

UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES ALOGÊNICAS NO TRATAMENTO DE CANINOS ACOMETIDOS POR UM QUADRO DE APLASIA MEDULAR EM DECORRÊNCIA DA DOENÇA RENAL

SANTOS, Enrico Jardim Clemente ¹;
MAZZEO, Angela ²;
BRAGA, Camila Landim ³.

Recebido: 13/05/2021

Aceito: 02/08/2021

¹Biotecnólogo, Mestre, Doutor, Pesquisador, terapia com células tronco, medicina regenerativa, engenharia tecidual; ²Farmacêutica, Doutoranda, Universidade de São Paulo; ³Médica Veterinária, Especialista em nefrologia veterinária.

RESUMO

Aplasia medular tem por característica apresentar um quadro laboratorial no qual a medula do paciente passa a ser constituída por uma taxa de celularidade inferior a 10%. O exame de mielograma tende a apresentar uma redução significativa ou mesmo ausência das linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica. O quadro de aplasia medular pode ter origem em diversos fatores, como doença renal crônica (DRC), uma síndrome caracterizada pelo comprometimento do metabolismo renal, que ocorre de forma dinâmica e progressiva, culminando na perda das funções fisiológicas dos rins. As células progenitoras adultas multipotentes (CPAMs), presentes em todos os tecidos que constituem o organismo, têm como características principais o seu potencial de autorrenovação e diferenciação celular. Neste estudo, nove caninos sem distinção de raça e sexo, com idades entre três e 12 anos, acometidos por um quadro de aplasia medular decorrente da DRC, foram submetidos a ação terapêutica das células progenitoras adultas multipotentes de tecido adiposo canino (CPAMs-TAC), oriundas de um animal doador saudável. Foram realizadas três infusões pelas vias endovenosa ou intramedular, com intervalo médio de 30 dias, sem efeitos adversos aparentes, tendo sido observada uma melhora clínica, ganho de apetite e aumento da disposição após a primeira aplicação. Os pacientes demonstraram uma significativa melhora da função renal, assim como a recuperação do quadro de aplasia medular, uma vez que os dados hematológicos demonstraram a normalização das linhagens medulares. Conclui-se que a terapia com as infusões das CPAMs-TAC resultou em uma satisfatória recuperação dos cães acometidos pelo quadro de aplasia medular.

Palavras-chave: Células progenitoras adultas multipotentes. Aplasia medular. Insuficiência renal. Terapia celular.

INTRODUÇÃO

A doença renal (DR), a mais comum afecção renal em cães, é uma síndrome que resulta em elevados índices de morbidade e mortalidade (GRAUER et al., 2005). Esta síndrome se caracteriza pelo comprometimento do metabolismo renal, culminando na perda das funções fisiológicas dos rins. A DR se desenvolve de forma gradualmente progressiva e dinâmica, por períodos que podem variar de meses até anos (PRESSLER, 2013). Os rins são responsáveis pela filtração do sangue, a fim de excretar resíduos metabólicos, além de liberar hormônios que têm papel vital no controle da pressão arterial sistêmica (sistema renina - angiotensina – aldosterona) e na produção de glóbulos vermelhos através da produção de eritropoetina (PRESSLER, 2013).

As terapias convencionais que incluem fluidoterapia, orientação dietética e diálise visam prover uma melhora na qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, mesmo utilizando-se terapias conservativas, a injúria estrutural pode evoluir, favorecendo a redução da massa renal e conseqüentemente a falência do órgão (CASTRO, 2005).

Com o progresso da DR os pacientes apresentam uma reduzida capacidade de sintetizar eritropoietina (o córtex renal produz aproximadamente 90%), ocasionando um quadro de anemia hipoplásica da linhagem eritroide, o que torna o animal dependente de eritropoietina sintética (FELDMAN, 2000, 2005). Tratamentos muito prolongados ocasionam um processo de resistência à eritropoietina sintética levando o animal a apresentar um quadro de aplasia medular (WEISS, 2003).

A aplasia medular, também conhecida como anemia aplásica, é uma doença que acomete cães e gatos, sem predileção por raça, sexo ou idade. O quadro de aplasia medular se caracteriza por apresentar pancitopenia na circulação sanguínea periférica e uma taxa de redução dos três tipos celulares (eritroide, mieloide e megacariocítica) inferior a 10% ou mesmo a ausência deles, uma vez que ocorre, na medula óssea, a substituição do tecido hematopoiético pelo tecido adiposo. Entretanto, ainda é possível encontrar na medula óssea algumas células reticulares, endoteliais, macrófagos, mastócitos e alguns linfócitos (GRINDEM et al., 2009; HARVEY, 2001). Perante esse estado clínico, faz-se necessário que o paciente seja

submetido a repetidas transfusões sanguíneas visando a recuperação da capacidade de transporte de oxigênio e, por conseguinte, a melhora dos sinais clínicos (ROCHA et al., 2009). Uma vez que estes pacientes necessitam de periódicas transfusões sanguíneas, outras fontes de tratamento para a aplasia medular devem ser consideradas, dentre elas a utilização da terapia com células progenitoras adultas multipotentes (CPAMs).

As CPAMs, mais comumente conhecidas na literatura científica como células-tronco mesenquimais (CTM), são definidas como uma população celular não especializada, longas e achatadas, apresentando uma morfologia fibroblastoide. Possuem habilidade de se aderir a superfícies poliméricas, elevado potencial de proliferação e são capazes de se autorrenovarem, dando origem, de acordo com o microambiente onde se encontram, a múltiplas linhagens celulares. Presentes em todos os tecidos que constituem o organismo, as CPAMs são responsáveis pela manutenção da homeostase e dos processos reparativos do microambiente celular dos tecidos injuriados. Estes ocorrem por meio da diferenciação celular, modulação do sistema imunológico através da ação supressora das respostas imunológicas inata e adaptativa, renovação celular, ação antiapoptótica por meio da prevenção da morte celular via restauração do microambiente local, produção de proteínas inibidoras de apoptose e diminuição da expressão de proteínas apoptóticas, inibição do estresse oxidativo, responsável por ocasionar redução na taxa de proliferação celular, aumentar a senescência e inibir o efeito imunomodulatório das CPAMs, ação angiogênica na qual novos vasos sanguíneos surgem a partir de vasos pré-existente e ação antifibrótica, responsável por reduzir a formação de cicatrizes (CAPLAN; HARIRI, 2015; YAGI et al., 2010).

Devido ao seu potencial de expansão *in vitro*, capacidade de tratar lesões teciduais, manutenção de suas propriedades imunomodulatórias e de diferenciação, mesmo após longos períodos de criopreservação, as CPAMs se apresentam como um recurso em potencial tanto para ensaios como para terapias clínicas. Entretanto, para que as CPAMs exerçam seu papel de forma satisfatória, alguns fatores devem ser considerados, pois influenciam diretamente no potencial terapêutico das mesmas. Dentre estes, estão a qualidade das células a serem utilizadas, integridade celular, capacidade de se autorrenovarem, *in vitro*, por tempo limitado, potencial de diferenciação, idade do doador, características clínicas, taxa de

senescência, função parácrina, além do fato de sua vida útil variar de espécie para espécie (CAPLAN; HARIRI, 2015).

Na medicina veterinária, a terapia com células-tronco tem se mostrado segura e eficaz no que tange o tratamento de diversas doenças que acometem tanto os pequenos como os grandes animais. Dentre estas, estão as osteoartrites (BLACK et al., 2007, 2008), lesões tendíneas (SMITH; WEBBON, 2005), doença renal (SANTOS et al., 2018b, 2019b), úlceras (ALAMOUDI et al., 2014), complexo gengivite estomatite felina (ARZI et al., 2017), seqüela neurológica de cinomose (SANTOS et al., 2019a), lesão medular (KIM et al., 2016), lesões na córnea (MORIYAMA et al., 2014), dentre outras.

Neste estudo, objetivou-se determinar a segurança e a eficácia terapêutica das CPAMs alogênicas, derivadas do tecido adiposo de cães e expostas ao processo de criopreservação, em cães acometidos por um quadro de aplasia medular em decorrência da doença renal.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo científico

No presente estudo utilizamos inicialmente a via endovenosa por ser de fácil realização, pouco invasiva e traumática, causando mínimos efeitos colaterais. Foram realizados dois transplantes de CPAMs pela via endovenosa e um pela via intramedular. Não foi utilizado um grupo controle uma vez que a aplasia é uma enfermidade grave não sendo ético submeter os animais a tratamentos que possam comprometer o estado de saúde e/ou vida dos mesmos.

Seleção do animal doador do tecido adiposo

As células progenitoras adultas multipotentes derivadas do tecido adiposo (CPAMs-TAC) utilizadas, foram isoladas a partir de um fragmento tecidual obtido da porção abdominal interna, mais precisamente da região de incisão pré-retroumbilical. O animal doador foi uma fêmea da raça pastor alemão, de 4 meses de idade, saudável. O tecido adiposo foi obtido durante o processo de castração do animal. O proprietário do doador forneceu o material mediante consentimento livre e esclarecido.

Análise molecular do cão doador

Foi coletada uma amostra de sangue para a análise da presença de herpesvírus canino (CHV), vírus da cinomose (CDV), *Haemobartonella canis* (HCA), *Brucella* sp. (BRU), *Borrelia burgdorferi* (BBU) e *Mycoplasma*, através da amplificação de fragmentos dos respectivos genomas pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) em materiais extraídos (RNA e DNA). Os RNAs foram extraídos com Trizol LS (Invitrogen) e utilizados para síntese de cDNA através de transcrição reversa com *superscript II* (Invitrogen). DNAs foram extraídos utilizando-se o DNazol (Invitrogen). Reações positivas apresentam fragmentos de DNA de 183 pb (CHV), 170 pb (CDV), 341 pb (HCA), 798 pb, (BRU), 287 pb (BBU). Para cada teste, foram extraídas duas amostras, controles positivo e negativo (SANTOS et al., 2019a).

Isolamento e armazenamento das CPAMS-TAC

O tecido adiposo obtido no momento da castração foi lavado em PBS 1x, para retirar sangue e debris. Após a lavagem, o tecido foi mantido durante 30 minutos a 37 °C/5% de CO₂ em presença de 0,075% de colagenase tipo IV (Sigma). Foram adicionados 5 mL de meio basal, sendo o concentrado celular retirado e centrifugado durante 5 minutos a 200 X g. O precipitado foi ressuspensionado e transferido para uma garrafa de cultivo de 25 cm², a qual foi mantida a 37 °C/5% CO₂ durante 48 horas, em presença de meio basal constituído de Dulbecco's Modified Eagle's Medium–High Glucose (DMEM-HG; Invitrogen, Califórnia, EUA), 15% de soro fetal bovino (SFB; HyClone, Logan, Utah, EUA), 1% de uma associação antibiótica (Penicilina G 10.000 UI/mL, Estreptomicina 10 mg/mL; Invitrogen, Califórnia, EUA), 1% de L-glutamina (200 mM; Invitrogen, Califórnia, EUA) e 1% de aminoácidos não essenciais (200 mM; Invitrogen, Califórnia, EUA), quando o mesmo foi trocado. Os repiques subsequentes foram realizados por meio de ação enzimática utilizando 0,025% de tripsina (Invitrogen). As CPAMS-TAC foram divididas em alíquotas de 2x10⁶ células/mL, ressuspensionadas em meio de congelamento (10% de DMSO, 70% de soro fetal bovino e 20% de meio basal) e armazenadas em nitrogênio líquido (SANTOS et al., 2019a).

Análise proliferativa

Para a análise proliferativa foi isolada uma colônia das CPAMs-TAC e expandida até atingir uma confluência de 70% em garrafa de cultivo de 25 cm². As células foram removidas por meio de ação enzimática (tripsina 0,025%, Invitrogen) e distribuídas em triplicatas sobre placas de 60 cm² na concentração de 10⁵ células/mL. Após 48 horas, as células foram removidas e replaqueadas. O processo foi repetido até a 12^a passagem (SANTOS, 2018a).

Potencial de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico

A análise do potencial de diferenciação osteogênico das CPAMs-PDC, na 4^a passagem, foi realizada por meio do cultivo celular em presença de meio basal, durante o período de 24 horas, na concentração inicial de 1x10⁵ células. Após 24 horas, o meio foi trocado para o de indução de diferenciação osteogênica constituído por Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose (DMEM-LG; Invitrogen, Califórnia, EUA), 1% de 10⁻⁵ M de dexametasona (Sigma, Reino Unido), 1% 5 mM de ácido ascórbico (Sigma, Reino Unido), 10% de soro fetal bovino (SFB; HyClone, Logan, Utah, EUA) e 1% Penicilina/Estreptomicina (Penicilina G 10.000 UI/mL, Estreptomicina 10 mg/mL; Invitrogen, Califórnia, EUA). A troca do meio foi realizada a cada 3 dias. No 10^o dia de cultivo foi adicionado 1% de 200 mM de β-glicerolfosfato (Sigma, Reino Unido) ao meio de cultura, assim como nas trocas subsequentes. As CPAMs-PDC foram mantidas em cultura até o 21^o dia de diferenciação. A caracterização celular foi realizada por meio da coloração de Von Kossa (Sigma, Reino Unido) (SANTOS, 2018a).

Para a análise do potencial de diferenciação adipogênico, as CPAMs-PDC, na 4^a passagem, foram cultivadas em meio basal, já descrito previamente, durante o período de 24 horas na concentração inicial de 1x10⁵ células. Após 24 horas, o meio foi trocado para o meio indutor de diferenciação adipogênica, composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium – HIGH Glucose (DMEM-HG; Invitrogen, Califórnia, EUA), 10% de soro fetal bovino (SFB; HyClone, Logan, Utah, EUA), 1 mM de dexametasona (Sigma, Reino Unido), 100 mM de endomentacina (Sigma, Reino Unido), 0,5 M de isobutilmetilxantina (Sigma, Reino Unido) + 10 μM de insulina (Sigma, Reino Unido) e 1% Penicilina/Estreptomicina (Penicilina G 10.000 UI/mL, Estreptomicina 10 mg/mL; Invitrogen, Califórnia, EUA), sendo a troca do meio realizada a cada

3 dias. As CPAMs-PDC foram mantidas em cultura até o 21º dia de diferenciação, sendo então fixadas em presença de paraformaldeído 4%, durante o período de 60 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas 3 vezes com etanol 70% e mantidas a temperatura ambiente por cinco minutos em presença de Oil Red O (Sigma, Reino Unido), sendo posteriormente lavadas 3 vezes com água destilada (SANTOS, 2018a).

Para a análise do potencial de diferenciação condrogênico, as CPAMs-PDC, na 4ª passagem, foram transferidas, na concentração 1×10^6 , para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas a 210 X g por 5 minutos. Em seguida foram cultivadas na presença de meio indutor composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium – HIGH Glucose (DMEM-HG; Invitrogen, Califórnia, EUA) suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB; HyClone, Logan, Utah, EUA), 6,25 mM de insulina (Sigma, Reino Unido), 0,1 mM de dexametasona (Sigma, Reino Unido), 1 mM de piruvato de sódio (Invitrogen, Califórnia, EUA), 10 ng/mL TGF- β 1 (R&D System, LGC Biotechnology, Mineápolis, EUA) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Penicilina g 10.000 UI/mL, Estreptomicina 10 mg/mL; Invitrogen, Califórnia, EUA) sendo a troca do meio realizada diariamente por 21 dias. Posteriormente, o pellet esférico formado foi fixado, incluso em parafina, cortado e corado com azul de toluidina (Sigma, Reino Unido) (SANTOS, 2018a).

Análise Tumorgênica

Foram utilizados três camundongos nudes, mantidos em ambiente estéril durante o período de 90 dias, os quais receberam a infusão de 2×10^6 CPAMs-TAC, na 4ª passagem, pela via intraperitoneal. Após o período de 90 dias as CPAMs-TAC não foram capazes de induzir a geração de teratocarcinomas (SANTOS, 2018a).

Seleção de pacientes para o estudo

Os cães foram selecionados a partir de populações de pacientes de clínicas veterinárias da cidade de São Paulo, mediante consentimento livre e esclarecido por parte dos proprietários. Foram submetidos ao estudo nove cães (dois Schnauzer standard, dois Beagles, um Bulldog Francês e quatro SRDs) sendo cinco machos e quatro fêmeas, com idades entre três e 12 anos e pesos entre dez e 22 kg, acometidos por aplasia medular, diagnosticada por mielograma, decorrente de um quadro de doença renal estágio 2 da IRC (++) (IRIS, 2019). Foram avaliados

os perfis bioquímicos de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), níveis de potássio, albumina, cálcio, creatinina, ureia, fósforo, sódio e urinálise. Os cães também foram avaliados por meio de hemograma completo, radiografia torácica, ultrassonografia abdominal e mielograma. Todos os pacientes apresentavam quadro clínico e laboratorial estável há pelo menos uma semana antes ao início do tratamento, além de apresentar vacinas, vermifugações e controle de ectoparasitas atualizados.

Tratamento com as CPAMs-TAC

Os nove pacientes foram submetidos a dois transplantes com CPAMs-TAC alogênicas pela via endovenosa e um transplante pela via intramedular, com intervalo médio de 30 dias entre cada um, tendo sido utilizadas doses de 6×10^6 CPAMs-TAC em ambas as vias. As CPAMs-TAC foram descongeladas em banho maria a 37 °C por 2 minutos e transferidas para um tubo Falcon de 15 mL, sendo acrescentada solução fisiológica na proporção de 1:1. O concentrado celular foi homogeneizado e centrifugado a 210 X g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado adicionando-se 3 mL de solução fisiológica. O precipitado celular foi ressuspendido e homogeneizado, sendo posteriormente centrifugado a 210 X g por 5 minutos a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. As CPAMs-TAC foram ressuspendidas em 5 mL de solução fisiológica e homogeneizadas para serem transplantadas pela via endovenosa nos pacientes. Quando o transplante ocorreu pela via intramedular as CPAMs-TAC foram ressuspendidas em 0,5 mL. Os transplantes foram realizados pelas vias endovenosa (veia cefálica) sem sedação e intramedular com sedação. Como medicação pré-anestésica foi administrada 0,5 mg/kg de acepromazina (Acepran 0,2%) associado a 3 mg/kg de meperidina (50 mg/mL) pela via intramuscular. A análise da viabilidade das CPAMs-TAC, após o descongelamento, foi realizada por meio da coloração com Trypan Blue e apresentou um valor superior a 90% (SANTOS et al., 2019a).

Monitoramento clínico dos pacientes tratados

Os cães tratados foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais: alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), níveis de potássio, cálcio, creatinina, ureia, fósforo, albumina, sódio e urinálise, além de hemograma completo. Os exames foram

realizados anteriormente a cada um dos três transplantes e 30, 60, 90 e 180 dias após o último transplante de CPAMs-TAC. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da CELLTROVET sob o número 3/2018.

Análise estatística

Os valores hematológicos dos cães submetidos as doses de CPAMs-TAC foram analisados através do teste ANOVA (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A terapia celular com células-tronco vem se mostrando extremamente promissora no tratamento de diversas doenças que acometem tanto grandes quanto pequenos animais. Seu potencial reparativo permite que uma vez introduzidas no organismo, adquiram tanto a morfologia como a funcionalidade de qualquer tipo celular danificado, de forma a reconstituir o tecido lesionado. Portanto, o tratamento visa, por meio de seus mecanismos de ação, curar e/ou melhorar a qualidade de vida de pacientes acometidos por diferentes doenças (SANTOS, 2017).

As CPAMs-TAC foram caracterizadas com base em sua morfologia fibroblastoide (Figura 1A), habilidade de se aderir ao plástico, capacidade de diferenciação osteogênica (Figura 1B), adipogênica (Figura 1C) e condrogênica (Figura 1D) e alto potencial de proliferação celular (Figura 2) (SANTOS, 2018a).

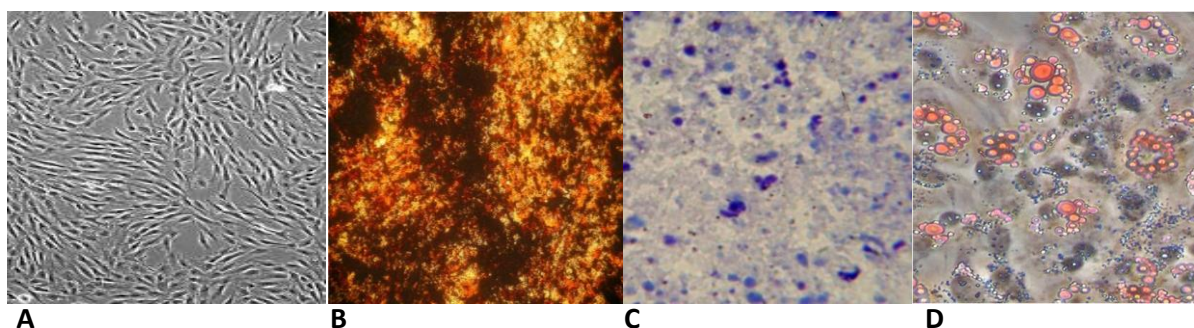


Figura 1 – Aspecto morfológico fibroblastoide das células-tronco isoladas a partir do tecido adiposo de cão (CTMs-TAC). Imagens das CTMs-TAC (A) e suas representativas diferenciações: osteogênica (B), condrogênica (C) e adipogênica (D). Objetivas: 10x (A), 20x (B, C) e 4x (D).

Por se tratar de uma terapia alogênica, as CPAMs-TAC foram testadas molecularmente, não tendo sido detectada a presença dos patógenos pesquisados. A análise molecular tem por objetivo evitar uma possível transmissão dos patógenos em questão aos cães receptores.

No presente estudo, os cães submetidos à terapia com as CPAMs-TAC foram classificados, segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS, 2019), como acometidos pelo estágio 2 da IRC (insuficiência renal crônica) (++). A análise bioquímica anterior ao início do tratamento revelou que os pacientes apresentavam valores de ureia entre 65 mg/dL e 104 mg/dL (valores de referência entre 21 mg/dL e 60 mg/dL) e creatinina entre 1,51 mg/dL e 1,72 mg/dL (valores de referência entre 0,5 mg/dL e 1,4 mg/dL) (KANEKO et al., 2008). Todos os pacientes apresentavam quadro clínico e laboratorial estável, sendo submetidos à infusão diária de 200 mL de solução de Ringer com lactato de sódio. O quadro de aplasia mieloide foi diagnosticado tendo como base sinais clínicos (apatia intensa, mucosas hipocoradas com sangramentos frequentes) e exames de hemograma e mielograma.

Estudos vêm demonstrando ser a via endovenosa de fácil execução, pouco invasiva e menos traumática, permitindo repetidas aplicações com mínimos efeitos colaterais, além de propiciar uma menor probabilidade da ocorrência de insuficiência renal aguda isquêmica em decorrência de seu efeito parácrino (QUIMBY et al., 2013; ZHANG et al., 2016). As CPAMs-TAC foram transplantadas em baixas concentrações e lentamente pois, quando administradas em elevadas concentrações e rapidamente pela via endovenosa, pode resultar em tromboembolismo pulmonar (DEAK et al., 2010a, 2010b; MOLL et al., 2012).

A via de administração local ou direta permite que as CPAMs sejam transplantadas na região injuriada, permitindo uma maior retenção das células na região lesionada, uma vez que o sucesso da terapia tende a estar diretamente relacionada a permanência das células transplantadas no local lesionado. Desta forma, as CPAMs poderão exercer a sua função parácrina de forma a auxiliar na reparação do tecido danificado. Entretanto, a via direta é um processo extremamente invasivo e traumático, sendo uma rota que necessita de uma mão de obra especializada (BLACK et al., 2007, 2008).

As transfusões foram realizadas com intervalos de 30 dias, tendo sido bem toleradas pelos pacientes. Os dados obtidos por meio de exames laboratoriais revelaram uma redução dos níveis de ureia e creatina, embora não foram estatisticamente relevantes.

O primeiro transplante das CPAMs-TAC foi realizado pela via endovenosa, sem que tenham sido observados efeitos adversos, como vômito, náusea, alteração da pressão arterial e/ou variação na frequência respiratória. O procedimento foi realizado lentamente e em baixa concentração celular, de forma a minimizar o risco de trombose pulmonar (DEAK et al., 2010b).

A análise clínica realizada 72 horas após o primeiro transplante revelou um aumento na disposição física e apetite alimentar dos pacientes. Uma semana após ao primeiro transplante, os cães 1, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 foram submetidos a transfusões de sangue total, as quais passaram a ser realizadas semanalmente. Os cães 2 e 5 foram submetidos a transfusões de sangue total após duas semanas do transplante, e a seguir, semanalmente. Embora os cães tenham permanecido com um quadro clínico satisfatório, as transfusões foram realizadas quando os índices hematológicos se apresentavam inferiores a 10%. A melhora clínica apresentada sugere que as CPAMs-TAC podem ter atuado estabilizando o quadro clínico geral do paciente em detrimento da medula aplásica.

Após a realização do segundo transplante pela via endovenosa, todos os cães apresentaram uma melhora significativa no quadro clínico, demonstrando boa disposição física e alimentar. Uma semana após ao segundo transplante os cães 3, 4, 6, 7, 8 e 9 foram submetidos a nova transfusão de sangue total, a qual passou a ser realizada semanalmente. Os cães 1, 2 e 5 foram submetidos a transfusões de sangue total duas semanas após o segundo transplante de CPAMs-TAC. Posteriormente as transfusões passaram a ser realizadas semanalmente.

Os transplantes realizados pela via endovenosa se mostraram eficazes no restabelecimento do quadro clínico dos pacientes, porém, não foi possível eliminar a aplasia medular. Estudos têm demonstrado que a infusão sistêmica resulta na retenção das células transplantadas em diferentes órgãos. Tal fato sugere que, em razão do quadro debilitado do paciente, as CPAMs-TAC tenham migrado para outras regiões do organismo (BARBASH, 2003). Sendo assim, optou-

se pela via de aplicação local, intramedular, de forma a viabilizar uma maior retenção das CPAMs-TAC e reduzindo a presença das células transplantadas em outros órgãos (LI, 2010).

O terceiro transplante das CPAMs-TAC foi realizado pela via intramedular, sem que tenham sido observados efeitos adversos. Sete dias após o terceiro transplante foi observado uma melhora significativa nos índices dos hematócritos, chegando a atingir valores entre 15% e 17%. Após 14 dias, os valores estavam entre 23% e 25%. Aos 21 dias os valores situaram-se entre 39% e 43%. Após 30 dias do último transplante, os valores variaram entre 41% e 44%. Os dados obtidos 180 dias após a última avaliação apresentaram valores de hematócrito variando entre 42% e 45%. A análise estatística dos valores crescentes do hematócrito, em função do tempo, foram significativos ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que a transfusão das CPAMs-TAC pela via intramedular favoreceu a recuperação do microambiente medular (SORDI et al., 2005).

Estudos vêm sugerindo que as CPAMs são responsáveis por regular o processo de hematopoese do nicho medular. Para tal, foram descritas três funções básicas responsáveis pelo balanço entre as CPAMs quiescentes e as necessárias para a manutenção da estabilidade tecidual: 1) promover um ambiente estável e seguro contra diferenciações indesejáveis, apoptose e outros estímulos que afetem a reserva das CPAMs; 2) permitir a interação entre as CPAMs e as células diferenciadas por meio de mecanismos celulares regulando o processo de regeneração tecidual durante o transcorrer da vida do paciente; 3) controlar a quantidade de CPAMs no corpo do paciente (BEERMAN et al., 2017).

O fato de o transplante realizado pela via intramedular ter se mostrado mais eficaz neste estudo, sugere que o número de CPAMs-TAC que atingiu o ambiente medular pela via sistêmica, tenha sido inferior a quantidade necessária para se restabelecer um quadro de homeostase satisfatório. Desta forma, demonstrou-se que o sucesso da terapia está diretamente relacionado à permanência das células transplantadas no local lesionado, permitindo que atuem de forma eficaz (DIMMELER, 2010).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a infusão das células progenitoras adultas multipotentes alogênicas, isoladas a partir do tecido adiposo e posteriormente criopreservadas, em associação com a terapia convencional, pode resultar no restabelecimento da produção das linhagens celulares oriundas da medula óssea. Os resultados após o transplante intramedular demonstraram uma normalização das linhagens medulares, o que resultou em uma satisfatória recuperação dos cães acometidos pelo quadro de aplasia medular.

THERAPEUTIC USE OF ALLOGENIC MULTIPOTENT ADULT PROGENITOR CELLS IN THE TREATMENT OF DOGS AFFECTED BY MEDULLARY APLASIA DUE TO CHRONIC KIDNEY DISEASE

ABSTRACT

Medullary aplasia has the characteristic of presenting a laboratory picture where the patient's bone marrow is constituted by a cellularity rate of less than 10%. The myelogram exam tends to present a significant reduction or even absence of the erythroid, myeloid and mitosis lines. Medullary aplasia may originate from several factors, including chronic kidney disease (CKD), a syndrome characterized by impaired renal metabolism, which occurs in a dynamic and progressive manner, culminating in the loss of the kidney's physiological functions. Multipotent adult progenitor cells (MAPCs), present in all tissues that make up the organism, have as their main characteristics their potential for cell self-renewal and differentiation. In this study, 9 dogs without distinction of race and sex, aged between 3 years and 12 years, affected by a condition of medullary aplasia resulting from CKD were submitted to the therapeutic action of multipotent adult canine adipose tissue (MAPCs-TAC) cells, from a healthy donor animal. Three infusions were performed intravenously or intramedullarily, with an average interval of 30 days without apparent adverse effects, with clinical improvement, appetite gain, and increased disposition observed after the first application. Patients demonstrated a significant improvement in renal function as well as recovery from medullary aplasia. After the infusions of the MAPCs-TAC it is concluded that the therapy with the MAPCs-TAC collaborated significantly for the improvement of the quality of life of dogs affected by the medullary aplasia.

Keywords: Multipotent adult progenitor cells. Medullary aplasia. Renal insufficiency. Cell therapy.

USO TERAPÉUTICO DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES ALÓGENAS EN EL TRATAMIENTO DE CANINOS AFECTADOS POR UN CUADRO DE APLASIA MEDULAR DEBIDO A LA ENFERMEDAD RENAL

RESUMEN

La característica de la aplasia medular tiene un cuadro del laboratorio donde la médula del paciente se convierte en una tasa de la celularidad inferior al 10%. El examen mielograma tiende a presentar una reducción significativa o incluso la ausencia de las líneas eritroide, mieloide y cariocítica. La aplasia medular puede originarse de varios factores dentro de los cuales la enfermedad renal crónica (ERC), un síndrome caracterizado por la alteración del metabolismo renal que se produce de forma dinámica y progresiva, culminando en la pérdida de las funciones fisiológicas de los riñones. Las células progenitoras adultas multipotentes (CPAMs) presentes en todos los tejidos que componen el organismo tienen como características principales su potencial de autorrenovación y diferenciación celular. En este estudio, 9 caninos sin distinción de raza y sexo, con edades comprendidas entre los 3 y los 12 años, afectados por una aplasia medular debida a ERC fueron sometidos a la acción terapéutica de células progenitoras adultas multipotentes del tejido adiposo canino (CPAMs-TAC), procedentes de un animal donante sano. Se realizaron tres infusiones intravenosas o intramedulares, con un intervalo medio de 30 días, sin efectos adversos aparentes, y se observó mejoría clínica, ganancia de apetito, energía y disposición mejoradas después de la primera aplicación. Los pacientes demostraron una mejora significativa en la función renal, así como la recuperación de la aplasia medular. Después de las infusiones de las CPAMs-TAC, se concluyó que la terapia con las CPAMs-TAC contribuyó significativamente a mejorar la calidad de vida de los caninos afectados por la aplasia medular.

Palabras clave: Células progenitoras adultas multipotentes. Aplasia medular. Insuficiencia renal. Terapia celular.

REFERÊNCIAS

ALAMOUDI, N. M.; EL ASHIRY, E. A.; FARSI, N. M. Treatment of oral ulcers in dogs using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 38, n. 3, p. 215-222, 2014.

ARZI, B.; CLARK, K. C.; SUNDARAM, A.; et al. Therapeutic Efficacy of Fresh, Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Feline_Chronic Gingivostomatitis. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 8, p. 1710-1722, 2017.

BARBASH, I. M. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, v. 108, n. 7, p. 863-868, 2003.

BEERMAN, I.; LUIS, T. C.; SINGBRANT, S.; et al. The evolving view of the hematopoietic stem cell niche. **Experimental Hematology**, v. 50, p. 22-26, 2017.

BLACK, L. L.; GAYNOR, J.; ADAMS, C.; et al. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine**, v. 9, n. 3, p. 192-200, 2008.

BLACK, L. L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine**, v. 8, n. 4, p. 272-284, 2007.

CAPLAN, A. I.; HARIRI, R. Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. **Stem Cells Translational Medicine.**, v. 4, n. 7, p. 695-701, 2015.

CASTRO, M. C. N. Prolongando a vida do paciente com insuficiência renal crônica. **Clínica Veterinária**, n. 58, p. 50-58, 2005.

DEAK, E.; RÜSTER, B.; KELLER, L.; et al. Suspension medium influences interaction of mesenchymal stromal cells with endothelium and pulmonary toxicity after transplantation in mice. **Cytotherapy**, v. 12, n. 2, p. 260-264, 2010a.

DEAK, E.; SEIFRIED, E.; HENSCHLER, R. Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. **International Reviews of Immunology**, v. 29, n. 5, p. 514-529, 2010b.

DIMMELER, S. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 6, p. 1088-1093, 2010.

FELDMAN, B. F. Aplastic anemia. **Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 212p.

FELDMAN, B. F. Nonregenerative Anemia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. Vol. 2, p. 1913-1916.

GRAUER, J. N.; SHAFI, B.; HILIBRAND, A. S.; et al. Proposal of a modified, treatment-oriented classification of odontoid fractures. **Spine Journal**, v. 5, n. 2, p. 123-129, 2005.

GRINDEM, C. B.; TYLER, R. D.; COWELL, R. D.; et al. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3. ed. São Paulo: MedVet, 2009. 423p.

HARVEY, J. W. **Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals**. Philadelphia: Saunders, 2001. 125p.

IRIS - International Renal Interest Society. **IRIS Staging of CKD modified 2019**. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf>.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. (Eds). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. New York: Academic Press, 2008. 936p.

KIM, Y.; LEE, S. H.; KIM, W. H.; et al. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, p. 123-126, 2016.

LI, L. Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an MRI study. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 30, n. 3, p. 653-662, 2010.

MOLL, G.; RASMUSSEN-DUPREZ, I.; VON BAHR, L.; et al. Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? **Stem Cells**, v. 30, n. 7, p. 1565-1574, 2012.

MORIYAMA, H.; KASASHIMA, Y.; KUWANO, A. Anatomical location and culture of equine corneal epithelial stem cells. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 2, p. 106-112, 2014.

PRESSLER, B. M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 1193-1208, 2013.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; HABENICHT, L. M.; et al. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 48, p. 1-12, 2013.

ROCHA, J. R.; MERLINI, G. P.; SIMAS, R. C.; et al. Histórico, evolução e correlação da transfusão sanguínea com os principais animais domésticos: revisão literária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 13, p. 1-6, 2009.

SANTOS, E. J. C. Análise da Aplicação Terapêutica das Células Tronco na Medicina Veterinária. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 2, n. 1, p. 269-295, 2017.

SANTOS, E. J. C. Biologia das células-tronco mesenquimais de felinos obtidas a partir de nichos presentes no tecido adiposo para aplicação terapêutica na medicina veterinária. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 4, n. 3, p. 368-379, 2018a.

SANTOS, E. J. C.; WINCK, C. P.; ALVES, C. A. M.; et al. Células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento das sequelas neurológicas de cinomose canina. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 3, n. 49, p. 32-40, 2019a.

SANTOS, E. J. C.; POPPI, F. P.; BRAGA, C. L. Células progenitoras adultas multipotentes alogênicas no tratamento de doença renal em felinos. **Science and Animal Health**, v. 6, n. 3, p. 266-285, 2018b.

SANTOS, E. J. C.; WINCK, C. P.; BRAGA, C. L. Utilização terapêutica das células progenitoras adultas multipotentes alogênicas em cães acometidos pela doença renal. **Revista Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 13, n. 4, p. 534-543, 2019b.

SMITH, R. K.; WEBBON, P. M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 9, p. 582-594, 2005.

SORDI, V.; MALOSIO, M. L.; MARCHESI, F.; et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 419-427, 2005.

YAGI, H.; SOTO-GUTIERREZ, A.; PAREKKADAN, B.; et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 6, p. 667-679, 2010.

WEISS, D. J. New insights into the physiology and treatment of acquired myelodysplastic syndromes and aplastic pancytopenia. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1317-1334, 2003.

ZHANG, G.; ZOU, X.; HUANG, Y.; et al. Mesenchymal stromal cell derived extracellular vesicles protect against acute kidney injury through antioxidation by enhancing nrf2/are activation in rats. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 41, n. 2, p. 119-28, 2016.

Autor para correspondência:
Enrico Jardim Clemente Santos.
Laboratório Celltrovet, rua Ângelo Máglio, Vila Yara, Osasco, SP, Brasil. CEP: 06020-020.
enricosantos@celltrovet.com.br