



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**VICTOR MORAES AMORIM**

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM ANIMAIS**  
**COM HIPOPLASIA DE MEDULA ÓSSEA**

**BRASÍLIA**

**2020**



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**VICTOR MORAES AMORIM**

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM ANIMAIS**  
**COM HIPOPLASIA DE MEDULA ÓSSEA**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Carlos Alberto da Cruz Júnior

**BRASÍLIA**

**2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador o professor Carlos Alberto da Cruz Júnior por aceitar conduzir o meu trabalho de iniciação científica e pela orientação na condução do trabalho.

Ao laboratório de biotecnologia animal - Bio cell terapia celular por aceitar a parceria com a faculdade para a realização do trabalho de iniciação científica.

Aos funcionários do laboratório Bio cell pela paciência para receber a mim e aos meus colegas de braços abertos, graduandos de medicina veterinária, através da primeira experiência em projeto de pesquisa.

Aos médicos veterinários do laboratório Bio cell, principalmente a Patricia Furtado Malard e Hilana dos Santos Sena Brunel, por aceitarem participar do trabalho de iniciação científica de forma voluntária, pela orientação na condução do trabalho, pelos ensinamentos fornecidos, pela orientação diária e pela oportunidade de colocar em prática a teoria vista em sala de aula.

## RESUMO

A hipoplasia ou aplasia de medula óssea é uma enfermidade que afeta cães e gatos, caracterizada pela não produção suficiente de uma (anemia, trombocitopenia e leucopenia) ou todas (pancitopenia) as linhagens das células do sangue pela medula óssea. Essa enfermidade é causada por danos na medula óssea, prejudicando a produção das células sanguíneas. O prognóstico é desfavorável na maioria dos casos, com o tratamento sendo limitado a combater a sua causa, utilizando fatores de crescimento hematopoiético, tratamento de suporte (transfusões de sangue) e a terapia imunossupressora (anti-inflamatórios esteroidais). As células-tronco mesenquimais (CTM) atuam através da secreção dos seus fatores parácrinos (citocinas e fatores de crescimento) diminuindo a inflamação, a apoptose, estimulando a multiplicação celular, estimulando a angiogênese e regulação do sistema imune. O objetivo do trabalho foi avaliar a terapia celular com CTM halógenas em animais com hipoplasia de medula óssea. Para o presente estudo, foram selecionados 6 cães para serem submetidos ao tratamento para hipoplasia medular com CTM. Os animais selecionados apresentaram diagnóstico de hipoplasia, não eram responsivos ao tratamento imunossupressor e não apresentavam outras comorbidades. Dentre os animais selecionados as causas da hipoplasia eram de origem: infecciosas, medicamentosa e imunomediada. O protocolo realizado foi de 3 aplicações de CTM endovenosa, através de fluidoterapia. Foram realizados o hemograma de todos os animais entre cada aplicação, que comprovou a resposta positiva da medula óssea ao tratamento com a elevação dos parâmetros hematológicos avaliados. Foi concluído que o tratamento com CTM auxiliou na recuperação da medula óssea em animais com hipoplasia medular.

**Palavras-chave: Aplasia de medula. Pancitopenia. Terapia celular.**

## SUMARIO

INTRODUÇÃO .....	1
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
MÉTODO.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	7
CONSIDERAÇÃO FINAL (CONCLUSÃO) .....	10
REFERÊNCIAS .....	11
APÊNDICE .....	14

## INTRODUÇÃO

A hipoplasia ou aplasia de medula óssea é uma enfermidade que afeta cães e gatos, caracterizada pela baixa produção de uma (citopenia: anemia, trombocitopenia e leucopenia) ou todas (pancitopenia) as linhagens das células do sangue pela medula óssea (eritróide, mielóide e megacariocítica). Pode ser classificada em aguda ou crônica, de acordo com a sua evolução (MORAES; TAKAHIRA, 2010).

A hipoplasia pode acontecer pela destruição das células-tronco ou das células progenitoras, mutação genética, desregularização das citocinas hematopoiéticas ou alterações no estroma; causada por medicamentos (drogas mielotóxicas) (HARCHEK; ROUSSEAU; WALLIG, 2010), toxinas, radiação, agentes infecciosos (babesia, ehrlichia ou leishmaniose) (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016), imunomediada ou idiopática. Esses fatores provocam danos na medula óssea, danificando as linhagens das células sanguíneas resultando na sua baixa produção (COSTA *et al.*, 2019).

A suspeita de hipoplasia acontece quando são descartados outros possíveis diagnósticos para as alterações hematológicas no animal. O prognóstico da maioria dos casos de hipoplasia medular é desfavorável. O tratamento é limitado a tratar a causa, ao uso de anti-inflamatórios esteroidais (em dose imunossupressoras), ao tratamento de suporte e às transfusões sanguíneas (LUCIDI; MARCELO, 2015), porém, novas opções terapêuticas vêm sendo avaliadas, como a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM).

As CTM podem ser obtidas a partir de diversos tecidos, entre eles o adiposo, polpa dentária ou a medula óssea. Essas células apresentam a capacidade de serem multipotentes, podem se multiplicar e diferenciar em várias linhagens de tecidos mesenquimais (como os condrócitos, osteoblastos e adipócitos) (NAUTA; FIBBE, 2007). As CTM são atraídas pelo processo inflamatório, onde há uma grande concentração de citocinas pró-inflamatórias e células em apoptose e geram uma resposta a esse microambiente em que estão. A resposta das CTM é a produção de fatores parácrinos (fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias), causando a diminuição da inflamação, modulação da resposta imunológica, estimulação da angiogênese, aumento da taxa de multiplicação celular, diminuição da apoptose e auxiliar as células danificadas a se recuperar (SPEES; LEE; GREGORY, 2016).

Considerando o mecanismo de ação das CTMs, alguns trabalhos relatam efeitos positivos no tratamento da hipoplasia de medula óssea (NOLTA et al., 2002; NAKAO et al., 2010; PANG *et al.*, 2017). Entretanto o número de informações ainda é muito escasso na literatura. O objetivo do trabalho foi avaliar a terapia celular com células-tronco mesenquimais halógenas em animais com hipoplasia de medula óssea.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A hematopoiese é a produção de células sanguíneas constantemente pelas células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras na medula óssea, dependente do meio em que as células estão (nicho hematopoiético) e as interações entre as células. Essa produção envolve vários processos como multiplicação, diferenciação e maturação das células sanguíneas; auto renovação e reparação das células da medula. Os processos são regulados por fatores intrínsecos e extrínsecos (citocinas inflamatórias) e mecanismos regulatórios (CXCL12) que alteram o nicho hematopoiético influenciando na produção das células do sangue (AQMASHEH *et al.*, 2017).

O tratamento da medula danificada consiste na eliminação do fator que está causando o dano na medula óssea, com o objetivo inicial de reverter a deficiente produção das células sanguíneas. Nos casos de leucopenia, onde ocorrem as infecções oportunistas, são utilizadas antimicrobianos para combater os agentes infecciosos. Quando a causa é a administração de medicação de substâncias mielotóxicas a suspensão da medicação é suficiente para a recuperação do animal em aproximadamente 1 ou 2 semanas (KEARNS; EWING, 2006; COSTA *et al.*, 2019).

Segundo Lucidi e Marcelo (2015) a administração de fatores de crescimento hematopoiéticos recombinantes (eritropoietina, trombopoietina, fator estimulantes de granulócitos) para o tratamento de citopenias, tem como o objetivo de estimular a medula óssea a produzir as células do sangue, mas não influencia na causa do dano e podem gerar resposta imune por parte do animal, produzindo leucócitos contra o os fatores de crescimento, podendo agravar o dano à medula óssea.

Dentre as causas de hipoplasia medular, podem-se citar as doenças autoimunes e os agentes infecciosos, os quais causam uma supressão da medula óssea pela produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos T, Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que possuem a capacidade de causar danos à medula óssea, interferindo na produção das células sanguíneas (GRIMES; FRY, 2015). Segundo Sun e colaboradores (2018) a superprodução de IFN-g e TNF- $\alpha$  causam danos à medula, inibindo a proliferação de células progenitoras e estimulando a expressão de Fas ligante (induzindo a apoptose das células).



A terapia imunossupressora com anti-inflamatórios esteroidais, como a prednisona, inibe a produção de mediadores inflamatórios produzidos pelos linfócitos T, auxiliando na hematopoiese (BAGBY *et al*, 1979). Mas em casos de animais resistentes, a prednisona pode ser associada a outros medicamentos imunossupressores (ciclosporina) (LUCIDI; MARCELO, 2015).

Segundo Shin, Lee e Lee (2014) a terapia celular com CTM é uma opção em casos quando não há resposta com o tratamento com terapia imunossupressora. Pang e colaboradores (2017) realizaram um estudo multicêntrico de fase II, não comparativo, utilizando CTM derivadas de medula óssea alogênica em seres humanos com anemia aplásica, sem resposta à terapia imunossupressora. Houve o auxílio na recuperação da medula óssea e dos parâmetros hematológicos dos pacientes após um ano da realização do tratamento com CTM. Nolte e colaboradores (2002) relatam recuperação da medula e diminuição de linfócitos T. Já Nakao e colaboradores (2010) associaram a melhor recuperação da medula óssea com a maior secreção da quimocina CXCL12 em decorrência da terapia com CTM provenientes de tecido adiposo.

## MÉTODO

As CTMs foram isoladas e cultivadas a partir de tecido adiposo de um cão doador sadio. Para a coleta do tecido adiposo, o doador foi anestesiado, uma incisão foi feita na região lombar e aproximadamente 20 g de tecido adiposo foram coletados da base da cauda. O tecido adiposo foi lavado em solução salina de fosfato para remover resíduos celulares e sanguíneos, cortado em pequenos pedaços e, depois, exposto à hialuronidase, para passar por uma digestão enzimática. Depois disso, as células passaram por um processo de filtração para iniciar uma seleção das CTMs. Posteriormente, as células foram colocadas em frascos de cultura com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e foram incubadas a 37,5 oC e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h, o meio foi descartado com as células não aderentes e o meio de cultura fresco foi adicionado aos frascos. O meio foi trocado a cada 3 dias, até as células atingirem 80% de confluência, quando foi realizada tripsinização para retirar as células das garrafas, contagem na câmara de Neubauer e envase em palhetas (1x10<sup>6</sup> células / palheta) para congelamento com DMSO e soro fetal bovino no nitrogênio líquido. Cinco palhetas (5x10<sup>6</sup> células) foram descongeladas para caracterização das CTMs.

A caracterização das CTM foi realizada de acordo com a International Society for Cell Therapy. As CTM devem ser possuir certas propriedades específicas: serem aderentes ao plástico, expressar marcadores de superfície específicos e capaz de se diferenciar em outros tipos de tecido; analisados por citometria de fluxo no Amnis® Imaging Flow Cytometer. As CTM devem apresentar 95% dos receptores de superfície: CD73, CD90 e CD105 e os fatores de transcrição intranuclear: OCT3.4 e SOX-2; não expressando menos de 2% dos receptores: CD14 ou CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79 e MHC classe II. Também devem ser capazes de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos in vitro.

O meio de cultura das células (DMEM) foram analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR), em busca de contaminantes ou patógenos (fungos, micoplasma e bactérias). Foi realizado a viabilidade das CTM após o descongelamento, por meio da citometria de fluxo.

Os animais foram encaminhados para a Bio Cell Terapia Celular para realizar o tratamento com CTM para hipoplasia medular. Foram selecionados 6 cães, machos e fêmeas, de raças e idades diferentes, com confirmação de hipoplasia medular e resistentes ao tratamento imunossupressor com anti-inflamatório esteroide (2mg/quilograma, duas vezes

ao dia, por 10 dias). A confirmação da hipoplasia foi realizada por meio da avaliação clínica combinada a exames hematológicos e mielograma, não apresentando qualquer célula neoplásica. A causa primária da hipoplasia nos animais foi: 4 de origem infecciosa, 1 autoimune e 1 medicamentosa. As aplicações de CTM foram realizadas após a confirmação da doença, a descoberta da sua causa.

Para a aplicação das CTM halógenas foram utilizadas as palhetas produzidas pelo laboratório e congeladas com nitrogênio líquido. As CTM foram descongeladas e lavadas utilizando meio de lavagem e suspensas em meio de transporte, produzidos pelo laboratório. A quantidade de células aplicadas foi personalizada para cada animal, de acordo com o peso e gravidade de cada caso. O protocolo utilizado para cada tratamento foi de 3 aplicações de CTM, com 1 a  $2 \times 10^6$  células por quilograma de peso por meio de soroterapia endovenosa, com intervalo de 21 dias entre cada aplicação. Antes do tratamento os tutores dos animais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para a terapia com CTM, autorizando a publicação dos resultados obtidos pelo tratamento.

Foi realizado nos dias 1 e 15 após cada aplicação o contato com os tutores por telefone para verificar se houve qualquer reação adversa (febre, apatia e falta de apetite) com o animal. E 21 dias após cada aplicação foi coletado o sangue dos animais para a realização do hemograma completo, para avaliar a resposta do animal ao tratamento de CTM. Todos os dados colhidos foram arquivados no prontuário de cada animal.

Os exames foram tabulados e divididos em 4 fases de acordo com o número das aplicações: fase 0 (antes do tratamento), fase 1 (coletado com aproximadamente 21 dias após a 1ª aplicação), fase 2 (coletado com 21 dias após a 2ª aplicação), fase 3 (coletado com 21 dias após a 3ª aplicação).

Em um dos animais (F) foi possível realizar o mielograma após o tratamento para a comparação da resposta da medula óssea com a análise anterior ao tratamento (APÊNDICE A - TRATAMENTO DE HIPOPLASIA MEDULAR COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS – RELATO DE CASO).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o tratamento com CTM , os 6 animais acometidos pela hipoplasia apresentaram uma melhora clínica e melhora nos parâmetros hematológicos avaliados (tabela 1), e 5 animais ainda apresentam um ou mais parâmetros hematológicos abaixo do valor de referência, mas passaram a viver normalmente sem a necessidade de transfusão de sangue ou uso de medicação; com exceção do animal F que ainda necessita realizar as transfusões.

O animal A apresentou melhora nos parâmetros das hemácias, mas as plaquetas ainda continuaram abaixo do valor de referência. O animal B apresentou melhora na quantidade de leucócitos e plaquetas, porém, ainda se mantiveram abaixo dos valores de referência. O animal C apresentou aumento na quantidade das plaquetas, estabilizando após o tratamento acima dos valores de referência. O animal D ainda apresentava pancitopenia após o tratamento, porém, com aumento dos parâmetros próximo do valor de referência. O animal E também apresentou melhora da pancitopenia estabilizando dentro do valor de referência, com exceção dos leucócitos. O animal F necessitou realizar semanalmente transfusões de sangue para se manter estável, não tornando a avaliação dos exames de sangue confiáveis. Sendo utilizado para avaliação da resposta do animal ao tratamento o aumento do intervalo das transfusões, antes semanais para a cada três semanas.

A terapia com as CTM tem a capacidade de apoiar a hematopoiese pela secreção dos seus fatores parácrinos (fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias), os quais tem função de inibir a apoptose, a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimular a proliferação, auto renovação, diferenciação, migração e proteção das células-tronco hematopoiéticas. Visto que as CTM possuem propriedades imunomoduladoras, inibem a multiplicação e ativação dos leucócitos (linfócitos T e macrófagos), elas conseguem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN-g e TNF-a) e estimulam a produção de anti-inflamatórias (AQMASHEH et al., 2017; NAUTA; FIBBE, 2007), assim o uso de CTM diminui o dano causado pelas citocinas pró-inflamatórias e auxilia na recuperação da medula.

NAKAO e colaboradores (2010) relatam que CTM oriundas de tecido adiposo são melhores que as da medula óssea para reconstituição do tecido hematopoiético, por secretarem em maior quantidade a CXCL12. A CXCL12 é uma quimiocina abundante na medula óssea necessária para regular o desenvolvimento, a liberação, deslocamento e proteção de

várias linhagens de células do sistema imune e células-tronco hematopoiéticas (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014). Segundo ZHANG e colaboradores (2016) a CXCL12 aumenta o potencial de reconstituição do tecido hematopoiético e atua na proteção contra estresse oxidativo (o qual aumenta a apoptose de células, levando à exaustão da célula hematopoiética), sendo uma quimiocina de muita importância por afetar positivamente o meio extracelular da medula óssea e a própria célula-tronco hematopoiética.

Tabela 1: Hemogramas completos antes, durante e após o tratamento com CTM.

Exames	Animal A				Animal B				Animal C				Animal D				Animal E				Animal F				Valor de referência
	Fase 0	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 0	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 0	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 0	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 0	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 0	Fase 1	Fase 2	Fase 3	
Hemácias	2,78	3,04	6,15	6,39	6,43	5	5,33	6,66	6,42	6,77	6,27	6,6	3,61	4,09	5,5	5,42	3,91	5,2	5,3	6	2,07	3,3	3,72	4,23	5,5 a 8,5 u <sup>3</sup>
Hemoglobina	5,9	7,4	14,3	14,7	15	12,6	13,6	15,2	16	17,1	15,1	15,1	8,6	9,8	12,5	11,6	10,1	13,1	13,9	14,3	6,2	7,3	8,3	9,9	12 a 18 g/dL
Hematócrito	19,6	27,3	48,7	45,8	48,7	33,6	39,7	49,5	47	49,9	46,2	43	27,8	31,4	38,6	36,4	28	37,7	38,5	40,5	18,6	21,4	24	28,3	37 a 55 %
Volume corpuscular médio (VCM)	70,5	89,9	79,19	71,67	75,74	67,2	74,48	74,32	73,21	73,71	73,68	65,15	77,01	76,77	70,18	67,16	72,4	72,4	72,2	66,7	89,86	65,85	64,52	66,9	60 a 72 fL
Hemoglobina corpuscular média (HCM)	21,22	24,34	23,25	23	23,33	25,2	25,52	22,82	-	25,26	24,08	-	23,82	23,96	22,73	21,4	-	-	25,9	23,5	-	-	-	-	19 a 23 pg
Concentração de hemoglobina média (CHCM)	30,1	27,11	29,36	32,1	30,8	37,5	34,26	30,71	34,04	34,27	32,68	35	31	31,21	32,38	31,87	35,6	34,6	35,9	35,2	33,33	34,11	34,58	34,98	31 a 37 g/dL
Leucócitos	10.900	9.900	4.300	6.900	1.700	3.300	4.200	3.600	11.600	11.400	4.100	7.300	4.600	3.000	4.500	5.700	1.600	4.160	2.730	3.800	18.300	9.100	16.300	8.500	6000 a 17000 mm <sup>3</sup>
Bastonetes	0	198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	124	81	38	549	0	163	0	0 a 510 mm <sup>3</sup>
Segmentados	9.919	8.514	3.354	5.589	1.173	1.518	2.520	2.088	10.788	9.804	2.952	4.526	2.990	2.040	3.510	3.990	1.200	3.702	1.583	3.116	13.542	6.188	14.018	7.395	3600 a 13000 mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	109	0	86	345	0	0	42	0	0	0	0	292	0	60	0	57	-	0	27	114	0	91	0	85	0 a 1.700 mm <sup>3</sup>
Linfócitos	763	1.188	817	621	442	1.782	1.386	1.332	696	1.482	943	1.898	1.150	600	900	1539	300	249	982	456	3843	2.457	1.141	680	720 a 5.100 mm <sup>3</sup>
Monócitos	109	0	43	345	0	0	252	180	116	114	205	511	460	300	90	114	-	83	54	76	366	364	978	340	0 a 1.700 mm <sup>3</sup>
Plaquetas	79.000	166.000	288.000	29.000	81.000	111.000	95.000	120.000	43.000	328.000	149.000	165.000	110.000	120.000	146.000	136.000	25.000	238.000	180.000	299.000	484.000	311.000	186.000	216.000	150000 a 500000 mm <sup>3</sup>

**CONSIDERAÇÃO FINAL (CONCLUSÃO)**

O presente estudo demonstrou que o tratamento com CTM oriunda de tecido adiposo auxiliou na recuperação da medula óssea dos 6 animais avaliados, conseqüentemente aumentando a produção de células do sangue circulante.

É necessário realizar estudos randomizados, controlados e multicêntricos para desenvolver protocolos mais concretos, para podermos afirmar que o tratamento com CTM como uma possível alternativa de tratamento para hipoplasia medular.

## REFERÊNCIAS

AQMASHEH, Sara; SHAMSASANJAN, Karin; AKBARZADEHLALEH, Parvin; SARVAR, Davod Passoutan; TIMARI, Hamze. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 7, n. 2, p. 165-177, jun. 2017. DOI: 10.15171/apb.2017.021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527230/#:~:text=MSCs%20release%20many%20growth%20factors,both%20erythroid%20and%20myeloid%20differentiation>. Acesso em: 10 set. 2020.

COSTA, Jamilly Nunes Ramos; GOMES, Ana Amélia Domingues; SANTOS, Cássia Regina Oliveira; MOROZ, Ludmila Rodrigues. Aplasia de medula óssea em cães – Revisão de Literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*, Ed. 49, v. 3, p. 66-73. 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/332968155\\_Aplasia\\_de\\_medula\\_em\\_caes\\_-\\_Revisao\\_de\\_literatura\\_Bone\\_marrow\\_in\\_dogs\\_-\\_Literature\\_review](https://www.researchgate.net/publication/332968155_Aplasia_de_medula_em_caes_-_Revisao_de_literatura_Bone_marrow_in_dogs_-_Literature_review). Acesso em: 10 out. 2020.

BAGBY, Grover C.; GOODNIGHT, Scott H.; MOONEY, William M.; RICHERT-BOE, Kathryn. Prednisone-Responsive Aplastic Anemia: A Mechanism of Glucocorticoid Action. *BLOOD*, v. 54, n. 2, p. 322-333, agosto. 1979. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/313221/>. Acesso em: 25 jul. 2020.

GRIFFITH, Jason W.; SOKOL, Caroline L.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*, v. 32, p.659-702, mar. 2014. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145. Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24655300/>. Acesso em: 09 agosto 2020.

GRIMES, C. N.; FRY, M. M. Nonregenerative Anemia: Mechanisms of Decreased or Ineffective Erythropoiesis. *Veterinary Pathology*, v. 52(2), p. 298-311. 2015. DOI: 10.1177/0300985814529315. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24807888/>. Acesso em: 19 set. 2020.

HARCHEK, Wanda M.; ROUSSEAU, Colin G.; WALLIG, Matthew A. Hematopoietic System in: *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Segunda edição. Academic Press, 2010.

KEARNS, Shawn; EWING, Patty. Causes of Canine and Feline Pancytopenia. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian -North American Edition*, v. 28, n. 2, p. 122-133, fev. 2006. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/287446723\\_Causes\\_of\\_canine\\_and\\_feline\\_pancytopenia#:~:text=Many%20infectious%2C%20immune%2Dmediated%2C,of%20decreased%20hematopoietic%20cell%20production](https://www.researchgate.net/publication/287446723_Causes_of_canine_and_feline_pancytopenia#:~:text=Many%20infectious%2C%20immune%2Dmediated%2C,of%20decreased%20hematopoietic%20cell%20production). Acesso em: 05 out. 2020.

LUCIDI, Cynthia de Assumpção; MARCELLO, Gracy Canto Gomes. Abordagem às citopenias. In: JERICÓ, Márcia Marques; ANDRADE NETO, João Pedro; KOGIKA, Márcia Mery (org.). *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2014.



MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MORAES, Livia Fagundes; TAKAHIRA, Regina Kiomi. Aplasia Medular em Cães. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.9, n.1, p. 99-108. 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/140512>. Acesso em: 04 agosto 2020.

NAKAO, Norihiko et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Facilitate Hematopoiesis in Vitro and in Vivo. The American Journal of Pathology, v. 177, n. 2, p. 547-554, Aug. 2010. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091042. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913350/>. Acesso em: 15 jun. 2020.

NAUTA, Alma J.; FIBBE, Willem E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. BLOOD, v. 110, n. 10, nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30516112/#:~:text=Abstract,innate%20and%20adaptive%20immune%20response>. Acesso em: 19 fev. 2020.

NOLTA, J. A. et al. The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. Leukemia, v. 16, p. 352–361. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402371>. Acesso em: <https://ashpublications.org/blood/article/110/10/3499/23332/Immunomodulatory-properties-of-mesenchymal-stromal>. Acesso em: 08 agosto 2020.

PANG, Yan et al. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Expanded In Vitro for Treatment of Aplastic Anemia: A Multicenter Phase II Trial. Stem Cell Research & Therapy, v. 6, n. 7, p. 1569-1575, jul. 2017. DOI: 10.1002/sctm.16-0227 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5689769/>. Acesso em: 26 set. 2020.

SHIN, Seung Hwan; LEE, Sung Eun; LEE, Jong Wook. Recent advances in treatment of aplastic anemia. The Korean Journal of Internal Medicine, v. 29, n. 6, p. 713-726, set. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2014.29.6.713>. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219959/#:~:text=Allogeneic%20stem%20cell%20transplantation%20\(SCT,an%20alternative%20option%20for%20others](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219959/#:~:text=Allogeneic%20stem%20cell%20transplantation%20(SCT,an%20alternative%20option%20for%20others). Acesso em: 20 set. 2020.

SPEES, Jeffrey L.; LEE, Ryang Hwa; GREGORY, Carl A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. Stem Cell Research & Therapy, v. 7, n. 125, aug. 2016. DOI 10.1186/s13287-016-0363-7. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0363-7>. Acesso em: 12 abril 2020.

SUN, Wanling et al. Macrophage TNF- $\alpha$  licenses donor T cells in murine bone marrow failure and can be implicated in human aplastic anemia. BLOOD, v. 132, n. 26, p. 2730–2743, dec. 2018. DOI: 10.1182/blood-2018-05-844928. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30361263/>. Acesso em: 12 agosto 2020.

ZHANG, Yanyan et al. CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-13, nov. 2016. DOI: 10.1038/srep37827. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep37827/>. Acesso em: 09 agosto 2020.

**APÊNDICE A – TRATAMENTO DE HIPOPLASIA MEDULAR COM CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS – RELATO DE CASO**

**TRATAMENTO DE HIPOPLASIA MEDULAR COM CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS – RELATO DE CASO**

AMORIM<sup>1</sup>, V.M.; BRUNEL<sup>3</sup>, H.S.S.; JÚNIOR<sup>2</sup>, C.A.C.; MALARD<sup>3</sup>, P. F.

victor.amorim@sempreceub.com

<sup>1</sup> Graduando do curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário de Brasília – Uniceub;

<sup>2</sup> UNICEUB - Médico veterinário, Coordenador do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Brasília, PhD;

<sup>3</sup> Médica Veterinária, PhD, BIO CELL Terapia Celular;

## **INTRODUÇÃO**

A hipoplasia medular é uma enfermidade da medula óssea que acomete os cães e gatos, caracterizada por pancitopenia, leucopenia, anemia ou trombocitopenia das células do sangue. Essa enfermidade é causada por uma destruição do tecido hematopoiético. A hipoplasia medular pode ser de origem idiopática, drogas, radiação, toxinas e agentes infecciosos. O tratamento consiste na eliminação da causa da doença, utilização de anti-inflamatórios esteroidais, fatores de crescimento hematopoiéticos e tratamento suporte com transfusões de sangue (COSTA *et al*, 2019).

Com o objetivo de auxiliar a recuperação da medula óssea, pode ser realizada terapia com células-tronco mesenquimais (CTM), as quais são caracterizadas por serem células multipotentes capazes de se diferenciar em outras linhagens celulares mesenquimais e produzir citocinas para estimular o crescimento celular ou modular a resposta inflamatória (MONTEIRO *et al.*, 2010; NAUTA; FIBBE, 2007). Dessa forma a utilização da CTM pode auxiliar a medula óssea a se recuperar.

## **OBJETIVO**

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia das CTM como uma terapia alternativa para animais acometidos por hipoplasia medular.

## **MÉTODO**

A realização desse trabalho foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO UniCEUB (CEUA/UniCEUB), em reunião de 07/12/18 sob o protocolo No: 024/2018.

Um Cão macho, Rottweiler, foi encaminhado para a Bio Cell Terapia Celular, com o diagnóstico de Hipoplasia medular causada por leishmaniose, com alteração renal e osteoartrose. O animal estava sendo tratado com sucesso para leishmaniose com milteforan, mas necessitava realizar regularmente transfusões de sangue a cada uma semana. O protocolo utilizado no animal foi de 20 milhões de células a cada aplicação (armazenadas em duas seringas de 10ml com meio de transporte). Foram realizadas 3 aplicações de CTM halógenas, cultivadas e preparadas conforme Malard et al. (2019), realizadas com aproximadamente 21 dias de intervalo. Foi realizada a coleta do sangue do animal 21 dias após cada aplicação, para acompanhar a resposta ao tratamento. Todas estas aplicações foram efetuadas por meio da via intravenosa em conjunto a uma administração de ringer com lactato. Antes e 10 minutos após cada aplicação realizou-se uma avaliação dos parâmetros vitais do animal com auscultação cardíaca e respiratória, e mensuração da temperatura.

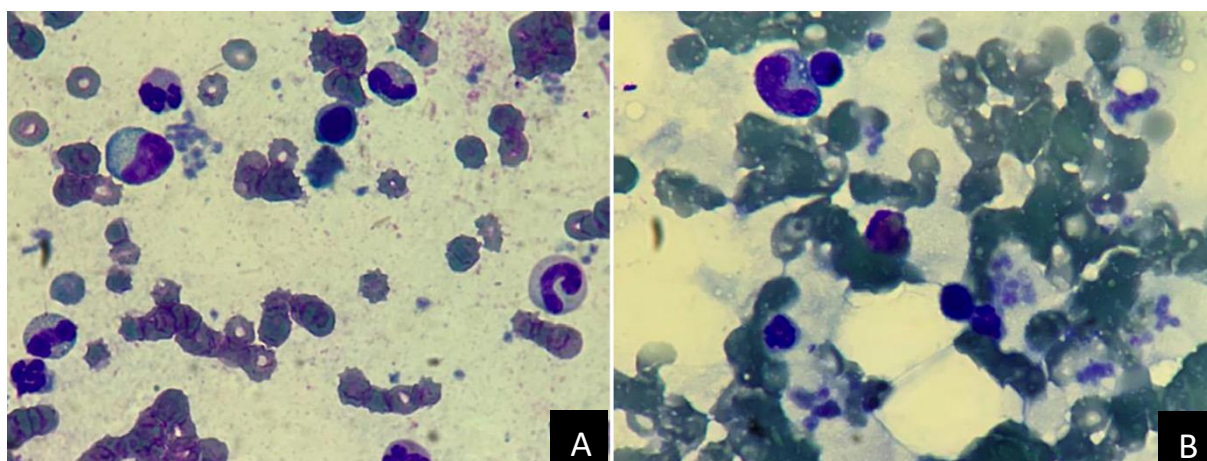
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Após o início do tratamento com CTM o animal apresentou uma melhora dos parâmetros sanguíneos conforme demonstrado na Tabela 1, mas pela necessidade de realizar as transfusões semanalmente os dados podem estar alterados. Sendo comprovada a melhora do animal pelo espaçamento entre os dias das transfusões, de uma vez por semana para a cada três semanas, e a através da comparação do mielograma antes e após o tratamento (imagem 1), que demonstra a resposta da medula óssea ao tratamento.

Tabela 1: hemograma completo antes, durante e depois da terapia com CTM.

Exames	Antes das aplicações	21 dias após a 1ª aplicação	21 dias após a 2ª aplicação	21 dias após a 3ª aplicação	Valor de referência
Hemácias	2,07	3,3	3,72	4,23	5,5 a 8,5 $\mu^3$
Hematocrito	18,6	21,4	24	28,3	37 a 55 %
Leucócitos	18.300	9.100	16.300	8.500	6000 a 17000 $\text{mm}^3$
Plaquetas	484.000	311.000	186.000	216.000	150000 a 500000 $\text{mm}^3$

Imagem 1: Mielograma antes (A) e após (B) o tratamento.



Na imagem 1 A: a medula apresentava hiperplasia mielóide discreta, hipoplasia eritróide severa e não sendo possível avaliar a linhagem megacariocítica. B: a medula apresentava as linhagens mielóide e megacariocítica normais, e hipoplasia discreta da linhagem eritróide.

Segundo Xu et al. (2018) o tratamento de CTM é uma alternativa para melhorar a recuperação hematopoiética. A CTM produzem fatores de crescimento, citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas que atuam na proteção (inibindo a destruição das células do tecido hematopoiético), inibe a produção de citocinas inflamatórias, estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias e estimula a multiplicação das células tronco hematopoiéticas (AQMASHEH *et al.*, 2017).

## CONCLUSÃO

Concluimos que com o tratamento nesse animal a terapia com CTM auxiliou a recuperação da medula óssea do animal, conforme demonstrado nos exames de sangue e mielograma. Ainda, foi possível dar maior qualidade de vida ao animal, visto que foi possível dar maior espaçamento entre as transfusões sanguíneas.

Estudos randomizados, controlados e multicêntricos são necessários para desenvolver protocolos robustos que validam a terapia celular.

## REFERÊNCIAS

AQMASHEH, Sara; SHAMSASANJAN, Karin; AKBARZADEHLEH, Parvin; SARVAR, Davod Passoutan; TIMARI, Hamze. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 2, p. 165-177, jun. 2017.

COSTA, Jamilly Nunes Ramos; GOMES, Ana Amélia Domingues; SANTOS, Cássia Regina Oliveira; MOROZ, Ludmila Rodrigues. Aplasia de medula óssea em cães – Revisão de Literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Ed. 49, v. 3, p. 66-73. 2019.

MALARD, Patrícia Furtado; BRUNEL, Hilana dos Santos Sena; SILVA, Paulo Henrique Sampaio; SILVA, Cecília Ferreira Amaral; CURY, Lara Regina Pontes; VIANNA, André Rodrigues da Cunha Barreto. Effect of adipose-derived osteogenic mesenchymal stem cells on severe osteoarthritis lameness in dogs. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 9, p. 898-903. 2019. MONTEIRO, Betânia Souza et al. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 238-245, set. 2010.

NAUTA, Alma J.; FIBBE, Willem E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **BLOOD**, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, nov. 2007.

XU, Song; VEIRMAN, Kim; BECKER, Ann; VANDERKERKEN, Karin; RIET, Ivan Van. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target?. **Leukemia**, v. 32, n. 7, p. 1500–1514, jul. 2018.