

Avaliação acerca da segurança e eficácia terapêutica das células progenitoras adultas multipotentes no tratamento da bronquite canina

Evaluation of the safety and therapeutic efficacy of multipotent adult progenitor cells in the treatment of canine bronchitis

Evaluación de la seguridad y eficacia terapéutica de células progenitoras adultas multipotentes en el tratamiento de la bronquitis canina

Recebido: 18/04/2023 | Revisado: 20/03/2024 | Aceitado: 29/04/2024 | Publicado: 30/04/2024

Enrico Jardim Clemente Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0869-3342>

CELLTROVET, Brasil

E-mail: enrico@celltrovet.com.br

Angela Mazzeo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8483-5002>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: amazzeo@usp.br

Camila Landim Braga

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6582-4567>

Hospital Veterinário Síriuz, Brasil

E-mail: nefrologiageriatria@gmail.com

Resumo

A bronquite crônica canina é uma doença que se caracteriza por apresentar um quadro de inflamação crônica das vias aéreas, hipersecreção de muco e tosse crônica perdurando por períodos superiores a 2 meses de duração. Entretanto, as abordagens terapêuticas atuais vêm se mostrando pouco eficazes quanto a prevenção ou reversão de todos os aspectos patológicos da doença. Sendo assim, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que se apresentem seguras e eficazes, são de fundamental importância no tratamento de pacientes acometidos pela bronquite crônica canina. A terapia com células-tronco vem se apresentando ao mercado veterinário como uma opção terapêutica segura e eficaz no tratamento de diferentes doenças que acometem os pequenos e grandes animais. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo analisar a segurança e eficácia do tratamento da bronquite crônica canina, por meio do transplante com células-tronco.

Palavras-chave: Células-tronco; Bronquite canina; Terapia celular; Segurança terapêutica; Eficácia terapêutica.

Abstract

Canine chronic bronchitis is a disease that is characterized by chronic inflammation of the airways, mucus hypersecretion and chronic cough lasting for periods longer than 2 months. However, current therapeutic approaches have been proving to be ineffective in preventing or reversing all the pathological aspects of the disease. Therefore, the development of new therapeutic approaches that are safe and effective are of fundamental importance in the treatment of patients affected by canine chronic bronchitis. Stem cell therapy has been presented to the veterinary market as a safe and effective therapeutic option in the treatment of different diseases that affect small and large animals. Thus, the present study aims to analyze the safety and efficacy of the treatment of canine chronic bronchitis, through stem cell transplantation.

Keywords: Stem cells; Canine bronchitis; Cell therapy; Therapeutic safety; Therapeutic effectiveness.

Resumen

La bronquitis crónica canina es una enfermedad que se caracteriza por inflamación crónica de las vías respiratorias, hipersecreción de moco y tos crónica con una duración superior a los 2 meses. Sin embargo, los enfoques terapéuticos actuales han demostrado ser ineficaces para prevenir o revertir todos los aspectos patológicos de la enfermedad. Por ello, el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos que sean seguros y efectivos son de fundamental importancia en el tratamiento de los pacientes afectados por bronquitis crónica canina. La terapia con células madre se ha presentado al mercado veterinario como una opción terapéutica segura y eficaz en el tratamiento de diferentes enfermedades que afectan a pequeños y grandes animales. Así, el presente estudio tiene como objetivo analizar la seguridad y eficacia del tratamiento de la bronquitis crónica canina, a través del trasplante de células madre.

Palabras clave: Células madre; Bronquitis canina; Terapia celular; Seguridad terapéutica; Eficacia terapéutica.

1. Introdução

Com o constante avanço tecnológico voltado para a medicina veterinária os animais, sejam de companhia ou produção, vêm tendo sua expectativa de vida elevada significativamente. Como resultado tem se observado um aumento de doenças até então de baixa incidência ou até o momento inexistentes. Quando se avalia a comunidade de cães e gatos observa-se que as mesmas têm aumentado significativamente nos últimos anos. Segundo o censo do IPB (Instituto Pet Brasil) realizado em 2021, o Brasil é o terceiro país em número de animais domésticos com aproximadamente 149,6 milhões de animais, ficando atrás apenas da Argentina e do México. Segundo a consultoria alemã GFK a preferência da população nacional é por cachorros uma vez que 58% das casas têm cães, 28% têm gatos, 7% têm peixes e 11% têm aves (FOBES).

A bronquite crônica canina (CCB) é uma doença que se caracteriza por apresentar um quadro de inflamação crônica das vias aéreas, hipersecreção de muco e tosse crônica perdurando por períodos superiores a 2 meses de duração. Sua etiologia está associada a causas alérgicas e/ou infecciosas dentre as quais as mais relevantes são a fumaça de cigarro, poluição atmosférica e infecção (Rozansky, 2014). Na CCB, a neutrofilia, o edema da mucosa e a perda de células epiteliais ciliares contribuem para o estreitamento das vias aéreas, alterações na mecânica pulmonar e uma depuração mucociliar ineficiente de patógenos e partículas das vias aéreas. Portanto, estas alterações estruturais tendem a predispor os pacientes a complicações respiratórias com potencial de levar o paciente a óbito (McKiernan, 2000).

Embora a tosse seja a principal queixa dos tutores, é importante que o tratamento tenha como foco principal a inflamação subjacente uma vez que esta não só perpetua a tosse, mas também leva a alterações estruturais que podem ser permanentes, levando a uma diminuição da função pulmonar ao longo do tempo. O tratamento padrão para CCB envolve a administração de corticosteroides ao longo da vida do paciente embora sejam contraindicados para cães com comorbidades com diabetes mellitus e doenças cardíacas. A utilização de supressores de tosse isoladamente não é uma abordagem terapêutica adequada, pois tendem a diminuir os sinais clínicos sem diminuir a inflamação das vias aéreas, permitindo assim a progressão da doença (McKiernan, 2000).

As células progenitoras adultas multipotentes (CPAMs), também conhecidas na literatura científica como células-tronco mesenquimais, encontram-se em estágio de quiescência nos tecidos, sendo responsáveis por assegurar a homeostase tecidual durante o transcorrer da vida dos animais. As CPAMs se caracterizam por serem células indiferenciadas, fusiformes, longas, achatadas e morfologia fibroblastóide que possuem a habilidade de se aderir a superfícies poliméricas além de apresentar elevado potencial de proliferação celular e capacidade de se diferenciar em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênicas (Mazzeo, 2019). Devido ao seu potencial de expansão *in vitro* e manutenção de suas propriedades imunomodulatórias, parácrinas e de diferenciação, mesmo após longos períodos de criopreservação, as CPAMs surgem como uma opção para o desenvolvimento de estudos *in vitro* e *in vivo*.

Na medicina veterinária a terapia com células-tronco vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de diversas condições clínicas que acometem tanto os pequenos como grandes animais (Santos, 2023). Dentre estas temos a seqüela neurológica de cinomose (Santos, 2019), gengivite estomatite felina (Assis, 2017), lesões inflamatórias intestinais (Cristóbal, 2021), lesões oculares (Villatoro, 2015), lesões dermatológicas (Villatoro, 2018), lesões tendíneas (Smith, 2005), laminite (Mendes, 2021), osteoartrites (Black, 2007), trauma medular (Mukhamedshina, 2019), hipoplasia medular (Gatti, 2014), doença renal (Santos, 2020) e aplasia medular (Braga, 2020). Com base nestes estudos inúmeras empresas têm disponibilizado ao mercado veterinária esta nova abordagem terapêutica dentre as quais temos a VetStem (Estados Unidos da América), Stem Cell Vet (Inglaterra), Vetherapy (Portugal) e CELLTROVET (Brasil). Portanto, a terapia com células-tronco já é uma realidade no mercado veterinário mundial.

O objetivo deste estudo é determinar a possível segurança e eficácia terapêutica das CPAMs alogênicas, derivadas de tecido adiposo de cães, visando melhoria na qualidade de vida dos pacientes acometidos por um quadro de bronquite crônica canina.

2. Metodologia

Seleção de animais doadores de tecido adiposo

Os 5 animais doadores de tecido adiposo foram selecionados a partir de populações de pacientes de clínicas veterinárias da cidade de São Paulo, mediante o consentimento livre e esclarecido por parte dos tutores. As CPAMs utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de animais jovens, saudáveis e com até seis meses de vida.

Seleção de animais para o estudo

Foram submetidos ao estudo piloto 8 cães (dois Poodle, um Lulu da Pomerânia, três Yorkshire Terrier, um Chihuahua e um Piquinês), sendo cinco machos intactos e três fêmeas intactas, com idades variando de 7 anos e 6 meses a 12 anos e 4 meses, pesando de 2 Kg a 5 Kg, acometidos pela bronquite crônica canina (Tabela 1). Os pacientes para pré-tratamento foram avaliados por meio do perfil hepático (ALT e FA); função renal (ureia, creatinina, albumina, sódio, potássio e cálcio); eritrograma, leucograma, radiografia torácica e ultrassonografia abdominal. Clinicamente os pacientes foram analisados quanto aos sintomas de tosse moderada a intensa, cianose, dispneia expiratória, hipersecreção ou secreção mucopurulenta, colapso traqueal, sibilos expiratórios, obesidade, exaustão e intolerância ao exercício. Pacientes acometidos por neoplasma, quadro infeccioso, hipertensão ou hipotensão foram excluídos do estudo.

Tabela 1 - Os cães foram identificados no texto como cão e seus respectivos números. A tabela apresenta a característica de raça, sexo, idade (A = anos e M = meses) e peso.

	CÃO 1	CÃO 2	CÃO 3	CÃO 4	CÃO 5	CÃO 6	CÃO 7	CÃO 8
RAÇA	Poodle	Poodle	Lulu da Pomerânia	Yorkshire Terrier	Yorkshire Terrier	Yorkshire Terrier	Chihuahua	Piquinês
SEXO	Fêmea	Macho	Macho	Fêmea	Macho	Macho	Macho	Fêmea
IDADE	8 A 7 M	12 A 1 M	7A 6 M	10 A 2 M	8 A 3 M	12 A 4 M	11 A 1 M	13 A 7 M
PESO	5,2 kg	5,3 kg	3,2 kg	4,9 kg	5,2 kg	5,1 kg	2,8 kg	5,7 kg

Fonte: A autoria própria.

Análise Molecular

Foi coletada uma amostra de sangue para a análise da presença de herpes vírus canino (HVC), vírus da cinomose (CDV), *Ehrlichia canis* (ECA), *Babesia* spp. (BAB), *Hepatozoon* spp. (HEP), *Anaplasma platys* (ANP), *Bartonella* spp. (BAR), *Brucella* spp. (BRU), *Borrelia burgdorferi* (BBU), *Rickettsia* spp. (RIC), *Leishmaniose* spp (LEI) e *mycoplasma* spp (MYC). através da amplificação de fragmentos dos respectivos genomas pelo método da reação em cadeia de polimerase (PCR) em materiais extraídos (RNA e DNA). Os RNAs foram extraídos com Trizol (Invitrogen) e utilizados para síntese de cDNA através de transcrição reversa com superscript II (Invitrogen). Os DNAs foram extraídos utilizando-se o DNazol (Invitrogen). Reações positivas apresentam fragmentos de DNA de 136 pb (HVC), 287 pb (CDV), 959 pb (ECA), pb (HEP), 551 pb (BAB), 574 pb (HEP), 504 pb (ANP), 379 pb (BAR), 280 pb (BRU), 262 pb (BBU), 549 pb (RIC), 120 pb (LEI) e 595 pb (MYC) (Tabela 2). Foram submetidas a cada pesquisa duas amostras extraídas, controles positivo e negativo.

Tabela 2 - Primeres utilizados para amplificar fragmentos das regiões alvo do herpes vírus canino (HVC), vírus da cinomose (CDV), *Ehrlichia canis* (ECA), *Babesia* spp. (BAB), *Hepatozoon* spp. (HEP), *Anaplasma platys* (ANP), *Bartonella* spp. (BAR), *Brucella* spp. (BRU), *Borrelia burgdorferi* (BBU), *Rickettsia* spp. (RIC), *Leishmaniose* spp. (LEI) e *mycoplasma* spp. (MYC).

	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	FRAGMENTO APLICADO	REGIÃO ALVO
HVC	5' - ACAGAGGTTGATAGAAGAGGTATG - 3'	5' - CTGGTGTATTAACCTTTGAAGGCTTTA - 3'	136 pb	Glicoproteína B
CVD	5' - ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT - 3'	5' - CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC - 3'	287 pb	Nucleoproteína
ECA	5' - CATTATCATTCAATACGTAATC - 3'	5' - TTTGATTTTCTCTGACATAGTG - 3'	959 pb	16S rRNA
BAB	5' - CCGTGCTAATTGTAGGCTAATACA - 3'	5' - GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG - 3'	551 pb	18S rRNA
HEP	5' - GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC - 3'	5' - ACAATAAAGTAAAAACAAYTCAAAG - 3'	574 pb	18S Sma
ANP	5' - AAGTCGAACGGATTTTTGTC - 3'	5' - CTCTCCCGACTCTAGTC - 3'	504 pb	16S rRNA
BAR	5' - GGGGACCAAGCTCATGGGG - 3'	5' - AATGCAAAAAGAACAGTAAACA - 3'	379 pb	<i>gltA</i>
BRU	5' - GTCGGGATTCTACTCACT - 3'	5' - TAAGCAGTAAGAGGCAATTT - 3'	280 pb	<i>virB2</i>
BBU	5' - CCCACCCAATTATACTAGC - 3'	5' - GTCGGGTCACAAACATTAAG - 3'	262 pb	<i>flgE</i>
RIC	5' - CAGGGTCTTCGTGCAATTTCTT - 3'	5' - GCTCTTCTCATCTATGGCTATTAT - 3'	549 pb	<i>gltA</i>
LEI	5' - GTG GGG GAG GGG CGT TCT - 3'	5' - ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT - 3'	120 pb	Minicírculo do Cinetoplasto
MYC	5' - ATGTTGCTTAATTCGATAATACACGAAA - 3'	5' - ACRGGATTACTAGTGATCCAACTTCAA - 3'	595 pb	16S do rRNA

Fonte: Autoria própria.

Isolamento e caracterização das CPAMs-TAC

O tecido adiposo obtido no momento da castração foi encaminhado para o Laboratório da CELLTROVET onde foi lavado em PBS 1x (phosphate buffered saline) de forma a 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-Aldrich®). Foi adicionado 5 mL de meio basal, sendo o sobrenadante retirado e centrifugado durante 5 minutos a 200xg. O precipitado foi suspenso 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, quando o mesmo foi trocado. Os repiques subsequentes foram feitos por meio de ação enzimática utilizando 0,025% de tripsina (Invitrogen®). As CPAMs foram divididas em alíquotas de 2x10⁶, suspensas em meio de congelamento (10% de DMSO, 70% de soro fetal bovino e 20% de meio basal) e armazenadas em nitrogênio líquido. As CPAMs foram administradas com menos de 1 ano de armazenamento. Para serem aplicadas nos cães, as células foram descongeladas e o meio de criopreservação removido (Santos, 2020).

Para a análise proliferativa foi isolada uma colônia das CPAMs-TAC expandida até atingir uma confluência de 70% em uma placa 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. Após 48 horas de cultivo, as células foram removidas e replaqueadas. O processo foi repetido até a 12ª passagem. A viabilidade celular foi determinada por meio da análise de azul de Tripán, evidenciando uma taxa de 96% de células viáveis (Santos, 2020).

O potencial osteogênico das CPAMs-TAC foi demonstrado por meio da coloração de *Von Kossa*, após as células terem sido mantidas em cultura durante 21 dias em presença do meio de diferenciação osteogênico ((Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose, Invitrogen®), 1% de 10⁻⁵ M de dexametasona (Sigma-Aldrich®), 1% 5 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®), 10% de soro fetal bovino (HyClone™) e 1% de Penicillin-Streptomycin (penicilina G 10.000 UI/mL, estreptomicina 10.000 µg/mL, Invitrogen®)). A troca do meio foi realizada a cada 3 ou 4 dias. No 10º dia foi adicionado 1% de 200 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich®)(Santos, 2020).

Para a análise do potencial de diferenciação adipogênica as CPAMs-TAC foram cultivadas em meio de diferenciação adipogênica ((Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose, Invitrogen®), 10% de soro fetal bovino (HyClone™), 1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich®), 100 mM de endomentacina (Sigma-Aldrich®), 0,5 M de isobutilmetilxantina (Sigma-Aldrich®) + 10 µM de insulina (Sigma-Aldrich®) e 1% de PenicillinStreptomycin (penicilina G 10.000 UI/mL,

estreptomicina 10.000 µg/mL, Invitrogen®)), durante 21 dias. A marcação foi realizada por meio por *Oil Red O* (Sigma-Aldrich®)(Santos, 2020).

O potencial de diferenciação condrogênico foi demonstrado por meio da marcação por azul de toluidina (Sigma-Aldrich®) após as CPAMs-TAC terem sido cultivadas durante 21 dias em presença do meio de diferenciação condrogênica ((Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose, Invitrogen®) suplementado com 1% de soro fetal bovino (HyClone™), 6,25 mM de insulina (Sigma-Aldrich®), 0,1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich®), 1 mM de piruvato de sódio (Invitrogen®), 10 ng/mL TGF-β1 (R&D System, LGC Biotechnology) e 1% de PenicillinStreptomycin (penicilina G 10.000 UI/mL, estreptomicina 10.000 µg/mL, Invitrogen®))(Santos, 2020).

Transplante das CPAMs-TAC

Os pacientes foram submetidos a três transplantes com as CPAMs-TAC com intervalo médio de 30 dias entre cada procedimento. Foi utilizada a dose de 4×10^6 CPAMs-TAC. As CPAMs-TAC foram descongeladas em banho maria à 37°C por 2 minutos e transferidas para um tubo polietileno de 15 ml sendo acrescentada solução fisiológica na proporção de 1:1. O concentrado celular foi homogeneizado e centrifugado a 210xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado adicionando-se 3 ml de solução fisiológica. O precipitado celular foi ressuspensão e homogeneizado sendo posteriormente centrifugado a 210xg por 5 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Em seguida as CPAMs-TAC foram ressuspensas em 5 ml de solução fisiológica e homogeneizadas para serem posteriormente transplantadas pela via endovenosa (veia cefálica) sem sedação. Análise da viabilidade das CPAMs-TAC, após o descongelamento, foi realizada por meio da coloração com *Triplan Blue*, apresentando valor superior a 90% de viabilidade.

Monitoramento dos animais submetidos ao transplante células com a linhagem CPAMs-TAC

Os cães tratados no presente estudo foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais estando os pacientes vacinados e vermifugados. Os exames foram realizados nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 além de 180 dias após o terceiro transplante. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da CELLTROVET sob o número 4/2022.

Análise da Eosinofilia

Após jejum noturno, seis mililitros de sangue foram coletados por punção venosa (veia jugular), sendo transferidos para tubos séricos de heparina sódica. O sangue foi deixado coagular por pelo menos 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 1.720xg por 20 minutos. O soro foi colhido e as alíquotas armazenadas a -20°C. A eosinofilia foi avaliada nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 além de 180 dias após o terceiro transplante. As amostras foram coradas de Wright e submetidas a contagem.

3. Resultados e Discussão

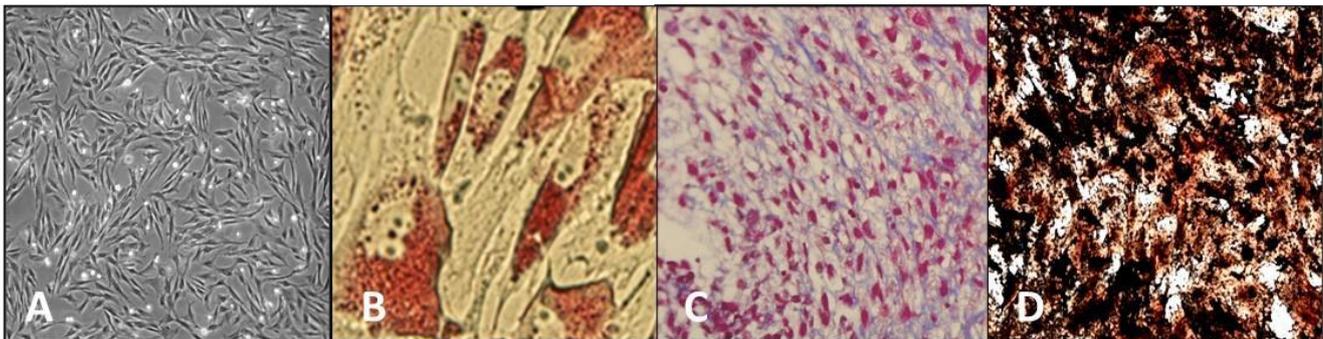
A terapia celular com células-tronco vem se mostrando, por meio de seus mecanismos de ação, extremamente promissora no tratamento de diversas doenças que acometem os cães como cinomose (Santos et al., 2019), displasia coxofemoral (Black et al., 2007), ceratoconjuntivite seca (Wei et al., 2022), doença renal (Santos et al., 2020) e aplasia medular (Gatti et al., 2014). O potencial reparativo das CPAMs-TAC permite que, uma vez introduzidas no organismo, adquiram a morfologia e funcionalidade de qualquer tipo celular possibilitando a restauração de tecido lesionado resultando na cura ou melhoria da qualidade de vida do paciente.

Embora os mecanismos envolvidos nos processos de atuação das CPAMs ainda não tenham sido completamente compreendidos, sabe-se que atuam modificando o microambiente por meio da secreção de fatores parácrinos e/ou endócrinos.

Estes potencializam os processos de reparação tecidual, por meio de sua capacidade proliferativa, plasticidade, sinalização celular, produção de biomoléculas, fatores de crescimento e imunomoduladores. (Fu et al., 2019).

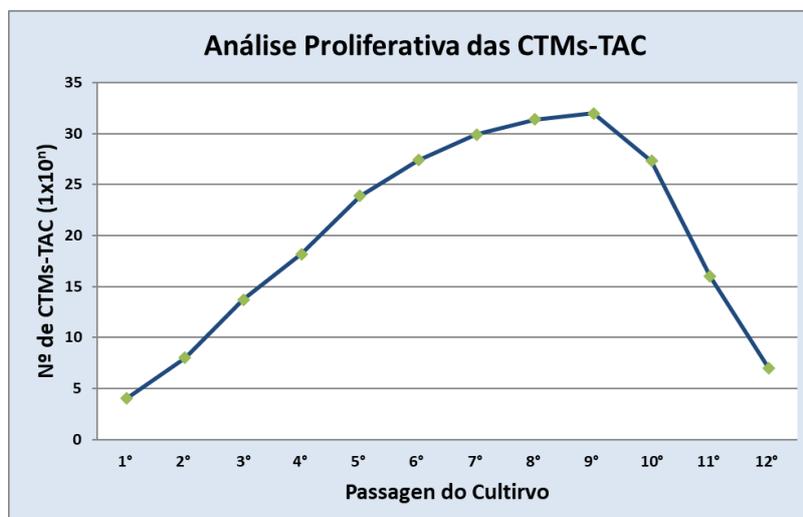
No presente estudo, as CPAMs-TAC foram isoladas a partir do tecido adiposo de cinco cães jovens e saudáveis estabelecendo-se cinco linhagens distintas as quais foram denominadas de CPAMs-TAC1, CPAMs-TAC2, CPAMs-TAC3, CPAMs-TAC4 e CPAMs-TAC5. As CPAMs-TAC foram caracterizadas com base em sua capacidade de adesão ao plástico, morfologia fibroblastoide (Figura 1A), capacidade de diferenciação adipogênica (Figura 1B), condrogênica (Figura 1C) e osteogênica (Figura 1D) além de alto potencial de proliferação celular (Figura 2). Foi observado um crescimento exponencial até a 9ª passagem, após a qual identificou-se um decaimento na curva de crescimento. Quando injetadas em camundongos nude, as cinco linhagens não foram capazes de induzir a geração de teratocarcinomas. Os dados obtidos demonstraram que as cinco linhagens apresentaram potencial equivalente. Por se tratar de um tratamento alogênico, os animais doadores foram testados quanto a reações positivas para fragmentos de DNA de 136 pb (HVC), 287 pb (CDV), 959 pb (ECA), pb (HEP), 551 pb (BAB), 574 pb (HEP), 504 pb (ANP), 379 pb (BAR), 280 pb (BRU), 262 pb (BBU), 549 pb (RIC), 120 pb (LEI) e 595 pb (MYC), não tendo sido detectada a presença dos patógenos. Desta forma, evita-se a possível transmissão dos mesmos aos animais receptores (Santos et al., 2020).

Figura 1 – Aspecto morfológico fibroblastoide (A) das células-tronco isoladas a partir do tecido adiposo de cão (CPAMs-TAC). Imagens representativas das diferenciações adipogênica (B), condrogênica (C) e osteogênica (D) das CPAMs-TAF. Objetivas 1x (A), 40x (B) e 20x (C, D).



Fonte: Autoria própria.

Figura 2 - Gráfico representativo da análise proliferativa das CPAMs-TAC. O crescimento das células foi analisado em um intervalo de 72 horas entre os repiques realizados por meio de ação enzimática.



Fonte: Autoria própria.

A utilização terapêutica das CPAMs no tratamento da bronquite, vem sendo extensamente estudada em modelos murinos estando constantemente associada ao processo de reparação das células epiteliais e das vias aéreas. As CPAMs atuam de forma a reduzir a perda epitelial, diminuir a taxa de apoptose epitelial, reduzir a deposição de colágenos nas paredes do tecido e promover tolerância imune por meio do processo de proliferação de células T reguladoras (Tregs) e secreção de citocinas reguladoras (Zheng, 2017; Işık, 2017; Lin, 2021).

Os pacientes selecionados para o estudo foram analisados clinicamente quanto aos sintomas de tosse moderada a intensa, cianose, dispneia expiratória, hipersecreção ou secreção mucopurulenta, colapso traqueal, sibilos expiratórios, obesidade, exaustão e intolerância ao exercício. Pacientes acometidos por neoplasma, quadro infeccioso, hipertensão ou hipotensão foram excluídos do estudo.

No início do estudo os oito cães apresentavam índices bioquímicos dentro da normalidade, um quadro de sobrepeso, intolerância ao exercício, apatia, ausculta torácica anormal, tosse intensa, dispneia e sibilos expiratórios, hipersecreção e eosinofilia grave (11.201 - 12.999/ μ L; referência: 100- 1.250/ μ L), com o lavado broncoalveolar apresentando inflamação neutrófica e eosinofílica. Por meio da análise das radiografias de tórax foi possível identificar padrões brônquicos com detecção de manguito peribrônquico. Estes dados demonstram que os oito pacientes estavam sendo acometidos por um quadro de bronquite.

A linhagem CPAMs-TAC1 foi transplantada pela via endovenosa, por meio da veia cefálica, nos oito pacientes de forma a testar sua segurança e eficácia terapêutica. Os transplantes foram realizados nos dias 0, 30 e 60 seguido de acompanhamento quinzenal dos pacientes.

A via endovenosa se caracteriza por ser de fácil execução, pouco invasiva, com elevada taxa de sobrevivência das células transplantadas e menos traumática, permitindo repetidas aplicações com mínimos efeitos colaterais (Santos, 2017). As CPAMs-TAC1 foram administradas em baixas concentrações e lentamente, uma vez que estudos sugerem a possível geração de tromboembolismo pulmonar ou infartos, quando uma elevada concentração celular é administrada rapidamente pela via endovenosa (Prockop & Olson, 2007; Moll et al., 2012).

Não foram identificados efeitos adversos as infusões das CPAMs-TAC1 como náusea, vômito e alteração da pressão arterial, demonstrando que o transplante foi bem tolerado pelos oito cães. O acompanhamento dos pacientes não revelou a

ocorrência de qualquer tipo de patologia associada à formação de tecido anormal. Estudos anteriores comprovaram que os transplantes das CPAMs alogênicas têm se mostrado seguros com relação a rejeições, não requerendo a utilização de drogas imunossupressoras (Gatti et al., 2017; Santos et al., 2019; Santos et al., 2020).

A primeira análise dos pacientes foi realizada 15 dias após o primeiro transplante das CPAMs. A avaliação clínica demonstrou que todos os animais apresentaram uma melhora no apetite, maior disposição e redução significativa do quadro de tosse e secreção de muco. Na avaliação realizada no dia 30, data do segundo transplante das CPAMs-TAC1 os cães 1, 3 e 5 apresentavam um quadro de melhora no apetite, maior disposição, redução de peso, melhora significativa da tosse e ausência de secreção de muco além de uma melhora significativa nos índices de eosinofilia sendo classificada como moderada (3.123 - 3.786/ μ L). Os cães 2, 4, 6, 7 apresentavam melhora do apetite, maior disposição, redução de peso, melhora significativa da tosse e da secreção de muco além de uma melhora significativa nos índices de eosinofilia, estando os valores próximos aos classificados como moderados (5.325 - 5.742/ μ L). O cão 8 ainda apresentava melhora do apetite, maior disposição, redução do peso e melhora da tosse e secreção de muco. Embora os valores tenham sido reduzidos o paciente ainda apresentava um quadro de eosinofilia grave (8.243 - 8.789/ μ L).

Na análise realizada 15 dias após o segundo transplante de CPAMs-TAC1 os cães 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 apresentavam um quadro de normalização do apetite, disposição a exercícios físicos, peso dentro dos valores de referência para a raça e ausência de tosse e secreção de muco além de uma melhora significativa nos índices de eosinofilia, estando os valores próximos aos valores de referência (1.100- 1.450/ μ L). O cão 8 apresentava um apetite normal, maior disposição, peso dentro dos valores de referência para a raça e tosse e secreção de muco esporádicos. Embora os valores tenham sido reduzidos o paciente ainda apresentava um quadro de eosinofilia moderada (1.957 - 2.198/ μ L).

Na avaliação realizada no dia 60, data do terceiro transplante de CPAMs-TAC os cães 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentavam normalização do apetite, disposição a exercícios físicos, peso dentro dos valores de referência para a raça e ausência de tosse e secreção de muco, valores bioquímicos dentro da normalidade e índices de eosinofilia dentro dos valores de referência (100- 1.250/ μ L).

Transcorridos 180 dias após a terceira aplicação, os oito cães foram reavaliados clínica e laboratorialmente sendo que nenhum dos pacientes apresentou recidiva do quadro de bronquite crônica canina.

4. Conclusão

Os dados obtidos no presente estudo, por meio do transplante de CPAMs alogênicas, provenientes do tecido adiposo de cão, demonstraram a segurança e eficácia terapêutica das CPAMs no tratamento de cães acometidos pelo quadro de bronquite crônica canina. O estudo sugere que a ação das CPAMs resultou em um processo de reparação das células epiteliais e das vias aéreas provavelmente devido a uma redução da perda epitelial, diminuição da taxa de deposição de colágenos nas paredes do tecido e secreção de citocinas reguladoras. Embora os dados clínicos demonstrem ausência de recidiva o acompanhamento periódico dos pacientes é recomendado.

Referências

- Assis, T. L. S., Winck, C. P. & Santos, E. J. C. (2017). Análise da Viabilidade Terapêutica das Células-Tronco Mesenquimais Alogênicas no Tratamento de Felino Acometido por Complexo Gengivite Estomatite Felina. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. 2(1), 470-482.
- Black, L. L., Gaynor, J., Gahring, D., Adams, C., Aron, D., Harman, S., Gingerich, D. A. & Harman, R. (2007). 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. *Vet Ther. Winter*; 8(4), 272-84.
- Braga, C. L. & Santos, E. J. C. (2020). *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*. 50 (4), 126-132.
- Cristóbal JI, Duque FJ, Usón-Casaús JM, Ruiz P, Nieto EL & Pérez-Merino EM (2021). Effects of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs with Inflammatory Bowel Disease Treated with and without Corticosteroids. *Animals (Basel)*. 11(7):2061.

- Işık, S., Uzuner, N., Karaman, M., Karaman, Ö., Kıray, M., Kozanoğlu, İ., Alper Bağrıyanık, H., Arkan-Ayyıldız, Z., Kartal Yandım, M., & Baran, Y. (2017). Effects of Intraperitoneal Injection of Allogeneic Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells on Bronchiolitis Obliterans in Mice Model. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 16(3), 205–218.
- Leia mais em: <https://forbes.com.br/forbes-money/2022/10/brasil-e-o-terceiro-pais-com-mais-pets-setor-fatura-r-52-bilhoes/>
- Lin, J., Deng, H., Zhang, Y., Zou, L., Fu, Z., & Dai, J. (2021). Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on murine model of bronchiolitis obliterans like injury. *Pediatric pulmonology*, 56(1), 129–137.
- Mazzeo, A. & Santos, E. J. C. (2018). Nanotechnology and multipotent adult progenitor cells in Reparative Medicine: therapeutic perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 16(4):eRB4587.
- McKiernan B. C. (2000). Diagnosis and treatment of canine chronic bronchitis. Twenty years of experience. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 30(6), 1267–vii.
- Rozanski, E.A. Canine chronic bronchitis (2014). *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44(1): 107-116.
- Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., He, J., Huang, L., Chen, P., Wang, W., Xu, Q., Hu, Y., Shu, Q., & Xu, J. (2017). Human adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate obliterative bronchiolitis in a murine model via IDO. *Respiratory research*, 18(1), 119.
- Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q. & Song A.G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*, 8(8), 784.
- Gatti, A., Martins, D. S. & Santos, E. J. S (2014). Cell therapy in the treatment of myeloid aplasia - a case report. *Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação*, 12(41), 296-303.
- Mendes, A. B. S., Silva, A. T. S., Castro, L. L., Silva, K. E. A. & Araripe, M. G. A. (2021). Therapeutic potencial of mesenchymal stem cells in equine laminitis. *Research, Society and Development*. 10 (10): e436101018902.
- Mukhamedshina, Y., Shulman, I., Ogurcov, S., Kostennikov, A., Zakirova, E., Akhmetzyanova, E., Rogozhin, A., Masgutova, G., James, V., Masgutov, R., Lavrov, I., & Rizvanov, A. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Contusion: A Comparative Study on Small and Large Animal Models. *Biomolecules*, 9(12), 811.
- Moll, G., Rasmusson-Duprez, I., Von Bahr, L., Connolly-Andersen, A. M., Elgue, G., Funke, L., Hamad, O. A., Lönnies, H., Magnusson, P. U., Sanchez, J., Teramura, Y., NilssonEkdahl, K., Ringdén, O., Korsgren, O., Nilsson, B. & Le Blanc, K (2012). Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem Cells*, 30(7), 1565-74.
- Prockop, D. J. & Olson, S. D. (2007). Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: Let's not overlook some essential precautions. *Blood*, 109(8), 3147–51.
- Santos, E. J. C., Winck, C. P., Alves, C. A. M. & Fernande, R. A. (2019). Células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento das sequelas neurológicas de cinomose canina. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação*, 3(49), 32-40.
- Santos, E. J. C., Winck, C. P., & Braga, C. L. (2020). Utilização terapêutica das células progenitoras adultas multipotentes alogênicas em cães acometidos pela doença renal. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 13(4), 534–543.
- Santos, E. J. C. (2023). Aplicação terapêutica das células-tronco na medicina veterinária. *Núcleo do Conhecimento*.
- Smith, R. K., & Webbon, P. M. (2005). Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *British journal of sports medicine*, 39(9), 582–584.
- Villatoro, A. J., Fernández, V., Claros, S., Rico-Llanos, G. A., Becerra, J., & Andrades, J. A. (2015). Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *BioMed research international*, 2015, 527926.
- Villatoro, A. J., Hermida-Prieto, M., Fernández, V., Fariñas, F., Alcoholado, C., Rodríguez-García, M. I., Mariñas-Pardo, L., & Becerra, J. (2018). Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *The Veterinary record*, 183(21), 654.
- Wei, L. N., Wu, C. H., Lin, C. T. & Liu, I. H (2022). Topical applications of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate the canine keratoconjunctivitis sicca. *BMC Vet Res*, 18(1), 217.