

POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES ALOGÊNICAS NO TRATAMENTO DE APLASIA MEDULAR SECUNDÁRIA À ERLIQUIOSE CANINA

SANTOS, Enrico Jardim Clemente ¹;
MAZZEO, Angela ²;
POPPI, Fabiana Pozzuto ³;
BRAGA, Camila Landim ⁴.

Recebido: 12/01/2023

Aceito: 28/03/2023

¹Biocientista, Mestre, Doutor, Pesquisador, terapia com células tronco, medicina regenerativa, engenharia tecidual; ²Farmacêutica, Doutoranda, Universidade de São Paulo; ³Médica Veterinária, Mestranda, FCAV/UNESP Jaboticabal; ⁴Médica Veterinária, Especialista em geriatria de cães e gatos.

RESUMO

Aplasia medular é uma doença caracterizada por um quadro no qual a medula óssea passa a ser constituída por uma celularidade inferior a 10%, apresentando uma redução ou ausência dos três tipos celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica). No presente estudo, as células progenitoras adultas multipotentes, isoladas a partir da polpa dentária de cão saudável (CPAMs-PDC), foram analisadas com base em sua morfologia, potencial de proliferação e diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica sendo posteriormente criopreservadas. Foram realizadas três aplicações de 6×10^6 CPAMs-PDC, com intervalos de trinta dias, em doze pacientes acometidos por um quadro de aplasia medular, sendo três Schnauzers, dois Beagles, três Bulldogs e quadro SRDs. O grupo de animais foi composto por 8 machos e 4 fêmeas, com idades entre 2 e 6 anos e peso entre 10 e 23 kg. Duas das aplicações foram realizadas pela via intravenosa e uma pela via intramedular. Os resultados demonstraram uma resposta medular, com elevação da porcentagem do hematócrito até a estabilidade total da medula. Nesse sentido, este estudo sugere que em casos de aplasia mielóide derivada do quadro de erliquiose, a terapia com células-tronco se apresenta extremamente promissora.

Palavras-chave: Anemia aplásica. Cães. Células-tronco. Terapia celular. Medula óssea.

INTRODUÇÃO

A aplasia medular, também conhecida como anemia aplásica, é uma doença relativamente rara em cães e gatos, sem predileção por raça, sexo ou idade, caracterizada por um quadro no qual a medula passa a ser constituída por menos de 10% de celularidade (FELDMAN, 2005). Cães jovens (até 3 anos de idade) apresentam um valor limitante de 75% de celularidade, cães adultos (3,1 a 8 anos de idade) 50% de celularidade e cães idosos (acima de 8 anos de idade) 25% de celularidade (GRINDEM et al., 2002). O quadro de aplasia medular é definido como o resultado da substituição do tecido hematopoiético pelo tecido adiposo, somado a redução, $\leq 10\%$ ou ausência dos três tipos celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica), embora algumas células reticulares, endoteliais, macrófagos, mastócitos e alguns linfócitos possam ainda estar presentes (GRINDEM et al., 2002).

As células progenitoras adultas multipotentes (CPAMs), mais comumente denominadas na literatura científica como células-tronco mesenquimais (CTMs), são definidas como uma população celular imatura, não especializada, responsável por dar suporte ao processo de homeostase, além de possuir as capacidades de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares a partir do microambiente em que se localizam (CIVIN, 2001).

As CPAMs podem ser isoladas a partir de diferentes fontes teciduais, como cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo (KANG et al., 2012). Após serem inseridas no organismo, as CPAMs tendem a migrar para as regiões injuriadas, por meio do processo de quimiotaxia, onde irão atuar no processo de recuperação do tecido lesionado (CIVIN, 2001). Durante este processo é possível observar um aumento no acúmulo de hemossiderina em macrófagos, uma vez que os estoques de ferro não são utilizados para produção de eritrócitos (RODRÍGUEZ et al., 1999). Desta forma os mecanismos da aplasia medular podem ser divididos com base na destruição das células-tronco ou das células progenitoras, linhagens específicas ou mutação genética, resultando na diminuição da capacidade proliferativa das células-tronco, assim como desregulação de citocinas hematopoiéticas e alterações no estroma (MEDINGER et al., 2018; PIETRAS, 2017).

Estudos realizados na área da medicina veterinária vêm comprovando tanto a eficácia como a segurança das CPAMs no âmbito terapêutico em várias espécies. Dentre as diversas

doenças tratadas temos as osteoartrites (HARMAN et al., 2016), seqüela neurológica de cinomose (SANTOS et al., 2019a) e doença renal (SANTOS et al., 2019b).

Neste estudo, temos por objetivo determinar tanto a segurança como a eficácia terapêutica das CPAMs alogênicas, derivadas da polpa dentária de cães, expostas ao processo de criopreservação, em cães acometidos pela aplasia medular de origem infecciosa, nesse caso, a erliquiose.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo científico

No presente estudo as células progenitoras adultas multipotentes, isoladas a partir da polpa dentária de cão saudável (CPAMs-PDC) foram transplantadas em 12 cães acometidos por um quadro de aplasia medular em decorrência da infecção por *Ehrlichia* spp. Não foi utilizado um grupo controle uma vez que a erliquiose canina é uma enfermidade grave que causa transtornos potencialmente nocivos à saúde dos cães, podendo ser fatal. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-CELLTROVET) sob o número 2/2022.

Seleção do animal doador da polpa dentária para o tratamento alogênico

As CPAMs-PDC utilizadas no presente estudo, foram isoladas a partir da polpa de um dente de leite obtido a partir de um cão da raça Beagle, de 6 meses de idade, clínica e laboratorialmente saudável, mediante consentimento livre e esclarecido por parte dos tutores.

Isolamento das CPAMs-PDC

O dente recém-extraído do cão foi lavado em água destilada estéril e mantido em meio de cultura DMEM/Ham's F-12 (Invitrogen®, Califórnia, EUA) contendo 4% de solução antibiótica *Penicillin-Streptomycin* (penicilina G 10.000 UI/ml, estreptomicina 10.000 µg/ml, Invitrogen®, Califórnia, EUA) até o momento da extração do material pulpar. Para a remoção da polpa, foi realizado um sulco ao redor da região cervical do dente utilizando micromotor (Marathon 3, Korea, KO) associado a disco diamantado e aparato de proteção. Foi realizada a fratura coronário-radicular na região demarcada com auxílio de 2 fórceps cirúrgicos adultos nº 1,

expondo a porção pulpar. A polpa foi removida com auxílio de limas endodônticas tipo Kerr (n° 15) visando a remoção do conteúdo pulpar integral, contendo polpa coronária e radicular. A polpa recém-extraída foi lavada rapidamente em solução tampão fosfato salina (PBSA) (Invitrogen®, Califórnia, EUA) estéril contendo 4% de solução antibiótica (Invitrogen®, Califórnia, EUA). A polpa foi fragmentada em placa de Petri de 60 mm de diâmetro contendo PBSA (Invitrogen®, Califórnia, EUA) com auxílio de lâminas de bisturi estéreis. Imediatamente, o tecido pulpar foi transferido para Placas de Petri contendo 3 ml de solução de tripsina 0,025% (Invitrogen®, Califórnia, EUA) e mantidas em estufa úmida a 37 °C, contendo 5% de CO₂ por 10 minutos. Após a ação enzimática, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura 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 solução antibiótica (Invitrogen®, Califórnia, EUA), 1% de l-glutamina (200 mM; Invitrogen®, Califórnia, EUA) e 1% de aminoácidos não essenciais (200 mM; Invitrogen®, Califórnia, EUA) e fragmentos pulpares foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio basal e mantidos em estufa úmida a 37 °C, contendo 5% de CO₂ para avaliação do desprendimento de células do tecido. Após as células terem se desprendido do tecido as mesmas foram transferidas para uma garrafa de cultivo de 25 cm² a qual foi mantida em estufa úmida a 37 °C, contendo 5% de CO₂, sendo o meio basal trocado a cada 72 horas. As passagens subsequentes foram feitas por meio de ação enzimática utilizando tripsina 0,025% (Invitrogen®, Califórnia, EUA) para individualização das células, na proporção de 1,0 ml/frasco, durante quatro minutos, a 37 °C. As CPAMs-PDC foram divididas em alíquotas de 2 x 10⁶, ressupensas em meio de congelamento composto por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 70% de SFB (HyClone®, Logan, Utah, EUA) e 20% de DMEM-HG (Invitrogen®, Califórnia, EUA) e armazenadas em nitrogênio líquido. As CPAMs-PDC foram administradas com menos de um ano de armazenamento. Para serem injetadas nos caninos as células foram descongeladas e o meio de criopreservação foi removido.

Análise proliferativa e do potencial de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico

As técnicas e os procedimentos de análise de proliferação celular e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados conforme descrito por Santos (2018). A análise proliferativa foi realizada a cada três dias (triplicatas), partindo-se da concentração 10^5 células mantidas em garrafas de 25 cm² sendo o processo repetido até a 12ª passagem. As análises dos potenciais de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico foram realizadas a partir de cultivos, na 4ª passagem, na concentração de 10^5 células sendo os resultados obtidos no 21º dia. A diferenciação osteogênica foi obtida por meio da coloração de Von Kossa (Sigma®, Reino Unido), a adipogênica em presença de *Oil Red O* (Sigma®, Reino Unido) e a condrogênica foi corada com azul de toluidina (Sigma®, Reino Unido) (SANTOS, 2018).

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 tutores. Foram submetidos ao estudo 12 cães: três Schnauzers, dois Beagles, três Bulldogs e quatro SRDs, sendo 8 machos e 4 fêmeas, com idades entre 2 e 6 anos e peso entre 10 e 23 kg, acometidos por aplasia medular de origem infecciosa (erliquiose), diagnosticado por meio dos sinais clínicos e dados laboratoriais (hemograma, exames bioquímicos e urinálise). Foi realizado um mielograma por meio de aspirado da medula óssea para confirmação do diagnóstico. Antes de iniciar os estudos os cães foram avaliados quanto ao perfil bioquímico de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), níveis de fósforo, sódio, potássio, cálcio, creatinina, ureia, hemograma e urinálise, além de radiografia torácica e ultrassonografia abdominal. Todos os pacientes apresentavam um quadro clínico e laboratorial estável há pelo menos duas semanas antecedentes ao tratamento e estavam com as medidas de profilaxia sanitária atualizadas (vacinas, vermifugações e controle de ectoparasitas).

Tratamento com as CPAMs-PDC

Os pacientes foram submetidos a três aplicações com CPAMs-PDC alogênicas, com intervalo médio de 30 dias entre cada infusão. As CPAMs-PDC foram descongeladas em banho maria à 37 °C por 2 minutos e transferidas para um tubo cônico feito em polipropileno graduado de 15 ml sendo acrescentada solução fisiológica na proporção de 1:1. A suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada a 210 g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 3 ml de solução fisiológica. O precipitado celular foi suspenso e homogeneizado sendo posteriormente centrifugado a 210 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. As CPAMs-PDC foram suspensas em 5 ml de solução fisiológica homogeneizadas para serem posteriormente infundidas por via intravenosa. Quando aplicadas pela via intramedular as CPAMs-PDC foram suspensas em 0,5 ml. As aplicações foram realizadas pela via intravenosa (veia cefálica) sem sedação e por via intramedular com sedação. Como medicação pré-anestésica foi aplicado 0,5 mg/kg de acepromazina (Acepran® 0,2%) associado a 3 mg/kg de meperidina (50 mg/ml) pela via intramuscular. Foram utilizadas doses de 6×10^6 de CPAMs-PDC alogênicas. Análise da viabilidade das CPAMs-PDC após o descongelamento foi realizada por meio da coloração com *Trypan Blue solution* (Sigma®, Reino Unido) e apresentou valor superior a 90%.

Monitoramento clínico dos pacientes tratados

Os cães tratados no presente estudo foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais (hemograma e bioquímico por meio da análise da ALT, FA, níveis de fósforo, sódio, potássio, cálcio, creatinina, ureia e urinálise). Os exames foram realizados anteriormente a cada uma das três aplicações, 30, 60, 90 e 180 dias após a terceira aplicação.

Análise estatística

Os valores obtidos por meio do hemograma dos cães submetidos às doses de CPAMs-PDC foram analisados através do teste da ANOVA (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CPAMs-PDC foram caracterizadas com base em sua morfologia fibroblastoide (Figura 1A e 1B), habilidade de se aderir ao plástico, capacidade de diferenciação osteogênica (Figura 1C), adipogênica (Figura 1D) e condrogênica (Figura 1E) e alto potencial de proliferação celular (Figura 2) (SANTOS, 2018). A análise tumorgênica foi realizada em camundongos nudes. Foram utilizados três animais, mantidos em ambiente estéril durante o período de 90 dias, os quais receberam a infusão de 2×10^6 CPAMs-PDC, na 4ª passagem, pela via intraperitoneal (SANTOS, 2018; TAN, 2021). Após o período de 90 dias as CPAMs-PDC não foram capazes de induzir resposta imunológica ou gerar teratocarcinomas (SANTOS, 2018).

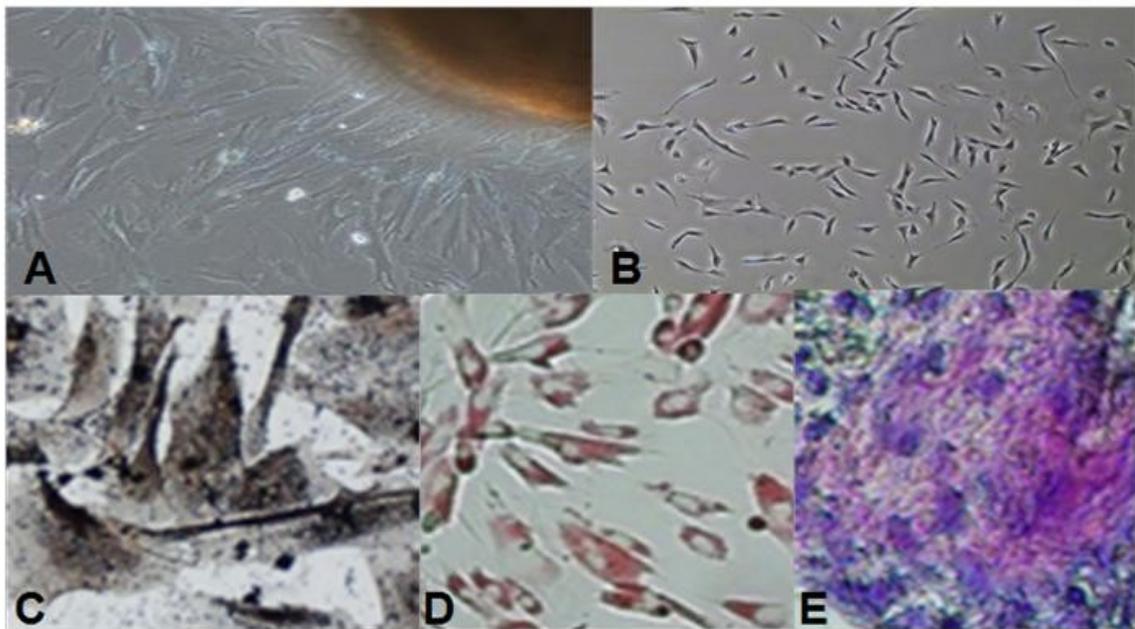


Figura 1 – Caracterização das CPAMs-PDC com base em sua morfologia e potencial diferenciação celular. A e B: morfologia fibroblastoide das CPAMs-PDC (obj. 10x); C: demonstração do potencial de diferenciação osteogênica das CPAMs-PDC por meio da marcação com Von Kossa demonstrando a calcificação da matriz extracelular (obj. 40x); D: demonstração do potencial de diferenciação adipogênica das CPAMs-PDC por meio da marcação com *Oil Red O* que demonstra o acúmulo de gotas lipídicas nas culturas (obj. 20x); E: demonstração do potencial de diferenciação condrogênica das CPAMs-PDC por meio da marcação positiva para condrocitos por meio do azul de toluidina observada na metacromasia do pellet (obj. 40x).

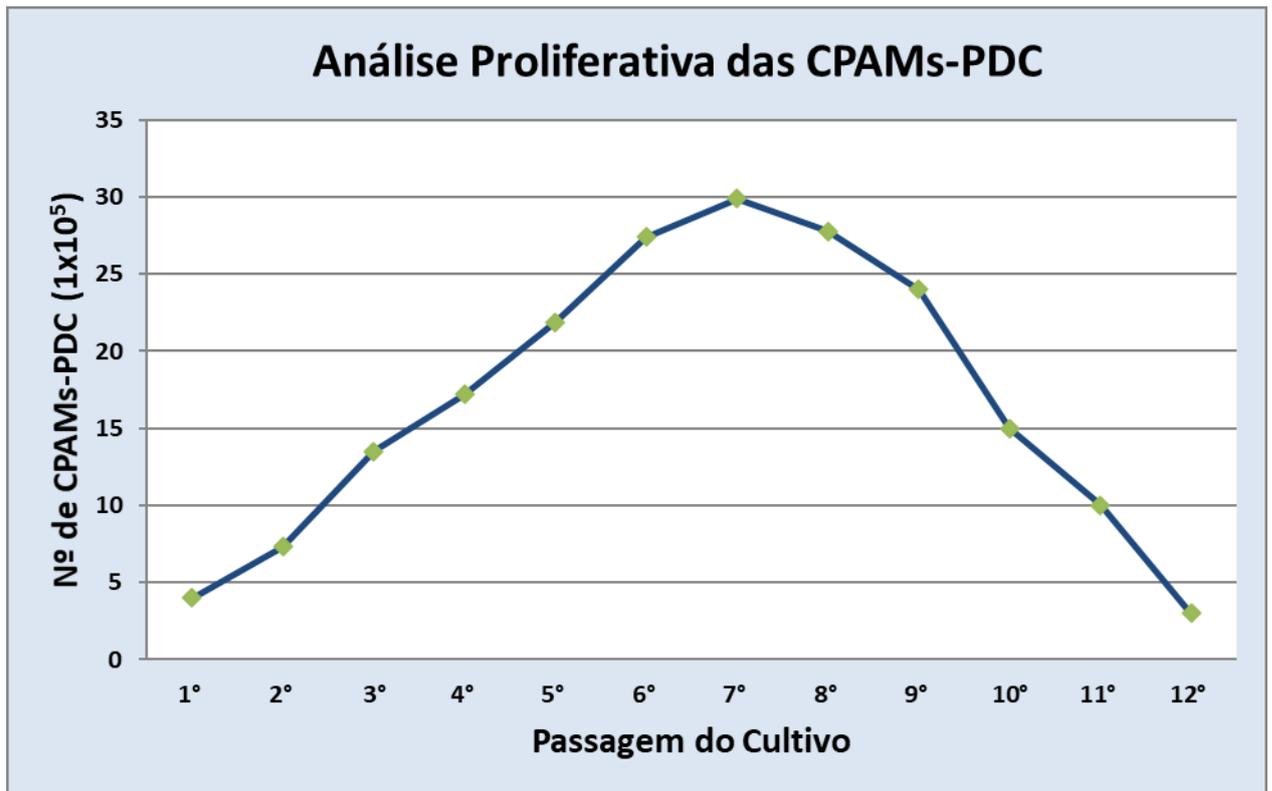


Figura 2 - Gráfico da análise proliferativa das CPAMs-PDC. Colônias de CPAMs-PDC foram expandidas até atingirem a concentração 1×10^5 células/cm². As populações foram avaliadas quanto ao seu crescimento celular a cada três dias durante 12 passagens, demonstrando crescimento exponencial até a 7ª passagem, após a qual se observou uma queda na taxa de proliferação celular.

Visando o correto diagnóstico de aplasia medular, foi realizada a exclusão de outras causas de pancitopenias, como as associadas à mielofitose (leucemias e mielofibrose), mielonecrose, aplasia pura da série vermelha (PRCA), síndrome mielodisplásica (SMD) e síndrome hemofagocítica (FELDMAN, 2005). A avaliação de medula óssea foi realizada por mielograma, indicado quando se detecta alterações no sangue periférico incapazes de serem explicadas em um hemograma. As indicações mais comuns incluem neutropenia ou trombocitopenia persistentes, trombocitose ou policitemia, anemias arregenerativas ou uma combinação de algumas destas, além da presença de células atípicas em sangue periférico (GRINDEM et al., 2002).

No presente estudo, os cães foram diagnosticados com quadro de aplasia mieloide baseado em sinais clínicos de apatia intensa, anemia, mucosas hipocoradas com sangramento frequente e exames de hemograma e mielograma.

Os baixos valores de hematócrito, variando entre 4% e 5% (valor de referência: 40% a 53%), foram clinicamente expressos pelo quadro de anemia intensa e apatia. O mielograma demonstrou que os tipos celulares hematopoiéticos eritrocíticos, granulocíticos e megacariocíticos encontravam-se em concentrações $\leq 5\%$. Estes dados sugerem que os pacientes apresentavam um quadro característico de aplasia medular, podendo ser decorrente de concentração insuficiente de CPAMs na medula óssea, anormalidades no ambiente hematopoiético, anormalidade humoral ou do controle celular da hematopoiese (FELDMAN, 2005).

Os cães estavam sendo submetidos a transfusões semanais de sangue total. Estas têm por objetivo a recuperação da capacidade de transporte de oxigênio em casos de anemias graves por perda aguda de sangue (ROCHA et al., 2009). Entretanto, em cães, a meia vida das hemácias transfundidas é de aproximadamente 21 dias, o que predispõe a reações de aglutinação das hemácias e severos danos ao organismo (FELDMAN, 2005). Sendo assim, outras fontes de tratamento para a aplasia medular devem ser consideradas como, por exemplo, a terapia celular com células-tronco (SANTOS et al., 2017).

Santos et al. (2017) demonstraram a segurança e a eficácia terapêutica das células-tronco mesenquimais alogênicas, derivadas do tecido adiposo de felinos, no tratamento de gatos resistentes a eritropoietina sintética com quadro de aplasia medular decorrente da doença renal crônica.

A utilização das CPAMs-PDC alogênicas, no presente estudo, eliminou a necessidade de se submeter os pacientes, clínica e laboratorialmente debilitados, a um procedimento cirúrgico ou aguardar o momento de uma troca dentária. O procedimento cirúrgico teria por objetivo a obtenção de amostras de cada animal de onde seriam obtidas as CPAMs, visando uma abordagem terapêutica autóloga. A utilização, na clínica veterinária, das CPAMs alogênicas, quando são previamente armazenadas, se apresenta como um procedimento mais rápido e seguro, uma vez que exclui a necessidade dos processos de isolamento e caracterização celular, o que levaria um período de aproximadamente quatro semanas.

No presente estudo, foram utilizadas no procedimento terapêutico as CPAMs-PDC armazenadas no Banco de Células-Tronco da CELLTROVET. A utilização das CPAMs-PDC

alogênicas só é possível devido a estas apresentarem atividade imunomoduladora, não sendo, portanto, reconhecidas pelo sistema imunológico dos cães receptores (AMORIM, 2020).

Estudos demonstraram que as CPAMs-PDC podem regular a resposta imune, inibindo a maturação das células dendríticas, bem como a supressão da proliferação e função dos linfócitos T e B e células *natural killer* (CORCIONE et al., 2006; KLYUSHNENKOVA et al., 2005; SPAGGIARI et al., 2008; ZHANG et al., 2004). Tal fato se deve as CPAMs apresentarem uma baixa expressão do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC-II) e co-estimulação das moléculas em sua superfície celular, necessárias para a ativação de célula T, tornando-as invisíveis para o sistema imunológico (MACHADO et al., 2013). Tais características abriram a perspectiva acerca da viabilidade da aplicação das CPAMs alogênicas no procedimento terapêutico, uma vez que os efeitos imunomoduladores das CPAMs tendem a suprimir a função imunológica do animal receptor, resultando em seu mecanismo de tolerância e conseqüentemente a não necessidade da utilização de drogas imunossupressoras (PIERDOMENICO et al., 2005).

Não foram identificadas reações de aglutinação das hemácias e severos danos ao organismo, demonstrando que repetidas infusões de CPAMs-PDC alogênicas, na concentração de 6×10^6 , foram bem toleradas pelos pacientes.

Em razão do estado clínico dos animais, optou-se inicialmente pela utilização da via intravenosa, por meio da punção da veia cefálica, evitando-se submeter os cães a ação de anestésicos. Esta caracteriza-se por ser de fácil execução, pouco invasiva e menos traumática, permitindo repetidas aplicações com o mínimo de efeitos colaterais. Dados vêm demonstrando que a administração das CPAMs pela via intravenosa, tende a reduzir, por meio de seu efeito parácrino, a probabilidade da ocorrência de, por exemplo, insuficiência renal aguda isquêmica (TÖGEL et al., 2005). Entretanto, quando administradas em altas concentrações, pesquisas sugerem a possível formação de tromboembolismo pulmonar (FURLANI et al., 2009; MOLL et al., 2012). Embora a utilização de equipos de transfusão evitem a passagem de agregados celulares, neste estudo optou-se pela não utilização dos mesmos uma vez que foi utilizada a concentração de 6×10^6 CPAMs-PDC.

A utilização da via sistêmica se deve ao fato de que uma lesão no organismo tende a resultar em uma alteração na homeostase, ocasionando uma variação no ambiente celular (HO et al., 2012; LIAN et al., 2022). Este emite sinais para as CPAMs, presentes no nicho tecidual, as quais secretam fatores tróficos que são constituídos de moléculas bioativas (fatores de crescimento e citocinas), responsáveis por atrair as CPAMs injetadas sistemicamente para o local injuriado onde atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual de forma a restabelecer a homeostase do sistema (VIZOSO et al., 2019). Em doenças como cinomose e insuficiência renal a infusão sistêmica de CPAMs vem apresentando resultados promissores (SANTOS et al., 2018; SANTOS et al., 2019b).

Após a primeira infusão intravenosa das CPAMs-PDC alogênicas, os animais não apresentaram efeitos adversos como vômito, náusea, alteração da pressão arterial e/ou variação na frequência respiratória. As CPAMs-PDC alogênicas foram administradas na concentração de 6×10^6 células e lentamente. Estudos vêm demonstrando o risco de trombose pulmonar quando uma elevada concentração celular é administrada rapidamente pela via intravenosa (COPPIN et al., 2020; TÖGEL et al., 2005; YASUMURA et al., 2022).

A análise clínica dos cães, realizada 72 horas após a primeira infusão intravenosa das CPAMs-PDC alogênicas, efetuada dois dias após uma transfusão sanguínea, revelou um aumento na disposição física e apetite alimentar dos pacientes, embora os dados laboratoriais não tenham apresentado melhora significativa. Uma semana após a primeira infusão de CPAMs-PDC os cães 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 e 12 foram submetidos a nova transfusão de sangue total, a qual passou a ser realizada semanalmente. Os cães 2 e 8, foram submetidos a transfusão de sangue total 12 e 14 dias após a primeira infusão de CPAMs-PDC respectivamente, a qual retornou a período semanal. Embora os cães tenham permanecido com um quadro clinicamente satisfatório, as transfusões foram realizadas quando os índices hematológicos se apresentavam inferiores a 10%.

A melhora clínica apresentada sugere que as CPAMs-PDC alogênicas atuaram de forma a estabilizar o quadro clínico dos pacientes, em detrimento da medula aplásica. Desta forma, a resposta hematológica pode estar diretamente relacionada tanto ao quadro clínico inicial

como a sua fisiologia. As células tendem a atuar inicialmente proporcionando uma resposta sistêmica resultando uma melhora homeostática do estado clínico do paciente (SANTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2019a; SANTOS et al., 2019b).

Após a realização da segunda infusão intravenosa das CPAMs-PDC alogênicas, todos os cães continuaram a apresentar um quadro clínico estável, com disposição física e alimentar. Uma semana após a segunda infusão de CPAMs-PDC os cães 4, 6 e 10 foram submetidos a nova transfusão de sangue total, a qual passou a ser realizada semanalmente. Os cães 1, 3, 7, 9 e 12 foram submetidos a transfusão de sangue total 13 e 22 dias após a segunda infusão de CPAMs-PDC, ao passo que os cães 2 e 5 aguardaram o período de 15 dias e os cães 8 e 11 aguardaram o período de 16 dias, os quais receberam apenas uma transfusão no período entre a segunda e terceira infusão de CPAMs-PDC.

Embora as aplicações sistêmicas tenham se mostrado eficazes no que se refere tanto ao restabelecimento do quadro clínico dos pacientes como o espaçamento das transfusões sanguíneas, estudos têm demonstrado que a infusão sistêmica resulta na retenção das células transplantadas em outros órgãos sugerindo que, em razão do quadro debilitado do paciente, as CPAMs-PDC alogênicas tenham migrado para outros sistemas. Sendo assim, optou-se pela via de aplicação direta, intramedular, a qual possibilitou uma maior retenção das CPAMs-PDC alogênicas, reduzindo a presença das células transplantadas em outros órgãos.

Sete dias após a realização da terceira infusão CPAMs-PDC alogênicas, realizada pela via intramedular, foi observada uma melhora significativa nos índices de hematócritos, chegando a atingir valores entre 14 e 17%. O hemograma realizado 14 dias após a terceira infusão apresentou valores variando entre 21 e 24% ao passo que exame realizado 21 dias após a aplicação revelou valores que alternavam entre 38 e 42% de hematócrito. Exames realizados nos cães 30 dias após a terceira aplicação de CPAMs-PDC revelou valores que variavam entre 42 e 45%. Os dados obtidos 180 dias após a última avaliação apresentou valores hematológicos variando entre 41 e 46%. Portanto foi observada resposta crescente dos valores hematológicos ($p < 0,05$) em função do tempo. Os animais, após a terceira aplicação, não foram mais submetidos a transfusões sanguíneas.

Estes resultados sugerem uma recuperação do ambiente hematopoiético composto tanto pelas CPAMs, responsáveis pela produção das células sanguíneas assim como as CPAMs responsáveis por dar origem as diversas linhagens que constituem o estroma medular.

Estudos vêm sugerindo serem as CPAMs responsáveis por promover tanto um nicho adequado como regular o processo de hematopoiese do ambiente celular (GRABCZEWSKA et al., 2013; MITSUMORI et al., 2014; BONIFAZI et al., 2019). Para tal, foram descritas três funções básicas responsáveis pelo balanço entre as CPAMs quiescentes e as necessárias para a manutenção da estabilidade tecidual: 1) permitir a interação entre as CPAMs e as células diferenciadas por meio de mecanismos celulares, de forma a regular o processo de regeneração tecidual durante o transcorrer da vida do paciente; 2) promover um ambiente seguro e estável contra diferenciações indesejáveis, apoptose e outros estímulos que afetem a reserva das CPAMs; 3) controlar a quantidade de CPAMs no corpo do paciente, assim como evitar uma excessiva proliferação das mesmas (KANDARAKOV et al., 2022).

O fato de a aplicação intramedular ter se mostrado mais efetiva, sugere que o número de CPAMs-PDC alogênicas que alcançou a medula pela via sistêmica, tenha sido em quantidade inferior a necessária para o estabelecimento de um quadro de homeostase satisfatório (FELDMAN, 2005). Desta forma, sugere-se que o sucesso da terapia está diretamente relacionado a permanência das células transplantadas no local lesionado, permitindo que possam atuar de forma mais efetiva.

CONCLUSÃO

Na medicina veterinária há poucos avanços na utilização de transplantes medulares para o tratamento da aplasia medular. Os resultados pioneiros obtidos por meio do presente estudo demonstraram que a infusão das células progenitoras adultas multipotentes alogênicas, isoladas a partir da polpa dentária de cães jovens, em associação com a terapia convencional, resultou no restabelecimento da produção das linhagens celulares oriundas da medula óssea e consequente recuperação dos cães acometidos pelo quadro de aplasia medular.

THERAPEUTIC POTENTIAL OF ALLOGENEIC MULTIPOTENT ADULT PROGENITOR CELLS DERIVED FROM DENTAL PULP IN THE TREATMENT OF MEDULLARY APLASIA SECONDARY TO CANINE EHRLICHIOSIS

ABSTRACT

Medullary aplasia is a disease characterized by a condition in which the bone marrow is constituted by less than 10% cellularity, with a reduction or absence of the three cell types (erythroid, myeloid and megakaryocytic). In view of the presented framework, the study in question aims to obtain a new approach to therapy for the treatment of medullary aplasia. In this sense, in the present study, multipotent adult progenitor cells, isolated from the dental pulp of healthy dogs (MAPCs-DPD), were analyzed based on their morphology and their potential for adipogenic, osteogenic and chondrogenic proliferation and differentiation. Twelve dogs affected by medullary aplasia underwent three applications of MAPCs-PDC. The results presented a medullary response, with an increase in the percentage of hematocrit until the total stability of the medulla. In that regard, this study demonstrates that in cases of medullary aplasia derived from ehrlichiosis, stem cell therapy is extremely promising.

Keywords: Aplastic anemia. Dogs. Stem cells. Cell therapy. Bone marrow.

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES ALOGÉNICAS DERIVADAS DE PULPA DENTAL EN EL TRATAMIENTO DE LA APLASIA MEDULAR SECUNDARIA A EHRLICHIOSIS CANINA

RESUMEN

La aplasia medular es una enfermedad caracterizada por una condición en la que la médula está compuesta por menos del 10% de celularidad, mostrando una reducción o ausencia de los tres tipos de células (eritroide, mioide y megacariocítica). Ante la situación presentada, el trabajo en cuestión pretende obtener un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de la aplasia medular. En este sentido, en el presente estudio se analizaron células progenitoras multipotentes adultas, aisladas de la pulpa dental de un perro sano (CPAMs-PDC), en función de su morfología, potencial de proliferación y diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica. Doce perros afectados por aplasia

medular fueron sometidos a tres aplicaciones de CPAMs-PDC. Los resultados demostraron una respuesta medular, con aumento del porcentaje de hematocrito hasta la total estabilidad de la médula. En este sentido, este estudio demuestra que en casos de aplasia mieloide derivada de ehrlichiosis, la terapia con células madre es sumamente prometedora.

Palabras clave: Anemia aplásica. Perros. Células madre. Terapia celular. Médula ósea.

REFERÊNCIAS

AMORIM, R. M.; CLARK, K. C.; WALKER, N. J.; et al. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 304, p. 1-12, 2020.

BONIFAZI, F.; DAN, E.; LABOPIN, M.; et al. Intrabone transplant provides full stemness of cord blood stem cells with fast hematopoietic recovery and low GVHD rate: results from a prospective study. **Bone Marrow Transplantation**, v. 54, n. 5, p. 717-725, 2019.

CIVIN, C. I. Stem cell research: back to the future. **Stem Cells**, v. 19, n. 5, p. 356-357, 2001.

COPPIN, L. C. F.; SMETS, F.; AMBROISE, J.; et al. Infusion-related thrombogenesis by liver-derived mesenchymal stem cells controlled by anticoagulant drugs in 11 patients with liver-based metabolic disorders. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 51, p. 1-10, 2020.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.

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.

FURLANI, D.; UGURLUCAN, M.; ONG, L.; et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvascular Research**, v. 77, n. 3, p. 370-376, 2009.

GRABCZEWSKA, Z.; DEBSKI, R.; GÓRALCZYK, K.; et al. Does mobilisation of CD34+ stem cells along with VEGF, angiogenin, IL-6, IL-8, and hsCRP levels allow predicting the direction of left ventricular ejection fraction and wall motion score index changes in patients with myocardial infarction? **Kardiologia Polska**, v. 71, n. 5, p. 464-471, 2013.

GRINDEM, C. B.; NEEL, J. A.; JUOPPERI, T. A. Cytology of bone marrow. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 1313-1374, 2002.

HARMAN, R.; CARLSON, K.; GAYNOR, J.; et al. Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the

Treatment of Osteoarthritis in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. 81, p. 1-10, 2016.

HO, J. H.; TSENG, T. C.; MA, W. H.; et al. Multiple intravenous transplantations of mesenchymal stem cells effectively restore long-term blood glucose homeostasis by hepatic engraftment and β -cell differentiation in streptozocin-induced diabetic mice. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 5, p. 997-1009, 2012.

KANDARAKOV, O.; BELYAVSKY, A.; SEMENOVA, E. Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8 (4462), p. 1-30, 2022.

KANG, B. J.; RYU, H. H.; PARK, S. S.; et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, 299-310, 2012.

KLYUSHNENKOVA, E.; MOSCA, J. D.; ZERNETKINA, V.; et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, p. 47-57, 2005.

LIAN, X. F.; LU, D. H.; LIU, H. L.; et al. Effectiveness and safety of human umbilical cord-mesenchymal stem cells for treating type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 13, n. 10, p. 877-887, 2022.

MACHADO, C. V.; TELLES, P. D. S.; NASCIMENTO, I. L. O. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 62-67, 2013.

MEDINGER, M.; DREXLER, B.; LENGGERKE, C.; et al. Pathogenesis of Acquired Aplastic Anemia and the Role of the Bone Marrow Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 587, p. 1-10, 2018.

MITSUMORI, T.; NOZAKI, Y.; KAWASHIMA, I.; et al. Hypoxia inhibits JAK2V617F activation via suppression of SHP-2 function in myeloproliferative neoplasm cells. **Experimental Hematology**, v. 42, n. 9, p. 783-792, 2014.

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.

PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-842, 2005.

PIETRAS, E. M. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. **Blood**, v. 130, n. 15, p. 1693-1698, 2017.

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

RODRÍGUEZ, M. C.; SÁIZ, M. P.; CARBONELL, T.; et al. Local and systemic responses to iron-dextran injected into a granuloma pouch in the rat. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 134, n. 1, p. 42-48, 1999.

SANTOS, E. J. C.; WINCK, C. P.; BRAGA, C. L. Estudo eficácia e segurança terapêutica das células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento de felinos acometidos pela doença renal crônica e resistentes a eritropoetina sintética. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, ano 2, v. 1, p. 296-309, 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, 2018.

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. **Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 3, n. 49, p. 32-40, 2019a.

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.

SPAGGIARI, G. M.; CAPOBIANCO, A.; ABDELRAZIK, H.; et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327-1333, 2008.

TAN, T. T.; LAI, R. C.; PADMANABHAN, J.; et al. Assessment of Tumorigenic Potential in Mesenchymal-Stem/Stromal-Cell-Derived Small Extracellular Vesicles (MSC-sEV). **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 345, p. 1-10, 2021.

TÖGEL, F.; HU, Z.; WEISS, K.; et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. F31-F42, 2005.

VIZOSO, F. J.; EIRO, N.; COSTA, L.; et al. Mesenchymal stem cells in homeostasis and systemic diseases: hypothesis, evidences, and therapeutic opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15 (3738), p. 1-23, 2019.

YASUMURA, Y.; TESHIMA, T.; TAIRA, Y.; et al. Optimal Intravenous Administration Procedure for Efficient Delivery of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23 (14681), p. 1-21, 2022.

ZHANG, W.; GE, W.; LI, C.; et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Stem Cells and Development**, v. 13, n. 3, p. 263-271, 2004.

Autor para correspondência:
Enrico Jardim Clemente Santos.
Celltrovet - Medicina Veterinária Personalizada, Rua Luiz Lopes, número 1, Vila Yara, Osasco (SP), Brasil. CEP:
06026-130.
enrico@celltrovet.com.br