



USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃO COM HIPOPLASIA MEDULAR – RELATO DE CASO

USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN DOG WITH MEDULAR HYPLOPLASIA- CASE REPORT

Drielle de Sousa Silva¹; Bárbara Souto Dominguez²; Sandra Vogel Seixas³; Michele Milstedt⁴

Resumo

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) são células multipotentes que possuem alta capacidade de produção e diferenciação de diversos tipos celulares e tecidos com origem não hematopoiéticos, como células epiteliais, condroblastos e osteoblastos. As CTMs são imprescindíveis para os processos de reparação tecidual, pois sua capacidade de plasticidade é responsável pela atuação destas em todos os tipos de tecidos no organismo. A hipoplasia medular é uma condição patológica rara que afeta cães e gatos, sendo caracterizada pela baixa produção das linhagens hematopoiéticas. Neste trabalho relata-se o caso de uma fêmea canina da raça Schnauzer, 8 anos, que apresentava histórico de fraqueza, anorexia, apatia e taquipneia. O diagnóstico sugestivo através do mielograma foi hipoplasia das séries mieloide, eritróide e megacariocítica, sem causa definida. A paciente apresentava oscilações entre 9,8% até 25% no hematócrito, não apresentando melhora após realização de transfusões sanguíneas ou tratamento medicamentoso. Foi indicada a terapia celular com infusão de células-tronco mesenquimais, utilizando 10 milhões de CTMs em quatro sessões de aplicação. Após a segunda aplicação apresentou resultados com a significativa melhora dos padrões hematológicos, evidenciado pelo aumento de 32% na contagem final de hematócrito e melhora clínica. A paciente segue em tratamento clínico. Foi observada uma resposta medular indicando um processo de regeneração.

Palavra-chave: Células-tronco. Hipoplasia medular. Terapia celular.

Introdução

A hipoplasia medular afeta cães e gatos, considerada rara nestas espécies, marcada pela baixa produção das linhagens hematopoiéticas, enquanto o termo aplasia é aplicado quando todas as células hematopoiéticas da medula são ausentes (COSTA et al., 2019). Em casos de aplasia medular o tecido hematopoiético da medula óssea é substituído por adipócitos, isto pode levar ao quadro de pancitopenia, observada no sangue periférico, através do hemograma (MINUZZO e DUTRA DA SILVEIRA, 2020). A hipoplasia das três linhagens celulares (eritróide, mieloide e megacariocítica), pode ser classificada em aguda ou crônica, conforme sua evolução (MORAES e TAKAHIRA, 2010).

As células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas no tratamento da hipoplasia medular por conta de suas características imunomoduladoras e imunossupressoras, que tendem a diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (SANTOS, 2017), podendo ser usadas na sua forma

1 Curso de Medicina Veterinária – UTP; drielle.1@icloud.com

2 Curso de Medicina Veterinária – UTP

3 Professora Orientadora - UTP

4 Médica Veterinária



halógena, com baixos riscos de imunorrejeição. As CTMs são extraídas de tecidos adultos em pequenas quantidades, os locais de escolha envolvem a medula óssea, tecido muscular e adiposo, região de perióstio e órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; MAMBELLI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009).

Revisão de Literatura

A ciência biomédica aliada a medicina veterinária segue com avanços na área de pesquisas relacionadas a terapia celular e medicina regenerativa. Com o progresso das pesquisas, a partir da massa celular interna de um blastocisto que foi pré-implantada em um camundongo foram isoladas as primeiras células-tronco embrionárias (NONES, 2008). Na Figura 1 está representado um esquema sobre a obtenção de células-tronco embrionárias a partir da massa interna de um blastocisto.

As células-tronco são uma fonte de multiplicação e diferenciação que podem ser usadas para o tratamento de doenças consideradas incuráveis. No ano de 2001 as células-tronco mesenquimais foram identificadas em tecido adiposo, sendo estas mais amplamente usadas no tratamento clínico dos pacientes. Durante o procedimento cirúrgico, fragmentos de tecido adiposo são coletados na região inguinal de cães e gatos e na base da cauda de equinos (KULUS et al., 2018).

Quando existe uma alta densidade de citocinas pró-inflamatórias (IFN-g e TNF-a), as CTMs são atraídas por este processo criando fatores parácrinos responsivos, tais como as citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento. Isto leva a diminuição da inflamação e uma modulação da resposta imunológica, estimulando a formação de novos vasos sanguíneos, aumentando a multiplicação de células, reduzindo a morte celular e promovendo o auxílio na recuperação das células danificadas (AMORIM e CRUZ JR, 2020).

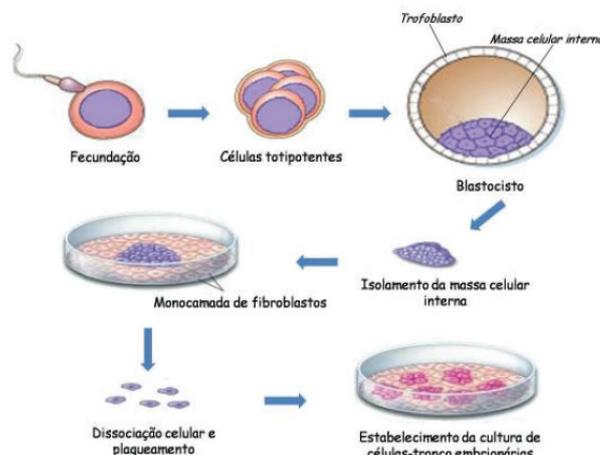


Figura 1: Esquema sobre a obtenção de células-tronco embrionárias a partir da massa celular interna de um blastocisto.

Figura 1 - Obtenção de células-tronco embrionárias
Fonte: Nones, 2008.



Segundo Braga e Santos (2020) as CTMs conseguem regular a resposta imune através do sazonalidade das células dendríticas, atenuando o aumento e atuação das células *natural killer* e dos linfócitos T e B. Quando as CTMs estão presentes em um local lesionado, devido ao expressivo número de moléculas bioativas, adquirem a forma e a aplicabilidade das células danificadas e promovem a restauração do tecido (MURPHY et al., 2013).

O uso de CTMs na medicina veterinária vem apresentando resultados eficazes em diversas patologias como: sequela em animais que tiveram cinomose, osteoartrites, doenças oculares como lesões na córnea, lesões em tendões, traumatismo medular (BRAGA e SANTOS, 2020) e hipoplasia medular (AMORIM e CRUZ JR, 2020).

Um fator altamente relevante que deve ser considerado são as vias de infusões das CTMs, elas deverão ser de fácil acesso, invasão e trauma pequenos, poucos efeitos colaterais e alta taxa de sobrevivência da célula (BRAGA e SANTOS, 2020). A via endovenosa possui um acesso rápido para administração das CTMs, a sua taxa de invasão também é reduzida, levando a efeitos traumáticos mínimos ao paciente (TRZIL et al., 2015; SANTOS, 2017).

A hipoplasia ou aplasia medular pode ser causada por doenças infecciosas ou autoimunes e induzida por medicamentos, essas enfermidades podem causar falha na função da medula óssea, inibindo a produção das células sanguíneas (AMORIM e CRUZ JR, 2020). Com relação a origem infecciosa devemos levar em consideração a *Ehrlichia canis* e parvovírus (MORAES e TAKAHIRA, 2010). Com relação ao uso de medicamentos, aqueles que agem na divisão celular com propriedades anti-inflamatórias esteroidais inibindo a produção de fatores inflamatórios podem ocasionar o quadro de hipoplasia, como por exemplo a prednisona (AMORIM e CRUZ JR, 2020). Outros fármacos amplamente ligados a hipoplasia ou aplasia, são os hormonais: estrógeno, anti-inflamatório não esteroide: fenilbutazona e antibiótico: trimetoprim/sulfadiazina, antiarrítmico: quinidina, antifúngico: griseofulvina, anestésico: Fenotiazina, antibiótico do grupo das cefalosporinas, vasodilatador: captopril e antibiótico: cloranfenicol (MORAES e TAKAHIRA, 2010).

O diagnóstico de hipoplasia medular canina é feito através de uma anamnese detalhada juntamente com as manifestações clínicas e a avaliação dos exames hematológicos do animal, além disso é necessário que o animal faça o mielograma, possibilitando assim a investigação de qualquer anormalidade no sangue (AMORIM e CRUZ JR, 2020).

Uma das manifestações clínicas de hipoplasia medular que está relacionado com anemia é a palidez de mucosas, por outro lado o animal também pode manifestar cansaço, fraqueza e desânimo (COSTA et al., 2019).

O mielograma tem como objetivo avaliar a quantidade de células megacariocíticas, mieloides, eritroides e estimar as reservas de ferro, bem como identificar possíveis alterações morfológicas celulares. A colheita em cães é feita principalmente nos ossos esterno e úmero, podendo eventualmente ser coletado do ílio. Os principais locais de colheita para a realização do mielograma estão apresentados na Figura 2.

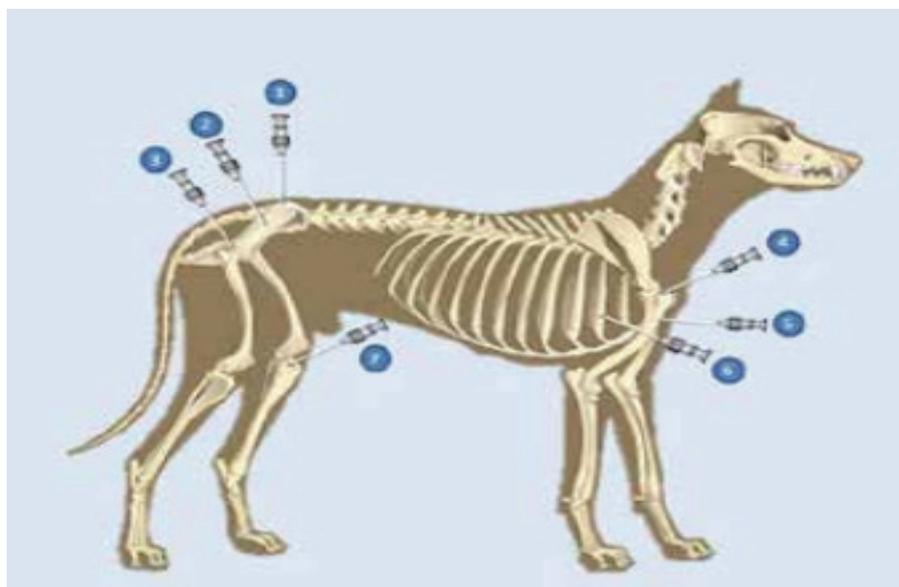


Figura 2- Principais pontos de colheita para realizar mielograma.
Fonte: Costa et al. (2019).

Relato de Caso

Foi atendida na clínica Terapia Celular Vet® em Curitiba – PR, especializada em terapia celular com células-tronco, no dia 10 de março de 2021, uma fêmea canina, Schnauzer de 8 anos, 6.780 kg, não castrada, apresentando histórico de fraqueza, falta de apetite, apatia, taquipneia e, segundo informações dos tutores, a última vacina realizada foi em agosto de 2020. A paciente passou por internamentos prévios em outras clínicas, em janeiro de 2021, com permanência de sete dias e necessidade de tratamento intensivo. Durante esses internamentos foram realizados exames hematológicos nos quais apresentou uma anemia persistente com diminuição do hematócrito, seu valor oscilou de 9,8% a 25,8%, sendo necessário realizar duas transfusões sanguíneas neste período com intervalo de aproximadamente 30 dias. Em acréscimo a isso foi solicitado um mielograma para melhor avaliação do quadro hematológico da paciente, o diagnóstico do exame foi sugestivo de Hipoplasia das Séries Mieloide, Eritroide e Megacariocítica.

Ainda previamente ao tratamento na clínica de terapia celular foi realizada ultrassonografia, que evidenciou esplenomegalia e hepatomegalia, e exames complementares para descartar outras possíveis causas, com resultado negativo (sorologia para leishmaniose). Durante o tratamento anterior ao da clínica de terapia celular, a paciente fazia uso do medicamento eritropoetina com a dosagem de 0,15 mL a cada 48 horas, para estimular a produção dos eritrócitos, porém não houve resposta. Não foi relatado o uso de corticoides e imunomoduladores.

Na clínica atual, foi atribuído o dia zero (D0) como o início de tratamento, durante a avaliação clínica a paciente apresentava-se alerta, com mucosas rosadas e auscultação cardiopulmonar sem



alterações. Foi indicada terapia celular com células-tronco mesenquimais com 10 milhões de CTMs, em quatro infusões com intervalos de 20 a 30 dias. A eritropoetina foi suspensa e iniciou-se o uso de medicamentos imunossupressores em conjunto com a terapia celular, visando o suporte imunológico durante o tratamento. Os medicamentos foram o micofenolato de mofetila iniciado em D9 com dosagem de 70 mg/BID chegando em 45 mg/BID em D86. A prednisona foi iniciada na dosagem de 15 mg/BID em D0 com redução de 25% semanal iniciada em D21. Na última infusão de CTMs a paciente já estava sem o uso da prednisona. Na Figura pode-se observar o detalhamento dos dias de tratamento (D), as infusões de CTMs e os medicamentos usados.

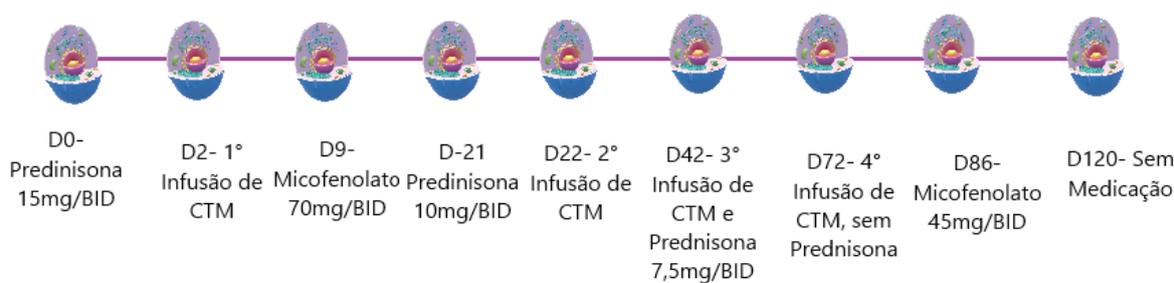


Figura 3. Linha do tempo entre as infusões realizadas e os medicamentos em uso.

A prednisona é um anti-inflamatório esteroidal, da classe dos glicocorticoides, utilizada no tratamento de doenças inflamatórias, dermatológicas, processos alérgicos, doenças autoimunes e neoplásicas. Os glicocorticoides agem inibindo a destruição de glóbulos vermelhos, com a parada da fagocitose e a síntese de imunoglobulinas. Seus efeitos colaterais podem acarretar náuseas e vômitos, retenção de sódio causando edema, neutrofilia, eosinofilia, linfopenia, dentre outros, além disso podem retardar o processo de cicatrização. A administração é feita em doses de 1 a 2 mg/kg/BID (GORENSTEIN et al., 2019).

O segundo fármaco utilizado é o imunossupressor micofenolato de mofetila, eficiente na supressão da proliferação linfocitária e tem ação inibitória sobre a enzima que sintetiza purina, tange a restrição da multiplicação dos linfócitos B e T. É utilizado na terapia de doenças imunomediadas nos animais. É um dos fármacos imunossupressores com alta taxa de sucesso, seu uso pode ser indicado em casos de anemia hemolítica imunomediada, seus efeitos colaterais englobam perda de peso corporal, processo diarreico, aparecimento de papilomas e desenvolvimento de processo alérgico. Este fármaco possui rápida ação e não causa efeito hepatotóxico e mielossupressor. A dosagem recomendada é de 8 a 12 mg/kg/SID (GORENSTEIN et al., 2019).

As células-tronco mesenquimais utilizadas na paciente são originárias do laboratório Biocell®, que possui registro de células-tronco para cães, gatos e equinos, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As pesquisas com CTMs no laboratório iniciaram no ano de 2004.

São os profissionais do laboratório Biocell® que auxiliam aos médicos veterinários com relação ao número de aplicações e de células a serem infundidas no paciente, que depende do



caso e da doença. Segundo o protocolo do laboratório Biocell® em casos de doenças sistêmicas é indicado três infusões de 10 milhões de CTMs, com intervalos de 20 a 30 dias entre as infusões para que se possa avaliar uma resposta da medula óssea. Todavia, a paciente apresentou uma infecção uterina durante o tratamento, sendo necessária a intervenção cirúrgica. A médica veterinária responsável decidiu realizar mais uma aplicação de CTMs (totalizando quatro aplicações), pois com o procedimento cirúrgico poderia ter ocorrido um consumo maior de células pelo organismo.

As CTMs ficam armazenadas em palhetas dentro de um transporte com nitrogênio. Antes de serem infundidas passaram por um processo de descongelamento em banho-maria, centrifugação, lavagem em soro próprio e preparo para infusão.

A primeira infusão foi realizada em D2, sendo orientado jejum de alimentos sólidos por oito horas e hídrico por duas horas antes do procedimento. A infusão foi realizada por acesso veia cefálica com cateter número 24 e foi utilizado equipo gravitacional fotossensível. O concentrado de CTMs após preparo foi adicionado no momento da infusão em solução 50 mL de Ringer com Lactato e o tempo de infusão foi de aproximadamente uma hora. Esse procedimento foi realizado em todas as infusões. Durante a primeira aplicação não houve reação durante e após o procedimento. A segunda infusão foi realizada em D 22 e a paciente apresentou desconforto e êmese durante a aplicação, porém não houve intercorrências. A terceira infusão foi em D 42 e quarta infusão ocorreu D 72, sem intercorrências.

Resultados e Discussão

Após as infusões foram realizados exames hematológicos (hemograma e contagem de reticulócitos). Houve melhora gradativa dos valores hematológicos da série vermelha e da clínica da paciente, evidenciado através do relato dos tutores na melhora da ingestão alimentar e da apatia. A relação dos hemogramas está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Acompanhamento dos hemogramas (eritrograma) de D0 até D70 sob infusões de CTMs.

| Eritrograma | D2 | D22 | D38 | D70 | VALOR DE REFERÊNCIA |
|--|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| Eritrócitos (milhões/mm ³) | 3,44 | 3,6 | 3,88 | 4,53 | 5,5 a 8,5 |
| Hemoglobina (g/dL) | 7,7 | 8,1 | 10,2 | 11,6 | 12,0 a 18,0 |
| Hematócrito (%) | 22 | 23 | 30 | 32 | 37 a 55 |
| V.C.M fL | 63,95 | 63,89 | 77,32 | 70,64 | 60 a 77 |
| H.C.M pg | 22,38 | 22,5 | 26,29 | 25,61 | 19,5 a 24,5 |
| C.H.C.M % | 35 | 35,22 | 34 | 36,25 | 30 a 36 |

Os resultados obtidos e analisados evidenciam que durante a terapia celular com CTMs a paciente iniciou o processo de resposta medular, indicando uma regeneração leve através da contagem de reticulócitos (Tabela 2). Com relação às alterações no leucograma, foi observada linfopenia possivelmente pelo uso da prednisona.

Através da análise da contagem de reticulócitos pode-se observar que entre a terceira e quarta infusão das CTMs a paciente começou a apresentar uma leve regeneração medular, ainda mantendo os valores baixos das séries vermelhas (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito), contudo seus resultados estavam mais próximos aos valores de referência.

As CTMs conseguem se diferenciar em células progenitoras do sangue, porém é provável que a melhora da paciente esteja relacionada com a ação imunomoduladora das CTMs com a liberação das citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (SANTOS, 2017).

Tabela 2. Relação da contagem de reticulócitos entre os dias (D57 e D70)

| EXAME | D 57 | D 70 |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| CONTAGEM DE RETICULÓCITOS | | |
| | RESULTADO | |
| Contagem absoluta mil/mm ³ | 65.380 | 172.140 |
| Índices de reticulócitos | 0,72 | 1,8 |
| Percentual de Reticulócitos | 1,4 | 3,8 |
| Percentual corrigido | 1,08 | 2,7 |
| VALORES DE REFERÊNCIA | | |
| | | |
| Contagem absoluta | Percentual corrigido | Índice de Reticulócitos |
| 60.000/mm ³ = nenhuma regeneração | 1= normal | <1 anemia |
| 150.000/mm ³ = leve regeneração | 1 a 4 = leve estimulação | 1 a 2 eritropoiese moderada |
| 300.000/mm ³ = moderada regeneração | 5 a 20= moderada estimulação | >2 eritropoiese acentuada |
| > 500.000 = marcada regeneração | 21 a 50 = marcada estimulação | >3 regenerativa |

Segundo Malard (2015), no tratamento para paciente com hipoplasia medular eritroide imunomediada, houve oscilação nas quantidades de CTMs aplicadas, variando entre 40 milhões e 60 milhões e administrando-as de forma intramedular. No tratamento dos cães com hipoplasia de medula óssea, Amorim e Cruz Jr (2020) personalizou suas aplicações para cada animal considerando seu peso e gravidade dos casos. Os dois autores utilizaram três aplicações, com intervalos de 30 e 21 dias, respectivamente. Para a paciente do presente relato foram utilizados 10 milhões de CTMs em cada uma das quatro aplicações intravenosas, e os intervalos entre as aplicações foram de 20 a 30 dias.

Outro trabalho realizado por Amorim e Cruz Jr (2020), comprovou a eficácia do tratamento com CTMs, ao ser realizado estudo com seis cães portadores de hipoplasia medular, sendo que em quatro cães a origem era infecciosa, um cão de origem autoimune e um cão de origem medicamentosa, que receberam terapia celular com CTMs. Cinco dos seis animais apresentaram melhora clínica e laboratorial após o tratamento, sem a necessidade de transfusões ou continuidade de medicamentos.

A paciente do presente relato teve seu tratamento de infusão de CTMs encerrado, está estável clinicamente e segue em acompanhamento na clínica.



Conclusão

O presente estudo demonstrou que após as infusões de células tronco mesenquimais, os parâmetros hematológicos da paciente evoluíram crescentemente e iniciou-se um processo de regeneração leve medular. Esses novos estudos e procedimentos estão em constante crescimento na medicina veterinária e são imprescindíveis para a otimização das terapias já existentes.

Referências

AMORIM, V. M.; CRUZ JR, C. A. Terapia celular com células-tronco mesenquimais em animais com hipoplasia de medula óssea. 2020. Brasília, 17f. Relatórios de Pesquisa (Programa de Iniciação Científica) - PIC/UnICEUB.

BRAGA, C.; SANTOS, E. Terapia celular com células tronco no tratamento da aplasia medular secundária a doença renal crônica. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; Edição 50 - Vol IV -2020; 126-132.

COSTA, J.N.R.; GOMES, A. A. D.; SANTOS, C.R.O. et al. Aplasia de medula óssea em cães – Revisão de Literatura. Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; Edição 49 - Vol III - 2019; 66-73.

GORENSTEIN, T.G.; SANTOS, B.; BASSO, R. M. et al. Anemia hemolítica imunomediada primária em cães - revisão de literatura. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 22, n. 2, p. 71-75, abr./jun. 2019. Disponível em: <https://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/6065> Acesso em: 06/09/21.

KULUS, M.; KULUS, J.; JANKOWSKI, M. et al. The use of mesenchymal stem cells in veterinary medicine. Medical Journal of Cell Biology, 2018. Disponível em: <https://sciendo.com/pdf/10.2478/acb-2018-0016> Acesso em: 03/09/21

MALARD, P. F.; XAVIER, M.C.; GEORGES, J. A. O. Hipoplasia Medular Eritroide Imunomediada tratada com Células-tronco mesenquimais - Relato de Caso, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/275042065_Hipoplasia_Medular_Eritroide_Imunomedia_Tratada_com_Celulas-tronco_Mesenquimais_-_Relato_de_caso Acesso em: 07/09/21.

MAMBELLI, L. I.; SANTOS, E. J. C.; FRAZÃO, P. J. R. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. Tissue Engineering: Part C, Larchmont, v. 15, n. 1, p. 87-94, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19290805/> Acesso em: 25/09/21

MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A.I.; NARD, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells, v.26, p.2287-2299, 2008. Disponível em: <http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/2007-1122v1> doi:10.1634/stemcells.2007-1122. Acesso em: 25/09/21

MINUZZO, T.; DUTRA DA SILVEIRA, S. Bone marrow transplant in a dog with bone marrow aplasia secondary to erliquiosis: case report. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública, v. 7, n. 2, p. 129-135, 2 nov. 2020. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/view/51913> Acesso em: 05/09/21.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, M. N.; JUNQUEIRA, R. Células-tronco mesenquimais. p. 1–8, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/lj/cr/a/CpHCgGmXgBBqZv67h5G9BjK/?lang=pt> Acesso em 02/09/21.

MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K. Aplasia Medular em Cães. Revista de Ciências Agroveterinárias, v. 9, n. 1, p. 99 -108, 2010. Disponível em: <https://periodicos.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5291/3501> Acesso em: 04/09/2021.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. L. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. Exp Mol Med. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24232253/> Acesso em: 08/09/21.



NONES, J.; REHEN, S. Perspectivas para a aplicação de células-tronco embrionárias na clínica veterinária. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 45, Art#442, Nov2, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/material/Nones442.pdf> Acesso em: 04/09/21

SANTOS, E. J. Análise da Aplicação Terapêutica das Células-Tronco na Medicina Veterinária. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 02, Vol. 01. pp 269-295, Abril de 2017. ISSN:2448-0959 Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/medicina-veterinaria> Acesso em: 06/09/21

TRZIL, J. E., MASSEAU, I.; WEBB, T. L. et. al. Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. J Feline Med Surg. 17 de Setembro de 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384398/> Acesso em: 24/05/21.