2009; 47(10):733-8.
183. Jaloux C, Bonnet M, Vogtensperger M, Witters M, Veran J, Giraud L, et al. Human nasal olfactory stem cells, purified as advanced therapy medicinal products, improve neuronal differentiation. *Front Neurosci*. 2022;16:1042276.
184. Rivera EAB. Ética Na Experimentação Animal. *Rev Patol Trop*. 2011;30(1).
185. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). 2016. <https://www.sbc.org.br>
186. Zheng X, Yang J, Hou Y, Shi X, Liu K. Prediction of clinical progression in nervous system diseases: plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Eur J Med Res*. 2024;29(1):51.
187. Li Y, Lei Z, Ritzel RM, He J, Liu S, Zhang L, et al. Ablation of the Integrin CD11b Mac-1 Limits Deleterious Responses to Traumatic Spinal Cord Injury and Improves Functional Recovery in Mice. *Cells*. 2024;13(18):1584.

188. Liu W, Danckwardt-Lillieström N, Schrott-Fischer A, Glueckert R, Rask-Andersen H. Distribution of Immune Cells Including Macrophages in the Human Cochlea. *Front Neurol*. 2021;12:781702.
189. Lund MC, Ellman DG, Nissen M, Nielsen PS, Nielsen PV, Jørgensen C, et al. The Inflammatory Response after Moderate Contusion Spinal Cord Injury: A Time Study. *Biology (Basel)*. 2022;11(6):939.
190. Laouarem Y, Traiffort E. Developmental and Repairing Production of Myelin: The Role of Hedgehog Signaling. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:305.
191. Ravanelli AM, Appel B. Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment. *Genes Dev*. 2015;29(23):2504-15.
192. Qi Q, Zhang Y, Shen L, Wang R, Zhou J, Lü H, et al. Olig1 expression pattern in neural cells during rat spinal cord development. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016;12:909-16.
193. Park HW, Oh S, Lee KH, Lee BH, Chang MS. Olig2-expressing Mesenchymal Stem Cells Enhance Functional Recovery after Contusive Spinal Cord Injury. *Int J Stem Cells*. 2018;11(2):177-86.
194. Tai W, Du X, Chen C, Xu XM, Zhang CL, Wu W. NG2 glia reprogramming induces robust axonal regeneration after spinal cord injury. *iScience*. 2024;27(2):108895.
195. Zhang Y, Yang S, Liu C, Han X, Gu X, Zhou S. Deciphering glial scar after spinal cord injury. *Burns Trauma*. 2021;9:tkab035.
196. Mackay-sim A, Sutharsan R. Propagation of Human Olfactory Neurosphere-derived Cells [Internet]. [cited 2025 Jul 07]. Available from: https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/cell/human/Olfneurosphere_Crawford_protocol.pdf
197. Grimm K, Leigh A, Lamont WJ, Tranquilli SA, Greene SA, Robertson S. *Veterinary Anesthesia and Analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones*. Wiley-Blackwell. 2015
198. Young W. MASCIS Spinal Cord Contusion Model. In: Chen J, Xu ZC, Xu XM, Zhang JH. (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press; 2009.
199. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma*. 1996;13(7):343-59.
200. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in wistar rats. *Acta Ortop Bras*. 2011;19(2):87-91.
201. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 4.ed. Academic Press. 2015.

202. Miranda TAB. Estratégia Terapêutica Após Contusão Da Medula Espinal: Recuperação Funcional E Estabilidade Cortical Sensório-Motora [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2011
203. Meyerholz DK, Beck AP. Fundamental Concepts for Semiquantitative Tissue Scoring in Translational Research. *ILAR J.* 2018;59(1):13-7.
204. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. applied Linear Statistical Models. 4. Ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1996.
205. Kirkwood BR, Sterne JA. Essential medical statistics. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA; 2006.
206. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. 2nd ed. Chapman and Hall: New York, USA, 1989.
207. Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2014;114:25-57.
208. Narazaki DK, Barros Filho TE, Oliveira CR, Cristante AF, Iutaka AS, Marcon RM, et al. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2006;61(5):453-60.
209. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.
210. Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 1999;34(2):85-9.
211. Cristante AF, Barros Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2009;47(6):458-63.
212. Stamegna JC, Girard SD, Veron A, Sicard G, Khrestchatisky M, Feron F, et al. A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. *Stem Cell Res.* 2014;12(3):673-9.
213. Ercolin AC, Roballo KC, Casals JB, Pieri NC, Souza AF, Barreto Rda S, et al. Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. *Acta Cir Bras.* 2016;31(1):59-66.
214. Caron I, Rossi F, Papa S, Aloe R, Sculco M, Mauri E, et al. A new three dimensional biomimetic hydrogel to deliver factors secreted by human mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Biomaterials.* 2016;75:135-47.
215. Chedly J, Soares S, Montembault A, von Boxberg Y, Veron-Ravaille M, Mouffle C, et al. Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. *Biomaterials.* 2017;138:91-107.
216. Nierode GJ, Gopal S, Kwon P, Clark DS, Schaffer DV, Dordick JS. High-throughput identification of factors promoting neuronal differentiation of human neural progenitor cells in microscale 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116(1):168-80.

217. Hu X, Xu W, Ren Y, Wang Z, He X, Huang R, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):245.
218. Hawryluk GW, Mothe A, Wang J, Wang S, Tator C, Fehlings MG. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2222-38.
219. Wu Y, Tang Z, Zhang J, Wang Y, Liu S. Restoration of spinal cord injury: From endogenous repairing process to cellular therapy. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:1077441.
220. Edagr JM, Griffiths IR. Chapter 7 - White Matter Structure: A Microscopist's View. In: Johansen-Berg H, Behrens TEJ. (eds). *Diffusion MRI (Second Edition)*. Academic Press; 2014. p. 127-53.
221. Li C, Luo Y, Li S. The roles of neural stem cells in myelin regeneration and repair therapy after spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):204.
222. Al Mamun A, Quan Z, Geng P, Wang S, Shao C, Xiao J. Targeting Remyelination in Spinal Cord Injury: Insights and Emerging Therapeutic Strategies. *CNS Neurosci Ther*. 2024;30(12):1-15.
223. Lindsay SL, Barnett SC. Therapeutic Potential of Niche-Specific Mesenchymal Stromal Cells for Spinal Cord Injury Repair. *Cells*. 2021;10(4):901.

ANEXOS

ANEXO A - Manuscrito em preparação

Review article

The rodent's major olfactory mucosa: an updating

Authors

Brian Guilherme Monteiro Marta Coimbra¹, M.D.

Natalia de Araujo², DVM, M.Sc.

Raphael Martus Marcon³, M.D., Ph.D.

Alexandre Fogaça Cristante³, M.D., Ph.D.

Luciana Amaral Haddad², M.D., Ph.D.

Affiliations

(1) Spine Group, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

(2) Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

(3) Department of Orthopedics and Traumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Introduction

The most cranial region of the rodent's nose is known externally as the rhinarium, covered by furless skin. It features two natural orifices that lead to the nostrils, guided caudally and laterally, separated by the nasal tubers. In the most rostral portion of the rhinarium, there is a fenestration by which the nasal cavity is accessed. The nasal septum limits medially the nasal cavities, two symmetrical chambers lying from the nostrils rostrally to the nasopharynx caudally. The nasal septum consists of the upper cartilaginous portion (communicating with the cartilages of the nostrils) and the inferior bony portion, articulated with other skull bones¹.

The rodent's nasal cavity

The nasal cavity is a multifunctional anatomical structure associated with both the respiratory and olfactory systems. In rodents, the latter comprehends the major and accessory olfactory systems. The nasal cavity facilitates the heating and humidification of air inspired by the rhinarium before directing it further to upper airways and constitutes the first layer of immune response in the respiratory system, in direct interaction with the external environment, mediating secretion of immunoglobulin A and enzymes, as well as drainage of secretion from paranasal sinuses². In the nasal cavity, the olfactory mucosa belongs to the major olfactory system and is located in the olfactory recess at its caudal end³, whereas the vomeronasal organ, also known as Jacobson's organ, is part of the accessory olfactory system and consists of bilateral tubular diverticula located at the ventral portion of the proximal nasal septum superior to the hard palate⁴.

The nasal cavity can be subdivided into four regions from rostral to caudal: the vestibule, the nasal valve (*ostium internum*), the nasal chamber, and the choanae⁵. The nasal cavity of the rat and mouse are visually identical. Each nasal chamber is encased by bones and contains nasal turbinates (the turbinate system), which extend from the lateral or dorsal walls into the chamber. These structures divide the airway into distinct passages known as the dorsal, middle, ventral, and lateral meatuses. The arrangement of the meatuses promotes air conditioning, maintenance of humidity and heat, filtering and elimination of airborne particles and debris.

In addition, the turbinate system serves the major olfactory system⁶. It recognizes odorants, airborne chemicals at low concentrations, that are then discriminated by highly ordered neuronal circuits. Axons of olfactory neurons from the major olfactory system form the bundles of the olfactory nerve that traverse the cribriform plate and project into the main olfactory bulb. From this structure, transduction of the signal generated by the olfactory molecules takes place leading to subsequent conduction of the impulse to the primary olfactory cortex⁷. Hence, the major olfactory system consists of the main olfactory sensory epithelium in the nasal cavity, its central projection areas, the main olfactory bulb which is the primary integration center of olfactory input in the brain, the piriform cortex, the olfactory amygdala, and the entorhinal cortex⁴.

Rodents are macrosmatic animals with high olfactory precision and a relatively extensive area of distribution of olfactory receptors. The olfactory function is especially important for the rodent's sensory and behavioral activities, such as feeding and communication⁸. In addition to the major olfactory system, the accessory olfactory system is well developed in rodents and other tetrapods, besides amphibians and reptiles,

sensing pheromones that are odorants related to mating, fear, aggression, and hormonal changes. Signals generated by sensory neurons of the vomeronasal organ are transmitted to the accessory olfactory bulb and relayed to regions of the amygdala and hypothalamus implicated in behavioral and physiological effects of pheromones⁹.

In the rat's nasal cavity, there are four types of epithelia from the vestibule to the choanae. Each of them presents diverse specialization and several cellular subtypes. The keratinized stratified squamous epithelium composes the nasal vestibule. A ciliated pseudostratified columnar epithelium, known as the respiratory epithelium, secretes mucus forming a protective barrier to inhaled particles, including pathogens. It lies on the nasal chambers, from the nasal septum medially through the choanae and nasopharynx caudally. Between the squamous and respiratory epithelia, a third epithelium type known as transitional is columnar and poorly ciliated, and occupies the nasal valve, a narrow area between the nasal vestibule and the chambers⁴.

The olfactory epithelium covers the largest surface of the nasal cavity in rodents, reaching almost half of its area, which is directly reflected in the extensive olfactory capacity of these animals. It is a pseudostratified columnar sensory neuroepithelium. This tissue extends through the caudal and dorsal third of the nasal septum, through parts of the nasal and maxillary turbinates, the caudal and lateral region of the nasal wall, and the dorsal part of the ethmoidal turbinates. It houses 6 to 10 million olfactory sensory neurons^{4,10}.

Lastly, the lateral wall of each diverticulum that composes the vomeronasal organ of the accessory olfactory system is lined by a non-sensory columnar epithelium, while its medial wall is lined by a sensory neuroepithelium. The vomeronasal organ is vestigial in humans. Of note, two additional distinct sensory organs correspond to less than 1% of sensory neurons in the nasal cavity in rodents and are absent in humans: the septal organs of Masera and of Grüneberg. They lie medially and rostrally in the nasal cavity and should be adjuvant to the major olfactory system in sensing odorants when the animal is resting⁴.

Cell types in the rat's major olfactory mucosa system

The rat's olfactory mucosa consists of the olfactory neuroepithelium itself and the adjacent lamina propria, separated by a basement membrane (Figure 1). The epithelium comprises sensory olfactory neurons (mature and immature), supporting (sustentacular) cells, basal cells (globose and horizontal basal cells) and Bowman's gland duct cells. Olfactory neurons are bipolar with ciliary nerve endings on the surface of the olfactory epithelium in

mammals. Supporting cells form a tightly packed columnar layer directly apposing to olfactory receptor neurons and are responsible for ion homeostasis and neuron regeneration regulation. The dendrites of olfactory receptor cells are embedded between two supporting cells that structurally and electrically isolate the olfactory receptor neurons. The rodent's olfactory neuroepithelium additionally includes microvillar cells, a type of supporting cell, and solitary chemosensory cells^{10,11,12,13,14,15}. Both globose and horizontal basal cells are stem cells that generate olfactory receptor neurons. In addition, horizontal cells can differentiate into glial cells, and globose cells can produce supporting cells^{10,16,17,18}.

The *lamina propria* lies between the olfactory neuroepithelium and the cribriform plate. Olfactory neuronal axons assemble into bundles that traverse both, the *lamina propria* and the cribriform plate. The *lamina propria* also contains the connective tissue, vessels, the acinus of the Bowman's gland responsible for mucus production and secretion, the olfactory ensheathing cells and ectomesenchymal stem cells^{18,19,20,21}.

The peripheral olfactory system can recover upon injuries, comprehending reconstitution of the olfactory epithelium, neurosensory cell regeneration, and reinnervation of the olfactory bulb, particularly due to continued exposure to irritating and harmful substances. Cell turnover and associated neurogenesis are maintained by basal progenitor cells²².

Olfactory ensheathing cells are a glial subtype that surrounds and guides the olfactory neuronal axons from the mucosal epithelium peripherally to the outer layer of the olfactory bulb in the central nervous system. After an injury, olfactory neurons degenerate, and new neurons are generated from the basal epithelium stem cells. Moreover, olfactory ensheathing cells support axonal outgrowth, and mediate re-synapse in the glomerular layer of the olfactory bulb^{10,19,20,23,24}.

The recent COVID-19 pandemic has driven the need to advance our understanding of the major olfactory system in the nasal cavity, because anosmia is a very common clinical presentation along with olfactory capacity disorder³⁰. Studies in rodents such as the one by Ye et al. (2021)³¹ have made it possible to understand the olfactory impact at the cellular level. In rats with humanized nasal olfactory tissue (to enable viral tropism) the infection has been proven to invade primarily non-neurological nasal cells, subsequently invading neural tissue leading to structural damage and olfactory loss. The functional regeneration of smell comes from the structural recovery of the olfactory epithelium, which is possible by the multipotent cells in this tissue. In addition, structural cell regeneration also plays an important role in olfactory recovery, as demonstrated in more recent research³².

Current research translates the knowledge acquired by studies on the rodent's nasal cavity to biopsied tissue from the human nasal septum¹⁸. Such research is a continuum with animal research and exploits the diversity of cell types provided by the nasal septum, including multipotent resident stem cells from the major and accessory olfactory organs, the respiratory epithelium as well as the nasal septum itself^{2,18,28,29}.

Rodents are widely adopted as model organisms for studies on mammalian anatomy, genetics and physiology²⁵. Yet, several *in vitro* systems have been developed based on genetic modification or tissue bioengineering to mitigate the use of animals in research. They include the *in vitro* induction of pluripotency in differentiated human cells, known as induced-pluripotent stem cells (iPSC)²⁶ and the establishment of organoid culture from stem cells²⁷. Still, it is important to understand the biology of multipotent stem cells resident in organ tissues, as they are responsible for tissue regeneration, signaling as well as tumor initiation^{2,10,18,33}. In addition to ectomesenchymal stem cells¹⁸, the nasal septum also provides tissue to culture and bioengineering, as respiratory epithelium stem cells, vomeronasal cells and chondrocytes^{2,28,29}. The need for research on animal tissue-residing stem cells is also exemplified by different omics approaches currently undertaken including single-cell transcriptomics²⁹.

References

1. Haidarliu S, Golomb D, Kleinfeld D, Ahissar E. 2012. Dorsorostral snout muscles in the rat subserve coordinated movement for whisking and sniffing. *Anat Rec* 295:1181–1191.
2. Rouhani MJ, Janes SM, Kim CF. Epithelial stem and progenitor cells of the upper airway. *Cells Dev.* 2024 Mar;177:203905. doi: 10.1016/j.cdev.2024.203905. Epub 2024 Feb 12. PMID: 38355015.
3. Eiting TP, Smith TD, Perot JB, Dumont ER. 2014. The role of the olfactory recess in olfactory airflow. *J Exp Biol* 217:1799–1803.
4. Harkema JR, Chapter 2 - Comparative Anatomy and Epithelial Cell Biology of the Nose, Editor(s): Richard A. Parent, *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)*, Academic Press, 2015, Pages 7-19, ISBN 9780124045774, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00002-3>.
5. Sankaran S, Khot LR, Panigrahi S. 2012. Biology and applications of olfactory sensing system: a review. *Sens Actuators B* 171–172: 1–17.

6. Chamanza R, Wright JA. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *J Comp Pathol*. 2015 Nov;153(4):287-314. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.08.009. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26460093.
7. Ma, M. (2007). Encoding Olfactory Signals via Multiple Chemosensory Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(6), 463–480. doi:10.1080/10409230701693359
8. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 1991 Apr 5;65(1):175-87. doi: 10.1016/0092-8674(91)90418-x. PMID: 1840504.
9. Holy TE. The Accessory Olfactory System: Innately Specialized or Microcosm of Mammalian Circuitry? *Annu Rev Neurosci*. 2018 Jul 8;41:501-525. doi: 10.1146/annurev-neuro-080317-061916. Epub 2018 May 4. PMID: 29727596.
10. Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec*. 2002 Feb 15;269(1):33-49. doi: 10.1002/ar.10047. PMID: 11891623.
11. Alvites RD, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho ME, Varejão ASP, Mauricio AC. The Nasal Cavity of the Rat and Mouse-Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018 Oct;301(10):1678-1689.
12. Suzuki Y, Takeda M, Obara N, Suzuki N, Takeichi N. Olfactory epithelium consisting of supporting cells and horizontal basal cells in the posterior nasal cavity of mice. *Cell Tissue Res*. 2000 Mar;299(3):313-25. doi: 10.1007/s004419900135. PMID: 10772246.
13. Finger TE, Böttger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, Silver WL. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):8981-6. doi: 10.1073/pnas.1531172100. Epub 2003 Jul 11. PMID: 12857948; PMCID: PMC166424.
14. Nomura T, Takahashi S, Ushiki T. Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol*. 2004 Jun;67(2):159-70. doi: 10.1679/aohc.67.159. PMID: 15468955.
15. Genovese F, Tizzano M. Microvillous cells in the olfactory epithelium express elements of the solitary chemosensory cell transduction signaling cascade. *PLoS One*. 2018 Sep 13;13(9):e0202754. doi: 10.1371/journal.pone.0202754. PMID: 30212469; PMCID: PMC6136699.

16. Féron F, Mackay-Sim A, Andrieu JL, Matthaei KI, Holley A, Sicard G. Stress induces neurogenesis in non-neuronal cell cultures of adult olfactory epithelium. *Neuroscience*. 1999 Jan;88(2):571-83. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00233-4. PMID: 10197776.
17. Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells*. 2008
18. Delorme, B. et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev*. 19, 853–866 (2010).
19. Williams SK, Franklin RJ, Barnett SC. Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. *J Comp Neurol*. 2004 Feb 23;470(1):50-62. doi: 10.1002/cne.11045. PMID: 14755525.
20. Li Y, Li D, Raisman G. Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *J Neurocytol*. 2005 Sep;34(3-5):343-51. doi: 10.1007/s11068-005-8361-1. Epub 2006 Jul 13. PMID: 16841171.
21. Tomé M, Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. 2009. Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells Int* 27:2196–2208.
22. Goldstein BJ, Goss GM, Choi R, Saur D, Seidler B, Hare JM, Chaudhari N. 2016. Olfactory basal stem cells: contribution of Polycomb group proteins to renewal in a novel c-Kit1 culture model and in vivo. *Development* 143:4394–4404.
23. Graziadei PPC, Monti Graziadei AG. Regeneration in the olfactory system of vertebrates. *Am J Otolaryngol Neck Med Surg*. 1983;4:228–33.
24. Doucette, R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3, 433–449 (1990).
25. Medicine SOF. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. 2013;(June):207-211.
26. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019. PMID: 18035408.
27. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active

- manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*. 2008 Nov 6;3(5):519-32. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.002. PMID: 18983967.
28. Pham TB, Sah RL, Masuda K, Watson D. Human Septal Cartilage Tissue Engineering: Current Methodologies and Future Directions. *Bioengineering* (Basel). 2024 Nov 7;11(11):1123. doi: 10.3390/bioengineering11111123. PMID: 39593783; PMCID: PMC11592323.
 29. Hills MH, Ma L, Fang A, Chiremba T, Malloy S, Scott AR, Perera AG, Yu CR. Molecular, cellular, and developmental organization of the mouse vomeronasal organ at single cell resolution. *Elife*. 2024 Dec 10;13:RP97356. doi: 10.7554/eLife.97356. PMID: 39656606; PMCID: PMC11630819.
 30. Gutiérrez-García AG, Contreras CM. Olfactory Epithelium Infection by SARS-CoV-2: Possible Neuroinflammatory Consequences of COVID-19. *Complex Psychiatry*. 2024 Oct 15;10(1-4):59-70. doi: 10.1159/000540982. PMID: 39545135; PMCID: PMC11560153.
 31. Ye, Q., Zhou, J., He, Q. *et al.* SARS-CoV-2 infection in the mouse olfactory system. *Cell Discov* 7, 49 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00290-1>
 32. Butowt R, Bilinska K, von Bartheld CS. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends Neurosci*. 2023 Jan;46(1):75-90. doi: 10.1016/j.tins.2022.11.003. Epub 2022 Nov 16. PMID: 36470705; PMCID: PMC9666374.

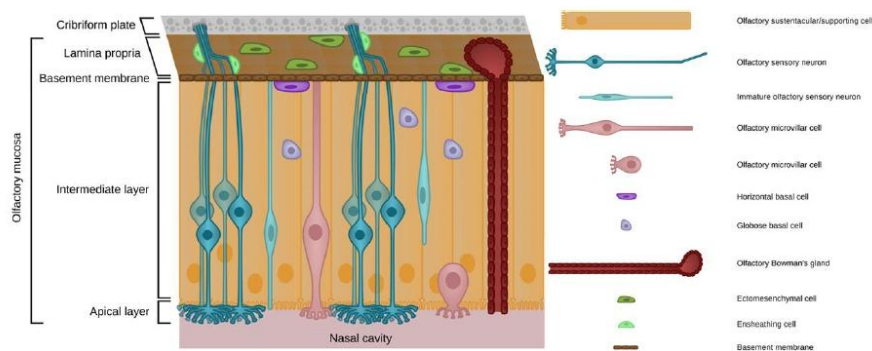
Figure 1

Figure 1: Illustration of the olfactory mucosa, consisting of the olfactory neuroepithelium itself and the adjacent lamina propria, separated by a basement membrane. The cribriform plate and the nasal cavity are positioned on the top and bottom of the figure, respectively. Ensheathing cells and ectomesenchymal cells are pictured in the lamina propria, as well as the acinus of the olfactory Bowman's gland. Olfactory sensory neurons' axons assemble into olfactory nerve bundles traversing the *lamina propria* and cribriform plate. The Bowman's gland duct cells as well as sustentacular and microvillar supporting cells, and neurons are seen in the neuroepithelium, where their progenitor cells (globose and horizontal basal cells) are also observed.

ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT nº 1465 CEUA 1600/2020
(PESQUISA EM ANIMAIS)

Pesquisador Responsável: Prof. Alexandre Fogaça Cristante
Pesquisador Executante: Brian Guilherme Monteiro Marta Coimbra
Título: Terapia experimental com células-tronco multipotentes da mucosa olfatória de ratos adultos em modelo de lesão medular aguda.
Grau de Pesquisa: Doutorado

PARA USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer da Comissão Científica do IOT:

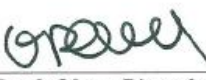
- ☒ Aprovado
☐ Aprovado com restrições (corrigir e/ou completar)
☐ Indeferido

São Paulo, 06 de novembro de 2020


Prof. Raphael Martus Marcon
 Presidente
 Comissão Científica - DOT

APROVAÇÃO DO DEPARTAMENTO

São Paulo, 09 de Novembro de 2020


Prof. Olavo Pires de Camargo
 Chefe do Departamento
 Ortopedia e Traumatologia
 FMUSP

ANEXO C - Manuscrito submetido ao periódico *Clinics*

Dissection technique of *post-mortem* adult rat nasal septum to obtain olfactory epithelium for experimental spinal cord injury repair

Authors

Brian Guilherme Monteiro Marta Coimbra¹, M.D.

Gustavo Bispo dos Santos¹, DVM, M.Sc.

Natalia de Araujo², DVM, M.Sc.

Daniel Duarte Perini¹, M.D.

Raphael Martus Marcon³, M.D., Ph.D.

Alexandre Fogaça Cristante³, M.D., Ph.D.

Luciana Amaral Haddad², M.D., Ph.D.

Affiliations

(1) Spine Group, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

(2) Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

(3) Department of Orthopedics and Traumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Purpose: Stem cell research for axonal neuronal regeneration has advanced and been widely applied to various preclinical models of spinal cord injury repair. For this purpose, olfactory ensheathing cells have been studied, and ectomesenchymal cells investigated more recently. Rodents are macrosmatic animals, displaying the olfactory tissue throughout most nasal chambers. The isolation of the olfactory mucosa from the nasal septum cartilage and bones provides the intact olfactory epithelium and *lamina propria* with its residing olfactory ensheathing and ectomesenchymal stem cells, which may undergo culturing. Techniques for isolating the nasal septum may lead to hemorrhage impairing cell viability. Aiming at olfactory ectomesenchymal stem cell culture,

we describe a modified protocol for collecting the nasal septum from *post-mortem* adult rats under controlled hemostasis.

Methods: Anesthetized rats were submitted to craniotomy assisted by a diamond drill, followed by osteotomy in the midline of the skull and nasal bones, and isolation of the nasal septum. Olfactory mucosa was harvested, and ectomesenchymal cells were cultured to provide adherent and floating cells and further *in vitro* analysis.

Results: The technique followed well-defined steps, favoring its reproducibility, increased precision of bone cutting, and reduced occurrence of trauma. The procedure presented limited bleeding and yielded cells viable for culturing and sphere formation.

Conclusions: The reproducible isolation of the nasal septum from rats provided viable cells amenable to future grafting to animals' injured spinal cords. The drill promotes cutting and hemostatic actions on the skull, reducing undue contamination.

Level of Evidence: NA (cadaveric/animal/basic science)

Keywords: Spinal cord injury; Nasal septum; Ectomesenchymal cells; Stem Cell Research; Nasal bone.

INTRODUCTION

The injured spinal cord has limited plasticity due to the non-permissive extracellular space, the imbalance in the microenvironment between axon growth-promoting, and also due to inhibiting factors, pro-inflammatory and neuronal related interleukins [1,2]. Among multiple treatment approaches for its regeneration, cell therapy is promising, and its studies additionally provide molecular targets that can be tested in preclinical trials [3-5]. In this context, animal models have been studied, focusing on current and future possibilities of translation into animal and human clinical practice [6].

Among the cell types that can potentially serve stem cell therapy, those found in the olfactory mucosa *lamina propria* are suitable, as widely demonstrated for olfactory ensheathing cells by research in recent years [7-10]. Interestingly, when the olfactory mucosa of embryonic rats was dissociated and submitted to suspension culture, two classes of sphere-forming cells have been identified. Multipotency capacity was associated with olfactory non-epithelial cells residing in the olfactory lamina propria, expressing mesenchymal stem cell markers as well as the neuroglial progenitor marker nestin, and neuronal and glial markers. The second sphere cell class was smaller, expressed cytokeratin and was derived from the olfactory epithelium, thus composed of epithelial

cells [11]. The same dual multipotent cell profile, positive for nestin and mesenchymal stem cell markers, has been observed for cells of the olfactory *lamina propria* from adult mice, rats and humans [12,13]. Named ectomesenchymal cells [12], they have tissue repair properties mediated by immunoregulatory, myelinating and neurogenic effects, which allow them to be considered multi-target therapy [12,14-16]. Olfactory ectomesenchymal cells offer notable advantages, primarily due to the neurogenic potential associated with ectodermal stem cell features, the ease of collection from nasal tissue and the rapid expansion capability of these cells in culture, enabling the generation of sufficient quantities for transplantation to human lesions.

The use of animals in research is of paramount importance as they provide translatable evidence to other species [17]. The protocols for harvesting the olfactory mucosa tissue are classified as *ante-mortem* and *post-mortem* approaches. The location of the olfactory mucosa in the confines of a cavity with complex anatomical architecture makes it difficult to be dissected in rodent-sized animals. The limited size of the rodent's nasal cavity restrains the *in vivo* approaches to obtain nasal septum tissue, favoring the *post-mortem* strategies to collect the specimen [11,18-20].

Two main challenges have been noticed when reproducing the existing techniques from literature: the hemorrhagic contamination of the isolated tissue and the structural changes of this material resulting from either the delay in removing the nasal tissue or the manipulation of the scissors inside the nasal cavity [19]. The olfactory mucosa collection procedure should ideally be performed within a maximum of ten minutes after the death of the animal [18]; otherwise, biological and structural changes in the tissue may pose a great risk for future *in vitro* cell assays.

Systematic research on the application of rat olfactory ectomesenchymal cells to injured spinal cords should contribute to experimental reproducibility and identification of therapeutic molecules, justifying the need for standardized controlled dissecting protocols. Aiming at obtaining viable ectomesenchymal cells from the olfactory mucosa of adult rats, we standardized a protocol for dissection and isolation of the nasal septum in anesthetized animals, as described here. The technique is original and presents a differential craniotomy by a diamond drill that reduces bleeding. Ectomesenchymal cells from the olfactory mucosa of the isolated nasal septum have been cultured as an adherent cell population and a floating subpopulation.

METHODS

The experiments followed the norms of animal care and experimentation. This research was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the School of Medicine of the Universidade de São Paulo (São Paulo, Brazil), on 03/10/2021 under the protocol number 1600/2020. The procedures were conducted at the Laboratory of Studies of Spinal Cord and Nerve Trauma (LETRAN) of the Institute of Orthopedics and Traumatology, Clinics Hospital, Medical School, Universidade de São Paulo (São Paulo, Brazil). The samples were processed at the Bioscience Institute, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Nasal septum isolation

Twelve animals were included for the nasal septum collection procedure. The protocol was performed three times in different months, each time with four animals. All animals were male Wistar rats weighing 250 and 300 grams, aged between 6 and 8 weeks. We based our rationale in the technique described by Alvites et al. [18]. The rat was positioned in sternal decubitus (Figure 1A) immediately after euthanasia was conducted and verified accordingly. Trichotomy was performed and the skin incised longitudinally along the skull (Figure 1B). Using scissors for dissection, the retraction of the soft tissue structures surrounding the incision's central area was improved (Figure 1C), and with a diamond drill device at 80,000 rpm craniotomy and longitudinal osteotomy were performed in the midline of the skull and nasal bones (Figure 1D and E). The bone structure was carefully displaced bilaterally with delicate tweezers to provide a direct view of the nasal cavity, with the nasal septum prominently visible (Figure 1F). The dissection proceeded with a dainty scalpel, blade number 15, detaching the septum (Figure 1G), and collecting it (Figure 1H). The sample was placed in a tube with phosphate-buffered saline (PBS), stored on ice. Samples from different animals can be pooled and transported in the same tube, on ice, for up to two hours.

Cell analysis

Nasal septa were washed in PBS, and the olfactory mucosae were isolated and checked for cell viability by submitting it to ectomesenchymal stem cell culturing according to Girard et al. (2011) [19]. Adherent mesenchymal cells of passage five from one batch were analyzed by flow cytometry according to Batissoco et al. (2024) [21]. The antibodies employed in flow cytometry were directed to hematopoietic cell markers CD34

(ab24904 antibody, Abcam, Eugene OR) and CD45 (553135 antibody, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), the endothelial cell marker CD31 (ab25644 antibody, Abcam, Eugene OR), and the mesenchymal stem cell markers CD73 (127207 antibody, BioLegend, San Diego CA) and CD90 (ab23830 antibody, Abcam, Eugene OR).

Passage-three cells were thawed, plated and maintained in ultra-low-attachment dishes in neurosphere medium, according to Girard et al. (2011) [19], in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After three passages, cell spheres in suspension were analyzed up to 15 days in vitro (DIV) by optical microscopy. Images were acquired at Zeiss Axiovert 40 CFL inverted light microscope (Zeiss, Germany) equipped with an AxioCam MRC5 CCD camera (Zeiss, Germany) and processed with AxioVision Rel. 4.7 software. Data analysis and graph overlays were performed using FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences). Spheres were counted, measured using AxioVision (Zeiss) or ImageJ software and panels were built with QuickFigures plugi and statistically analyzed among groups (ANOVA, $P < 0.05$) or between groups (Tukey *post-hoc* test, $P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

The dissection procedure innovation was the craniotomy assisted by a high-speed diamond drill. It was followed by osteotomy in the midline of the skull and nasal bones and isolation of the nasal septum with minimal bleeding (Figure 1H).

When primarily cultured in complete medium, dissociated olfactory mucosa provides mixed populations of cells, observed as fast-growing adherent cells (Figure 2A) and bright free-floating cells (Figure 2A, arrows). Passage-5 adherent cells submitted to cytometry analyses with antibodies that identify markers of mesenchymal stem cells, notably CD73 and CD90, yielded detection rates of 58.4% and 38.8%, respectively, confirming an enrichment in the expected mesenchymal stem cell type (Figure 2C). In agreement, this adhered cell population had lower detection rates for markers of hematopoietic cells, CD34 (0.48%) and CD45 (15.6%) or the endothelial cell marker CD31 (7.13 %; Figure 2C). The total numbers of events were 268,322, 268,265, 267,178, 267,118 and 270,252, respectively for CD34, CD45, CD31, CD73 and CD90. The data thus showed that cell passage enriched the adherent cell population in mesenchymal stem cells although at passage 5 it was heterogeneous. In culture media the diameter of single spheres was measured on DIV 4 (N=22; mean $69.47 \mu\text{m} \pm 21.61$; Figure 2D), DIV 7 (N=29; mean 69.83 ± 12.69 ; Figure 2E), DIV 9 (N=23; mean 88.61 ± 26.95) and DIV 15 (N=21; mean 91.47 ± 28.05 ; Figure 2F). Sphere diameter increased among groups (ANOVA, $P < 0.05$), highlighting

specific shifts in size from DIV 4 to DIV 9, from DIV 4 to DIV 15, from DIV 7 to DIV 9, and from DIV 7 to DIV 15 (Figure 2G; Tukey post-hoc test, $P < 0.05$).

Rodents are highly versatile animals for experimental study. As macroscopic animals, the olfactory tissue is distributed throughout most nasal chambers. Obtaining intact nasal tissue from adult rats without hemorrhagic contamination and with biological viability is an important resource for cellular studies and applications. In our protocol, a diamond drill in high rotation was used, which increases the precision of the bone cutting and largely reduces the occurrence of trauma harmful to the maintenance of the structural architecture of the harvested tissues. In other contexts of rodent dissection, adapted instruments, such as forceps and smaller tweezers, are frequently used, which would hinder the technical execution of this collection [18]. Reference to surgical instruments is pending in the general literature on the subject since several studies do not detail or standardize their use.

The isolation of multipotent stem cells from primarily cultured dissociated tissue requires refined dissection protocols, selection of appropriate culture medium and dishes, as well as cell passaging. Ectomesenchymal stem cells consist of mesenchymal and ectodermal components, with neural progenitors which have ectodermal origin mostly composing the floating cell population driving the formation of neurospheres under non-adherent conditions [11]. Passage-5 cultured adherent cells had a predominance of cells expressing stem cell markers (Figure 2C), were rapidly proliferative (Figure 2A, 7DIV). Spheres generated from floating cells increased their diameter along ten days in culture (Figure 2G). These observations confirm the viability of the cell culture, what can be in part explained by the fast animal dissection procedure conducted without hemorrhage due to the selected technique.

Stamegna et al. (2014) [22] proposed a protocol for *in vivo* biopsy of the olfactory mucosa in which all animals recovered immediately after surgery without signs of pain or distress. While collecting samples from the olfactory mucosa in live animals is relatively quick, the method has shown complex for routine isolation of stem cells from the olfactory mucosa.

Although frequently employed, the methods to obtain olfactory mucosa from *post-mortem* rodents are still ingenious and time-consuming, translating into a challenge for cell viability. Tomé et al. (2009) [11] proposed a *post-mortem* technique to obtain the tissue from rats that rendered cells for successful culture. The cartilaginous nature of the bones allows for the described incision without great difficulties, although for adult rats, the procedure becomes more difficult to perform.

In 2011, Girard et al. [19] described a *post-mortem* technique for obtaining nasal mucosa from adult rats in a study aiming at culturing olfactory stem cells from rodents or humans. The entire procedure was completed within ten minutes from euthanasia to avoid structural damage and biological changes to the mucosa. According to the authors, the protocol, although functional, requires excessive time. In addition, decapitation of the animal increases the risk of ascending hemorrhage in the upper respiratory tract, with increased contamination of the recesses and olfactory mucosa.

Ercolin et al. (2016) [20] describe a *post-mortem* dissection technique in rabbit embryos, which can also be applied to rodents. The nasal septum was accessed by a sagittal incision, and the tissue was fragmented without completely isolating the nasal septum. Similarly to Tomé et al. (2009) [11], the technique is difficult to apply to adult animals due to their higher bone strength.

Alvites et al. (2018) [18] described a *post-mortem* dissection technique of the nasal cavity of the rat. The longest dissection duration involved cutting the alar fold extending along the lateral nasal wall. At the end, the entire nasal cavity as well as the olfactory recess and the respective mucosa were exposed caudally. When the olfactory mucosa was evident, collection should proceed cautiously. The epithelium lining the olfactory recess and part of the nasal septum were highlighted with an atraumatic tweezer. While trying to reproduce this technique, we encountered difficulties in obtaining uncontaminated samples. Hemorrhage was a problem, and subsequent cell culturing showed feasibility issues. Therefore, we introduced innovations in the procedure to obtain the nasal septum, with the craniotomy assisted by a high-speed diamond drill being the main step. This was followed by osteotomy in the midline of the skull and nasal bones, and isolation of the nasal septum with minimal bleeding, as described.

Rat ectomesenchymal cells enhance the recovery from experimental spinal cord injury in animal models. They must be obtained in a short period after the death of the donor animal, requiring proper collection from the nasal septum and subsequent processing. It is also important to avoid hemorrhagic contamination, a problem that frequently affects the homogeneity and viability of the samples. Employing the diamond drill at rat craniotomy for the isolation of the nasal septum was associated with viable cells in culture, adding to our dissection protocol as an effective manner to obtain ectomesenchymal cells for future preclinical studies of spinal cord injury repair.

REFERENCES

1. Orr MB, Gensel JC (2018) Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics* 15:541-553.
2. Fu SP, Chen SY, Pang QM, et al (2022) Advances in the research of the role of macrophage/microglia polarization-mediated inflammatory response in spinal cord injury. *Front Immunol* 13:1014013.
3. Marcon RM, Cristante AF, de Barros Filho TE, et al (2010) Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. *Spinal Cord* 48(11):808-813.
4. Jorge DMF, Marcon RM, Cristante 622 AF, et al (2023) Evaluation of the effect of intrathecal GM1 in 24, 48, and 72 hours after acute spinal cord injury in rats. *Clinics (Sao Paulo)* 78:100228.
5. Barros AGC, Dos Santos GB, Marcon RM, et al (2025) Erythropoietin to Treat Spinal Cord Injury: Evaluation of Different Doses and Magnitudes of Trauma in Rats. *Global Spine J* 15:2617-2633.
6. Lindsay SL, McCanney GA, Willison AG, Barnett SC (2020) Multi-target approaches to CNS repair: olfactory mucosa-derived cells and heparan sulfates. *Nat Rev Neurol* 16:229-240.
7. Chen X, Liu Y, Stavrinou P (2024) Spinal cord injury: Olfactory ensheathing cell-based therapeutic strategies. *J Neurosci Res* 102:e25283.
8. Jiang Y, Guo J, Tang X, Wang X, Hao D, Yang H (2022) The Immunological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Front Immunol* 3:881162.
9. Oieni F, Reshamwala R, St John J (2022) Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: The Cellular Superpowers for Nerve Repair. *Neuroglia* 3:139-143.
10. Liao JX, Zhu FQ, Liu YY, Liu SC, Liu ZX, Zhang WJ (2024) The role of olfactory ensheathing cells in the repair of nerve injury. *Eur J Pharmacol* 966:176346.
11. Tomé M, Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC (2009) Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells Int* 27:2196–2208.
12. Delorme B, Nivet E, Gaillard J (2010) The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev* 19:853-866.
13. Murrell W, Féron F, Wetzig A (2005) Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 233:496-515.

14. Rui K, Lin X, Tian J (2017) Ecto-mesenchymal stem cells: a new player for immune regulation and cell therapy. *Cell Mol Immunol* 15:82-84.
15. Laroni A, Novi G, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A (2013) Towards clinical application of mesenchymal stem cells for treatment of neurological diseases of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:1062-1076.
16. Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC, et al (2013) Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia* 61:368382.
17. Chang MCJ, Grieder FB (2014) The continued importance of animals in biomedical research. *Lab Anim (NY)* 53:295-297.
18. Alvites RD, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho ME, Varejão ASP, Maurício AC (2018) The Nasal Cavity of the Rat and Mouse-Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anat Rec (Hoboken)* 301:1678-1689.
19. Girard SD, Deveze A, Nivet E, Gepner B, Roman FS, Feron F (2011) Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *J Vis Exp* 54:pii: 2762.
20. Ercolin AC, Roballo KC, Casals JB (2016) Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. *Acta Cir Bras* 31:59-66.
21. Batissoco AC, Cruz DB, Alegria TGP, et al (2024) GJB2 c.35del variant up-regulates GJA1 gene expression and affects differentiation of human stem cells. *Genet Mol Biol* 47:e20230170.
22. Stamegna J-C, Girard SD, Veron A, Sicard G, Khrestchatisky M, Feron F, Roman FS (2014) A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. *Stem Cell Res* 12:673-679.

Figures

Figure 1

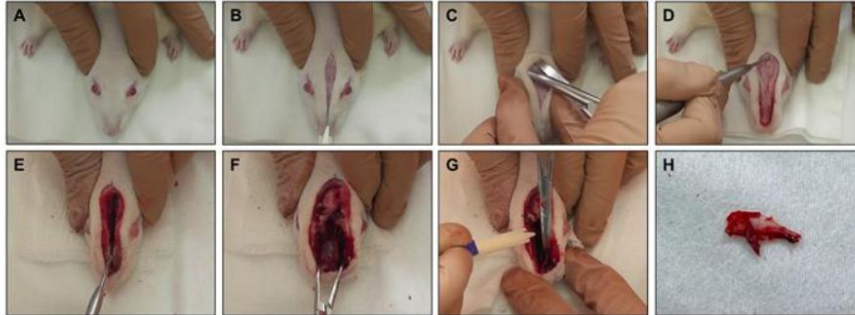


Figure 1: Technical aspects of the nasal septum isolation from *post-mortem* adult rat: (A) rat positioned in sternal decubitus, (B) longitudinal incision, (C) soft tissue dissection, (D and E) craniotomy and nasal osteotomy, (F) bone retraction, with evident nasal cavity, (G) nasal septum collection, and (H) isolated nasal septum.

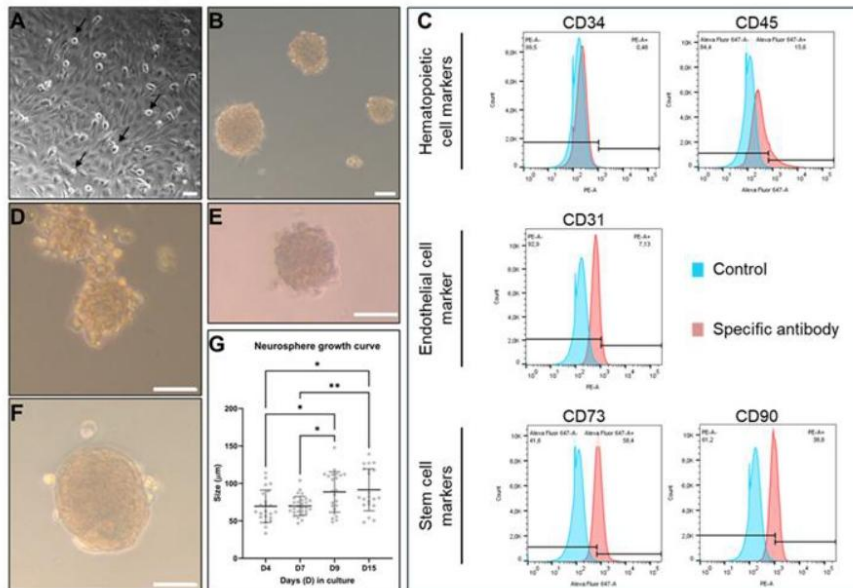
Figure 2

Figure 2: Analysis of adherent and floating cell populations. (A) Phase-contrast images showing confluent adherent cells on DIV 7 and bright floating cells (arrows). (B) Sphere-like structures formed in suspension culture of P3 cells 10 days after plating. (C) Flow cytometric analysis of P5 adherent cells collected at 90% confluence, analyzed for the expression of the hematopoietic cell markers CD34 and CD45, the endothelial cell marker CD31, and the mesenchymal stem markers CD73 and CD90. (D-F) Representative images of floating spheres of cells observed after four (D), seven (E) or 15 days in culture. (G) Dot plot of sphere size (μm) showing individual measurements taken on the indicated day in culture. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test ($\alpha = 0.05$). Data is presented as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Scale bars = 50 μm.

ANEXO D – Manuscrito em preparação

The neuroectodermal subpopulation of olfactory epithelium ectomesenchymal stem cells anticipates motor recovery from spinal cord contusion

Authors

Brian G.M.M. Coimbra^{1,2}, Gustavo B. Santos¹, Tarcísio E.P. Barros-Filho¹, Raphael M. Marcon¹, Luciana A. Haddad³, Alexandre F. Cristante^{2*}

Affiliations

(1) Spine Group, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

(2) Department of Orthopedics and Traumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

(3) Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Animals

Research followed international guidelines for the experimental use of animals, and had protocols approved by the Ethics internal review boards of the Bioscience Institute and Medical School of the University of São Paulo (FM-USP), São Paulo, SP, Brazil. Sixty-four male Wistar rats were obtained from the animal facility of FM-USP. Animals were maintained in the animal facility in cages (60 cm x 40 cm) on metabolic shelves with filtered air, in a temperature-controlled room, under clear and dark cycles of 12 hours each, and free access to food and water.

For the surgical procedure, 48 adult (20 to 21 weeks old) rats were included, weighing from 300 to 340 grams. At the beginning of the protocol, all animals were evaluated regarding general conditions (optimal fur and health

state) and mobility (normal mobility), which were inclusion criteria in the study. Exclusion criteria defined before the study were: (i) death after experimental spinal cord injury; (ii) macroscopic changes in injured site; (iii) autophagy and mutilation among animals; and (iv) normal mobility in first functional evaluation after injury (score higher than 2 in BBB scale). Before the procedure started, continuous training of the animals was performed to make them used to manipulation by the staff and to stimulate them to move freely (conditioning), leading to easier evaluation of mobility capacity after the injury.

Cell culture

Sixteen animals were used to provide tissue for cell culturing, four for each experiment, which was repeated three times. Nasal septum from four male rats were isolated according to Coimbra et al. (in preparation), washed in phosphate-buffered saline (PBS) and maintained in complete medium on ice. The olfactory epithelium was detached from the cartilage using sharp scalpels and transferred to a 60-mm plate. The tissue was rinsed with PBS five times, fragmented into small pieces, transferred to a microtube, and enzymatically digested with 500 μ L of TrypLE Express (Gibco, REF 12604-021; NY, USA) for 20 minutes at 37°C. For enzyme inactivation, fetal bovine serum (FBS; Gibco, 12657-029; NY, USA) was added at the same volume and the solution removed after tissue sedimentation. After resuspending the tissue in complete media (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (DMEM:F12; Gibco, 113300-032; CA, USA), supplemented with 10% FBS (Gibco, 12657-029; Brazil), 2X GlutaMAX (Gibco, 35035-061; NY, USA), 1X sodium pyruvate (Neon, 3077; Brazil), 100U penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco, 15140-122; NY, USA)), mechanical dissociation was performed by micropipettes of reducing caliber. The resulting cell suspension was transferred to a 60-mm dish with 6 mL of complete media and maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. Media change without washing was carried out on the first day in vitro (DIV) and on DIV 4 cells were washed twice with PBS and refed with complete media. Two cell populations were observed: fast-growing adherent cells known as the mesenchymal fraction and bright free-floating cells with a tendency to aggregate. The latter cell population was collected daily after 4 DIV and maintained in ultra-low-attachment dishes in neurosphere medium (1:2 DMEM:F12, 20 ng/ml basic fibroblast growth factor, 20 ng/ml epidermal growth factor, 1X B-27 (17504-044, Gibco), 5 μ g/ml heparin (H3149, Sigma Aldrich), 200 U/ml penicillin, 200 μ g/ml streptomycin (15140-122, Gibco), 2X L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAX, 35050-061, Gibco), and 1X sodium pyruvate (3077, Neon, São

Paulo, Brazil), in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂ for one week, passaged twice and P3 neurosphere cells were characterized for cell renewal and neuronal differentiation (10). Images were acquired at Zeiss Axiovert 40 CFL inverted light microscope (Zeiss, Germany) equipped with an AxioCam MRC5 CCD camera (Zeiss), and processed with AxioVision Rel. 4.7 software. Spheres were counted and measured using AxioVision or ImageJ software and panels were built with QuickFigures plugin. Neurospheres were fixed in 4% paraformaldehyde and processed for nestin expression by immunofluorescence, and neuronal differentiation.

Cytometry analysis

Adherent mesenchymal cells of passage 5 from one batch were detached with TrypLE and 9×10^5 cells, resuspended in 100 µL of PBS, and analyzed for the expression of cell surface markers by flow cytometry. For each antibody assayed, 1×10^5 cells were initially employed. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) in PBS for 15 minutes at 4°C and permeabilized with the cell permeabilization kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's protocol. Cells were washed with PBS, blocked in 2% BSA (bovine serum albumin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 minutes at room temperature, and incubated for one hour at 4°C, in the presence of the conjugated primary antibody in a 500-fold dilution in PBS, 2% BSA. Cells were washed once with PBS and resuspended in 300 µL of PBS. A minimum of 50,000 events was analyzed at FACS Aria II Flow Cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and the FACS Diva software. The antibodies were directed to human antigens: CD31 (ab25644, Abcam), CD34 (ab23830, Abcam), CD45 (550994, BD Biosciences), CD90 (ab24904, Abcam), CD73 (127207, BioLegend), CD105 (562759, BD Biosciences), and CD44 (553135, BD Biosciences). Data analysis and graph overlays were performed using FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences).

Study groups

Four study groups were established with 12 animals each. Animals from all groups were submitted to laminectomy. In addition, each of the following numbered groups comprised: (1) durotomy only (Sham group); (2) durotomy and spinal cord contusion (SCC); (3) durotomy, SCC followed by adding 30 µL of 90% Matrigel®; and (4) durotomy, SCC followed by adding 1×10^4 P3 undifferentiated neurosphere cells in 30 µL of 90% Matrigel®.

Durotomy and spinal cord contusion

Before the spinal cord injury and surgical repair, animals were subcutaneously injected with both tramadol (5 mg/kg) and pentabiotics (24,000 IU/kg) (14). Using an acrylic box, they were induced to anesthesia with isoflurane (1.5-2.0 vol%) in 100% oxygen air. After soft sedation, a mask was adjusted to the rat face, providing a deeper anesthetic condition. Trichotomy and cleaning of dorsal site were then performed.

An incision was made dorsally in midline to expose posterior elements of the spine, from T8 to T12. Spinal cord exposure to controlled injury was performed with aid of a surgical microscope (DFVasconcelos, São Paulo, SP, Brazil). Inserted muscles in spinous processes and laminae were detached from their osseous insertions, from T9 to T11. Bipolar scalpel was used to contain bleeding, when necessary. Utilizing bone rongeur, spinous process and lamina of T8 vertebra were removed to allow for spinal cord exposure and positioning of the tip of the NYU-Impactor (New York University, 1992). The animal position was adjusted, and the equipment calibrated to the height of 12.5 mm sufficient for moderate contusion (11). Once the medullary contusion was confirmed, paravertebral muscular en bloc suture was accomplished, followed by cutaneous suture. All surgical complications were documented.

Postoperative care and analysis

Animals have received 5 mg/kg tramadol every eight hours for five days, 24,000 IU/kg pentabiotics every 12 hours for seven days, and 5 mg/kg meloxicam once a day for three days (12). After SCC, animals received bladder massage twice a day for five days to relieve neurogenic bladder (13-15). At maximum two animals per cage were maintained in the same environmental conditions (handling, *ad libitum* eating, regular cleaning) until the end of experiment. All rats were monitored daily to check for mutilations, infections and other disturbances and complications that would exclude them from the study.

During the 42-day postoperative period, functional recovery of motion after SCC was evaluated with the BBB scale, developed by Basso, Beattie and Bresnahan (11). Its final score was taken as a measurement of the primary outcome. This scale has been previously standardized in our laboratory (16). It is based on a visual evaluation performed by two trained blind observers. In addition, motor evaluations were recorded on superior and lateral views with a high-resolution camera (EOS-T7, Canon Inc., Japan). If any doubts aroused from the examiners' assessments,

the recorded videos were consulted. The lowest score between observers was considered for the study. All the rats were evaluated before SCC and in the following days of the postoperative period: day 2 (D2), day 7 (end of week 1; W1), day 14 (W2), day 21 (W3), day 28 (W4), day 35 (W5), and day 42 (W6).

The BBB scale allows evaluating the locomotor system in an objective, simple, fast, and accurate way. Data was analyzed and recorded in the proper form. We highlight the ten categories and classifications within parenthesis that broadly constitute the functional assessment of the BBB scale: (1) pelvic girdle and lower limbs (hip, knees, ankles); (2) trunk position (lateralized or standing); (3) abdomen position (dragging, parallel, high); (4) paw placement (sweeping, plantar with and without weight bearing); (5) stepping – limb dislocation (dorsal or plantar); (6) walking coordination; (7) finger movement (toe clearance); (8) predominant paw position (initial contact with ground and lifting off); (9) postural instability; and (10) tail position (up or down). The sequential progression from the first through the last BBB scale categories corresponds to early, intermediate, and late phases of motor recovery. The evaluation of each category is made according to a scoring system, ranging from one to four degrees (i.e., absent, occasional, frequent, consistent), leading to a final score that ranges from 0 (absent mobility) to 21 (normal mobility). To confirm the SCC, animals should have a BBB score lower than 4, corresponding to noteworthy neurologic deficit (11).

Histological analyses

After the isolation of the animal's spine at T8-T11 level, it was fixed in 4% paraformaldehyde, submitted to sucrose treatment and then embedded in paraffin. Sections were obtained onto silanized slides, which were stained in three different approaches, comprehending hematoxylin-eosin, immunohistochemistry using the oligodendrocyte progenitor markers NG2 chondroitin sulfate proteoglycan MAB5384 (Chemicon) and O1 MAB344 (Chemicon); mature oligodendrocyte marker Olig2 AB9610 (Abcam) and the inflammatory microglia marker CD11b ab8878 (Abcam), following standard procedures (10).

Statistical analysis

Parameters quantitatively described according to the experimental groups and postoperative days were recorded as average, standard deviation, median, minimum, and maximum values. Animals with neurogenic bladder were assigned a score of 1 while those without it received a score of zero, and values compared by Kruskal-Wallis

and post-hoc test of Dunn. The BBB score is represented by mean and standard error. The comparisons used widespread estimated equations with normal Poisson distribution and identity linking function, assuming correlation matrix AR (1) among the BBB scale assessment in postoperative days. Animal weight changes were separately described by groups and compared using ANOVA variance analysis (16). Analyses were followed by multiple Bonferroni comparisons to identify between which groups or periods the changes occurred (16). To make the analyses, IBM-SPSS software for Windows (version 22.0) was used. Microsoft Excel 2013 spreadsheets were employed to organize the data. A P-value was considered significant when it was lower than 0.05.

Results

When primarily cultured in complete medium, dissociated olfactory mucosa lamina propria provides dish-adhering mixed population of cells, enriched in those of mesenchymal origin (Coimbra et al., submitted). Cultivation of this cell population under conditions that favor non-adherence allows them to proliferate as a neuroectodermal subpopulation in suspension culture (17), known here as neurospheres. In culture media the diameter of single neurospheres were measured for at least 20 neurospheres on the same DIV, on DIV 4 (N=22; mean $69.47 \mu\text{m} \pm 21.61$), DIV 7 (N=29; mean 69.83 ± 12.69), DIV 9 (N=23; mean 88.61 ± 26.95) and DIV 15 (N=21; mean 91.47 ± 28.05). Passage-3 neurosphere diameter increased among groups (ANOVA, $P < 0.05$), highlighting specific shifts in size from DIV 4 to DIV 9, DIV 4 to DIV 15, DIV 7 to DIV 9, and DIV 7 to DIV 15 (Tukey post-hoc test, $P < 0.05$).

Postoperative analyses

Five experimental groups, each one composed of 12 male rats, were established for the surgical procedure. Animals of all groups (1 to 5) were submitted to laminectomy, and from groups 2 to 5 additionally had durotomy. Subjects in groups 3, 4 and 5 were submitted to SCC. Group 3 was the negative control group, as animals were not treated with either cells or vehicle. Animals from groups 4 and 5 received 90% Matrigel® vehicle before tissue suture, whereas those from group 5 also received undifferentiated neurosphere cells which were suspended in Matrigel® immediately after SCC and before tissue suture. In groups 2, 3 and 5, there was one animal excluded from each, due to autophagy or the ineffectiveness of SCC. Body weight, bladder tonus and motor function were assessed before and after surgery on day 2 (D2) and upon completion of weeks 1 (W1), 2 (W2), 3 (W3), 4 (W4), 5

(W5) and 6 (W6). The effects of the SCC on the motor function (D2) and postoperative motor recovery (D2 – W6) were evaluated using the scale developed by Basso, Beattie and Bresnahan (BBB scale) based on ten categories of behavior, ranging from limbs' motion to tail position in space, yielding a final score from 0 (zero) to 21 (11). As all animals from groups 1 (laminectomy only) and 2 (laminectomy plus durotomy) scored 21 at the BBB scale along the study (Supplementary Table 1), the two procedures, laminectomy and durotomy, were considered safe and these control groups were not taken into consideration in further analyses.

Throughout the study, there was no difference in body weight among animals from the three groups (ANOVA, $P=0.896$). Neurogenic bladder was observed in all animals submitted to SCC and lasted through W5 for group 3 animals and W4 for groups 3 and 4, a significant difference among the three groups ($P=5 \times 10^{-9}$, Kruskal-Wallis's test).

On D2, at least 50% of all animals from each group 2, 3 or 4 scored zero on the BBB scale and the others scored 1 or 2 (Supplementary Table). There was no difference among the three groups on D2 (Table 1). This data showed the efficiency of the contusion on the spinal cord and homogeneity among animals from each group. Unpaired and paired comparisons of the BBB scale value along the postoperative time, from D2 through W6, revealed motor function enhancement within each group 3, 4 or 5 (Table 2; Figure x).

When individual times were considered, differences among groups' BBB scores were noticed on W1 and W2 (Kruskal-Wallis's test, $P=2.89 \times 10^{-5}$ and 2.39×10^{-5} , respectively), with the highest values for group 5 animals, which received cells in Matrigel® (mean of 3.63 on W1 and 5.36 on W2), significantly different from group 3 (mean of 1.25 on W1 and 2.18 on W2) or group 4 animals (mean of 0.83 on W1 or 2.75 on W2) (Table 2). Altogether, BBB data on W1 and W2 show that groups 3 and 4 were similar, whereas group 4 animals had significantly higher scores than any of the two other groups.

Each one of the two test groups of animals (groups 4 and 5) presented significantly higher BBB scores on W3 when compared to their own D2 values (Table 1). Of note groups 2 and 3 were similar ($P=0.19$). D2 BBB values differed from W4 values within each group (groups 3, 4 or 5; Table 2). On W4 Matrigel® alone (group 3) was superior to control but still lower than group 4 (Bonferroni corrected Dunn's post-hoc test, $P = 0.03$ and $P = 0.04$, respectively). The same BBB score profile per group lasted through W5. On W6, groups 3 and 4 differed from group 2 (Bonferroni, $P<0.05$), which had the lowest BBB score among the three groups (8.8 ± 1.8). Group 4 (13 ± 1.1) had

the highest mean BBB score among all groups of animals submitted to SCC and similar values to those of group 3 (11.9 ± 1.7).

Discussion

SCI is disabling, irreversible and has a high economic and social impact. It is associated with a devastating effect on quality of life for the patient, causing pathophysiological deficits in cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, urogenital, neurologic, and musculoskeletal systems. The extent of these disturbances directly relates to the severity of the neurological impairment. The most frequent SCI cause is trauma although it can also follow infection, vascular and inflammatory damage, neoplasia, or iatrogenic events. Dealing with SCI patients remains a considerable challenge in Medicine. In this study, we induced contusion at T8-T9 spinal cord of rats as an acute moderate-intensity lesion and employed the scaffolding material Matrigel® and neurospheres derived from ectomesenchymal cells of the adult rat olfactory epithelium in transplantation immediately following the injury. Our results disclose significantly superior earlier motor benefits for stem cells embedded in Matrigel® than Matrigel® alone.

We adopted the experimental model of SCC with mass fall (MASCIS Impactor NYU, 1992) in Wistar rats because it uniformly promotes injury among samples. Another method with similar performance is the 'Ohio State University Impactor System – OSU Impactor'. Basso et al. demonstrated that both systems are efficient and equivalent in terms of proper SCC, additionally allowing for progression and stabilization of the functional capability four weeks later (11). Our choice for thoracic SCC of moderate intensity (12.5 mm) based on the technique proposed by Rodrigues was supported by the functional outcome of the animals (24). They become paraplegic after 12.5-mm weight contusion yet retain enough motor ability to guarantee their subsistence (feeding and drinking) permitting the assessment of residual functional capability. The system mass can be adjusted to heights of 6.25, 12.5, 25 to 50 mm. If 50 mm is selected, the rats become paraplegic and present high mortality rates in the first postoperative week, while a contusion from a 6.25-mm height leads to nearly complete functional recovery within ten days independently of any intervention (9, 30-35).

The BBB scale is adopted in research centers that employ the MASCIS NYU impactor. It allows, in a similar way to NYU Impactor, standardization of methods and comparison of results. An additional advantage is the quick and objective visual assessment made by two blinded evaluators. According to Basso et al., in case of disparity of scores,

the lowest one should be elected (11). The BBB scale is an improvement of Tarlov score system (36) because it offers superior levels of reproducibility, and precise definition that favors a more discerning observation.

In human SCI, the deposition of a dense scar and the loss of an oriented astroglial framework point to a non-supportive environment for outgrowing nerve fibers (4). Therefore, diverse stem cells and scaffolding materials have been tested to improve the regenerative capacity of the spinal cord recovering from injury. It is generally challenging to integrate data from studies aiming at neural stem cell transplantation in rat SCI experimental models, due to spine lesions induced at different levels and with varying depths, cells from diverse origins, and distinct administration routes, scaffolding alternatives as well as postoperative endpoints.

Our previous study employed the SCC rat model, BBB scale report and neurosphere cells cultivated from neonate rat forebrain in 70% Matrigel. It corroborated the literature in three aspects: (i) Matrigel® (laminin purified from mouse skin lamina propria) itself has a reparative effect; (ii) neurosphere cells from the cerebral cortex of developing rodents are a gold standard source of tissue for neurosphere transplantation, despite their restricted access; and (iii) undifferentiated neurospheres have superior effects for tissue regeneration than those that initiated neuronal differentiation before transplantation. Matrigel® at 70% concentration was too soft to operate during surgery. Hence, for the present study we reduced the volume of 50 μ L to 30 μ L and increased the matrix concentration to 90%, what rendered the gel firmer to handle. In the present study we also aimed at employing the olfactory epithelium as an easier access to neuroprogenitor cells. Ongoing morphological analyses should aggregate to our functional data. Further studies will allow us to understand the molecular mechanisms leading to functional recovery, such as neurogenesis and better resolution of the astroglial scar.

Scaffolding composed of different materials has been employed in combination with stem cells to assess motor recovery from spinal cord injury of model animals (37-42). Matrigel® promotes the differentiation of different cell types and the outgrowth of differentiated cells from tissue explants. Primary and established cell lines show a more differentiated phenotype in contact with Matrigel®, which increases cell-cell contact and cell aggregation (43). Matrigel® supports cell survival, migration and neurite outgrowth and should reduce the immune response to graft. Neurons differentiated *in vitro* from neuroglial progenitor cells in Matrigel® have the highest viability in the first two weeks and decrease to 50% by the fourth week. The number of neuroprogenitor cells decreases to 30% after four weeks in 3D culture (44). It is assumed that Matrigel® has a variable composition of extracellular matrix components and contaminating growth factors. In fact, Matrigel® as the one employed in the present study is

reduced but not exempt of growth factors. As it is purified from animal tissue, it is natural to assume its variability among distinct purification batches. Different combinations of growth factors and Matrigel® should elicit neurogenesis *in vitro* (45). The SCC animal response to Matrigel® with or without stem cells should depend on the Matrigel® batch, injured spinal cord microenvironment, and surgical protocol. Therefore, the employment of recombinant or synthetic jellifying scaffolding molecules such as hydrogel should be encouraged to future studies.

In search for the factors from the injury microenvironment and cell therapy approach that should lead to a better functional response, animal research allows for identification of molecules with functional roles in regulating the inflammatory/immune response and mobilizing endogenous stems cells to repair (46). Cell-based therapies for SCI reporting functional gain in postoperative recovery are believed to mediate a paracrine effect by secreting trophic factors that signal the injury microenvironment. In fact, changes in gene expression at the mRNA and protein levels have been observed in the injury site a few days to weeks after neural stem cell transplantation (45). These observations suggest that an ensemble of secreted factors including soluble small molecules and long chains of extracellular matrix components plays roles in mediating successful healing and repair of the SCI site (6). Our results on the superiority of the combination between 90% Matrigel® and undifferentiated neural stem cells from the olfactory epithelium in the early motor recovery from SCC support the idea of a paracrine effect. However, since it consisted of an allogeneic transplant of genetically unmodified cells, one cannot rule out the possibility of a direct effect on the spinal cord regeneration as the cells cannot be mapped in the organism. Future heterologous transplantation studies are likely to address this theme.

References

1. Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology* 2013;41(2):65-85; doi: 10.1159/000350710.
2. Nudi ET, Jacqmain J, Dubbs K, et al. Combining Enriched Environment, Progesterone, and Embryonic Neural Stem Cell Therapy Improves Recovery after Brain Injury. *J Neurotrauma* 2015;32(14):1117-1129; doi: 10.1089/neu.2014.3618.
3. Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of life of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res* 2008;31(3):247-251; doi: 10.1097/MRR.0b013e3282fb7d25.

4. Buss A, Brook GA, Kakulas B, et al. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain* 2004;127(Pt 1):34-44; doi: 10.1093/brain/awh001.
5. Liu F, Huang Y, Wang H. Rodent Models of Spinal Cord Injury: From Pathology to Application. *Neurochem Res* 2023;48(2):340-361; doi: 10.1007/s11064-022-03794-8.
6. Wu Y, Tang Z, Zhang J, et al. Restoration of spinal cord injury: From endogenous repairing process to cellular therapy. *Front Cell Neurosci* 2022;16:1077441; doi: 10.3389/fncel.2022.1077441.
7. Orr MB, Gensel JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics* 2018;15(3):541-553; doi: 10.1007/s13311-018-0631-6.
8. Fu SP, Chen SY, Pang QM, et al. Advances in the research of the role of macrophage/microglia polarization-mediated inflammatory response in spinal cord injury. *Front Immunol* 2022;13:1014013; doi: 10.3389/fimmu.2022.1014013.
9. Narazaki DK, Barros Filho TE, Oliveira CR, et al. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2006;61(5):453-460; doi: 10.1590/s1807-59322006000500013.
10. Santos GB, Marin ABS, Coimbra BGMM, et al. Undifferentiated forebrain neural stem cells improve motor recovery from acute thoracic spinal cord contusion in rats. Submitted.
11. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12(1):1-21; doi: 10.1089/neu.1995.12.1.
12. Flecknell P. Laboratory animal anaesthesia. 4.ed. Academic press: Elsevier; 2015. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13494-0>
13. Santos GBD, Cristante AF, Marcon, RM, et al. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras* 2011;19(2):87-91; doi: 10.1590/S1413-78522011000200005
14. Paschon V, Morena BC, Correia FF, et al. VDAC1 is essential for neurite maintenance and the inhibition of its oligomerization protects spinal cord from demyelination and facilitates locomotor function recovery after spinal cord injury. *Sci Rep* 2019;9(1):14063; doi: 10.1038/s41598-019-50506-4.
15. Cristante AF, Barros Filho TE, Marcon RM, et al. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67(10):1219-1224; doi: 10.6061/clinics/2012(10)16.
16. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, et al. Applied Linear Statistical Models. 4.ed. WCB McGraw-Hill, New York; 1996.

17. Delorme, B. et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* 19, 853–866 (2010).
18. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60(4):585-595; doi: 10.1016/0092-8674(90)90662-x.
19. Way SW, McKenna J 3rd, Mietzsch U, et al. Loss of Tsc2 in radial glia models the brain pathology of tuberous sclerosis complex in the mouse. *Hum Mol Genet* 2009;18(7):1252-1265; doi: 10.1093/hmg/ddp025.
20. Haddad LA, Smith N, Bowser M, et al. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem* 2002;277(46):44180-44186; doi: 10.1074/jbc.M207211200.
21. Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res* 1998;58(21):4766-4770.
22. van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 1998;7(6):1053-1057; doi: 10.1093/hmg/7.6.1053.
23. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, et al. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochem* 1986;25(2):312-318.
24. da Silva Siqueira L, Majolo F, da Silva APB, et al. Neurospheres: a potential in vitro model for the study of central nervous system disorders. *Mol Biol Rep* 2021;48(4):3649-3663; doi: 10.1007/s11033-021-06301-4.
25. Ford RW. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg* 1983;59(2):268-275; doi: 10.3171/jns.1983.59.2.0268.
26. Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol* 1985;88(1):135-149; doi: 10.1016/0014-4886(85)90119-0.
27. Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. *Exp Neurol* 1987;95(2):530-533; doi: 10.1016/0014-4886(87)90162-2.
28. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, et al. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma* 1992;9(3):197-217; doi: 10.1089/neu.1992.9.197.
29. Schmaus H. Beiträge zur pathologischen Anatomie der Rückenmarkerschütterung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1890;122(3):470-495.

30. Rodrigues NR. Padronização da lesão medular espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
31. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996;139(2):244-256; doi: 10.1006/exnr.1996.0098.
32. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg* 1994;80(1):97-111; doi: 10.3171/jns.1994.80.1.0097.
33. Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, et al. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 1999;34(2):85-89.
34. Marcon, RM. Avaliação funcional e histológica do efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular contusa [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
35. Cristante AF, Barros Filho TE, Oliveira RP, et al. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord* 2009;47(6):458-463; doi: 10.1038/sc.2008.155.
36. Wang J, Chu R, Ni N, et al. The effect of Matrigel as scaffold material for neural stem cell transplantation for treating spinal cord injury. *Sci Rep* 2020;10(1):2576; doi: 10.1038/s41598-020-59148-3.
37. Caron I, Rossi F, Papa S, et al. A new three dimensional biomimetic hydrogel to deliver factors secreted by human mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Biomaterials*. 2016;75:135-147.
38. Chedly J, Soares S, Montembault A, et al. Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. *Biomaterials* 2017;138:91-107.
39. Fan C, Li X, Xiao Z, et al. A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair. *Acta Biomater* 2017;51:304-316.
40. Jiao G, Lou G, Mo Y, et al. A combination of GDNF and hUCMSC transplantation loaded on SF/AGs composite scaffolds for spinal cord injury repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017;74:230-237.
41. Liu X, Hao M, Chen Z, et al. 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair. *Biomaterials* 2021;272:120771.
42. Ma D, Zhao Y, Huang L, et al. A novel hydrogel-based treatment for complete transection spinal cord injury repair is driven by microglia/macrophages repopulation. *Biomaterials* 2020;237:119830.

43. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005;15(5):378-386.
44. Koutsopoulos S, Zhang S. Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, matrigel and collagen I. *Acta Biomater* 2013;9(2):5162-5169.
45. Nierode GJ, Gopal S, Kwon P, et al. High-throughput identification of factors promoting neuronal differentiation of human neural progenitor cells in microscale 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2019;116(1):168-180.
46. Hu X, Xu W, Ren Y, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):245.

ANEXO E – Resultados para a escala BBB: Avaliação funcional dos grupos 1 a 5

Laminectomia

Grupo 1	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	312	322	3.21%
RATO 2	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	314	344	9.55%
RATO 3	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	289	322	11.42%
RATO 4	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	278	308	10.79%
RATO 5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	306	321	4.90%
RATO 6	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	311	344	10.61%
RATO 7	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	322	345	7.14%
RATO 8	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	309	322	4.21%
RATO 9	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	325	355	9.23%
RATO 10	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	290	324	11.72%
RATO 11	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	332	346	4.22%
RATO 12	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	289	307	6.23%

Laminectomia + Durotomia Micro

Grupo 2	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	245	278	13.47%
RATO 2	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	309	322	4.21%
RATO 3	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	302	310	2.65%
RATO 4	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	298	306	2.68%
RATO 5	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	300	325	8.33%
RATO 6	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	290	310	6.90%
RATO 7	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	277	320	15.52%
RATO 8	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	320	355	10.94%
RATO 9	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	305	335	9.84%
RATO 10	14	14	14	12	12	12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	290	295	1.72%
RATO 11	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	300	323	7.67%
RATO 12	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	280	305	8.93%

Laminectomia + Durotomia + Lesao

Grupo 3	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	1	0	2	1	1	2	4	4	4	5	7	8	10	9	9	234	268	14.53%
RATO 2	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5	8	8	10	10	10	244	276	13.11%
RATO 3	0	0	0	0	2	2	3	4	6	8	10	10	12	12	12	265	288	8.68%
RATO 4	1	0	1	1	2	1	2	3	6	6	6	6	8	9	8	321	344	7.17%
RATO 5	0	0	1	0	2	3	3	3	6	6	8	8	10	10	10	332	339	2.11%
RATO 6	1	1	2	1	2	2	2	2	4	6	7	7	8	7	7	344	354	2.91%
RATO 7	1	0	0	0	3	2	2	2	3	4	4	6	8	8	8	321	365	13.71%
RATO 8	1	1	2	2	3	4	4	4	x	x	x	x	x	x	x	354	312	-11.86%
RATO 9	1	0	1	1	2	3	4	4	4	6	6	7	8	9	8	298	325	9.06%
RATO 10	1	1	2	2	3	4	5	4	4	4	5	5	6	6	6	267	288	7.87%
RATO 11	0	0	1	1	2	3	4	4	4	6	8	8	11	11	11	298	312	4.70%
RATO 12	1	1	2	2	3	4	5	4	4	4	5	5	8	8	8	267	288	7.87%

Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel

Grupo 4	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	0	1	1	0	4	3	6	6	8	8	10	12	14	13	14	320	345	7.81%
RATO 2	1	1	1	0	3	4	4	4	5	5	8	8	12	12	12	267	289	8.24%
RATO 3	0	1	0	0	2	2	3	4	8	8	10	12	12	12	12	288	316	9.72%
RATO 4	0	0	1	1	4	4	6	6	8	8	11	11	12	12	12	298	327	9.73%
RATO 5	0	0	1	0	2	3	5	5	7	7	12	12	11	12	11	307	344	12.05%
RATO 6	0	1	1	1	2	2	6	6	8	8	12	12	12	14	14	276	290	5.07%
RATO 7	0	0	0	0	3	2	4	4	6	6	8	8	12	13	13	301	322	6.98%
RATO 8	0	1	1	1	2	2	4	4	8	8	12	12	14	14	14	304	354	16.45%
RATO 9	1	0	1	1	2	3	5	5	7	7	8	8	10	10	10	295	317	7.46%
RATO 10	1	1	2	1	3	3	2	2	6	6	7	7	8	8	8	289	309	6.92%
RATO 11	0	0	1	1	2	3	4	4	8	8	10	10	13	13	13	300	328	9.33%
RATO 12	0	0	0	0	4	4	5	6	7	7	10	11	14	14	14	278	307	10.43%

Laminectomia + Durotomia + Lesão + Matrigel + Células EMSC

Grupo 5	2 Dias		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		TOTAL	Peso Inicial	Peso Final	% Peso
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D				
RATO 1	0	0	2	2	6	6	8	8	10	10	11	12	11	11	11	297	312	5.05%
RATO 2	0	1	4	4	8	8	8	8	12	12	12	13	14	14	14	321	344	7.17%
RATO 3	1	1	2	2	4	4	4	5	8	8	12	12	12	12	12	302	324	7.28%
RATO 4	0	0	4	4	5	5	6	6	10	10	12	12	14	14	14	304	312	2.63%
RATO 5	15	15	18	18	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	278	x	
RATO 6	1	2	4	4	6	6	5	5	8	8	12	12	13	13	13	296	315	6.42%
RATO 7	0	0	2	2	4	4	4	4	8	8	12	12	14	14	14	300	318	6.00%
RATO 8	1	1	4	4	6	6	8	8	12	12	12	12	13	12	13	276	298	7.97%
RATO 9	1	1	5	4	5	6	8	8	12	12	14	14	14	15	15	290	312	7.59%
RATO 10	0	0	4	4	4	6	8	8	12	14	14	14	14	14	14	310	343	10.65%
RATO 11	1	2	4	4	5	5	5	5	8	8	12	12	13	13	13	304	348	14.47%
RATO 12	0	0	2	2	6	6	8	7	12	11	13	13	12	13	12	300	338	12.67%

[illegible]

Grupo 3 - Laminectomia + Durotomia + Lcsao	2 dias	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
Rato 1	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 2	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Rato 3	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 4	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 5	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 6	presente	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente
Rato 7	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 8	presente	presente	presente	presente	x	x	x
Rato 9	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 10	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 11	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Rato 12	presente	presente	presente	presente	presente	presente	ausente
Grupo 4 - Laminectomia + Durotomia + Lcsão + Matrigel	2 dias	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
Rato 1	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 2	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Rato 3	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 4	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 5	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 6	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Rato 7	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 8	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 9	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 10	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 11	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 12	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Grupo 5 - Laminectomia + Durotomia + Lcsao + Matrigel + Células	2 dias	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
Rato 1	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 2	presente	presente	presente	presente	presente	ausente	presente
Rato 3	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 4	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 5	ausente	ausente	x	x	x	x	x
Rato 6	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 7	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 8	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 9	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 10	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Rato 11	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Rato 12	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente