

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

***Priming* com INF- γ e TNF- α aumenta potencial imunomodulador
de células tronco mesenquimais caninas *in vitro***

NATIELLY DIAS CHIMENES

BOTUCATU – SÃO PAULO

MARÇO – 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

***Priming* com INF- γ e TNF- α aumenta potencial imunomodulador
de células tronco mesenquimais caninas *in vitro***

NATIELLY DIAS CHIMENES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, como requisito para elaboração da dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Associado Rogério Martins

Amorim

BOTUCATU-SÃO PAULO

MARÇO 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Chimenes, Natielly Dias.

Priming com INF- γ e TNF- α aumenta potencial imunomodulador de células tronco mesenquimais caninas in vitro / Natielly Dias Chimenes. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501062

1. Citocinas. 2. Esclerose múltipla. 3. Imunomodulação.
4. Meningoencefalite. 5. Neuroimunomodulação.

Palavras-chave: Citocinas; Esclerose múltipla; Imunomodulação; Meningoencefalite de origem desconhecida; Neuroimunes.

TÍTULO: *Priming* com INF- γ e TNF- α aumenta potencial imunomodulador de células tronco mesenquimais caninas *in vitro*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira Membro da Banca

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/ Laboratório de Regeneração Nervosa - UNICAMP

Profa. Dra Clelia Akiko Hiruma Lima Membro da Banca

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/ INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS-UNESP/Botucatu

Data da defesa: 23 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo suporte ao longo de todo o período de mestrado, em especial ao meu esposo Wislei Luiz Delmondes Taira, sem vocês não seria possível a mudança de cidade, as viagens mensais, os cuidados com os meus cachorros e a realização de todo o projeto de pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pela orientação e ensinamentos ao longo de todo mestrado, pela confiança depositada a mim para a condução dessa pesquisa, por me receber como parte da equipe em um momento tão difícil com o fim da pandemia mesmo sem me conhecer e por dar todo o suporte diante dos desafios enfrentados.

Aos meus colegas e amigos Beatriz da Costa Kamura, Lucas Vinícius de Oliveira Ferreira e João Pedro Marmol de Oliveira, pelo apoio, incentivo e toda a ajuda que foi essencial para a realização de cada parte deste projeto, vocês se tornaram minha família em Botucatu e fizeram eu me sentir em casa, me abraçaram como parte da equipe de pesquisa de uma forma muito acolhedora, sempre um ajudando o outro sem que nenhuma palavra precisasse ser dita.

Ao aluno de iniciação científica Paulo César Leão Eliam por todo o apoio e suporte ao longo dos últimos meses de realização do projeto, foi você quem esteve presente nos momentos mais difíceis da pesquisa.

A Dra. Giovana Boff Sánchez por todo o auxílio, discussão e ajuda a distância para a realização da metodologia do projeto.

A Cristiana Raach Bromberger que foi meu suporte em casa, me ouvindo, me apoiando e me ajudando a superar cada obstáculo ao longo desse período e a Andresa Xavier Frade por ter sido meu suporte mesmo a distância no início do mestrado quando nem no laboratório era possível ir por causa da pandemia, superamos juntas as etapas do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores caninos utilizados no qPCR.....	64-65
--	-------

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Imagem de Ressonância Magnética do encéfalo do animal 1 demonstrando as lesões causadas pela MUO.....	97
Apêndice 2. Imagem de Ressonância Magnética do encéfalo do animal 2 demonstrando as lesões causadas pela MUO.....	98
Apêndice 3. Imagem de Ressonância Magnética do encéfalo do animal 3 demonstrando as lesões causadas pela MUO.....	99
Apêndice 4. Análise do LCR dos animais 1, 2 e 3.....	99
Apêndice 5. Viabilidade e apoptose das Ad-MSCs.....	100
Apêndice 6. Atividade metabólica celular (%) de grupos experimentais tratados com LCR canino nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% (A), e com soro canino nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% (B).....	101
Apêndice 7. Análise descritiva de amostras de LCR (n=1) e soro (n=2) de cães saudáveis em comparação com o LCR (n=3) e soro (n=1) de cães com MUO usados no <i>priming</i> de cAd-MSCs.....	102
Apêndice 8. Análise estatística da expressão gênica relativa de BNDF, GNDF, HGF, IDO, INF- γ , TNF- α , PTGE2 e IL-10 no <i>priming</i> das cAd-MSCs.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando as influências das citocinas pró e anti-inflamatórias sobre a micróglia (adaptado de COATES;JEFFERY, 2014).....	25
Figura 2. Esquema demonstrando as possibilidades de técnica <i>priming</i> (adaptado de LI et al., 2022)	39
Figura 3. Scheme represents MUO and MS neuroinflammation.....	55
Figura 4. Experimental design.....	58
Figura 5. cAd-MSC immunophenotypic analysis (AH), cAd-MSC viability and apoptosis (IK) and cAd-MSC ability to differentiate (LO).....	68
Figura 6. Control and <i>priming</i> with INF- γ and TNF- α of cAd-MSCs.	71
Figura 7. cAd-MSC priming with healthy and MUO dog plasma.....	72
Figura 8. cAd-MSCs priming with CSF from healthy dogs and MUO.....	73
Figura 9. Post- priming cAd-MSC viability.....	74
Figura 10. Relative gene expression of BNDF, GNDF, HGF, IDO, INF- γ , TNF- α , PTGE2 and IL-10 in the priming groups of cAd-MSCs.....	76
Figura 11. Secretion profile of IL-8, IL-10, GM-CSF, IL-2 and MCP-1 in the cAd-MSC priming groups.....	78

LISTA DE ABREVIACÕES

Ad-MSCs- Células Tronco Mesenquimais derivadas do tecido adiposo

BDNF- fator neurotrófico derivado do cérebro

Breg- célula B reguladora

cAMP- AMP cíclico

C- grupo experimental controle

cAd-MSCs- Células Tronco Mesenquimais derivadas do tecido adiposo canina

CCL2- ligante de quimiocina 2

CD- células dendríticas

C-LCR- grupo experimental com líquido cefalorraquidiano de cão controle

COX 1- ciclo-oxigenase 1

COX 2- ciclo-oxigenase 2

C-S- grupo experimental com soro de cão controle

CXCL8- interleucina 8

cDNA- ácido desoxirribonucleico complementar

DLA classe II- dog leucocyte antigen classe II

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO- dimetilsufóxido

DPBS- Dubecco's Phosphate Buffered Saline

EAE- encefalite experimental autoimune

EM- esclerose múltipla

GCN2- controle geral não depressível 2

GDNF-fator neurotrófico derivado das células da glia

GM-CSF- fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GVHD- doença do enxerto contra o hospedeiro

HGF- fator de crescimento de hepatócitos

HLA-DR- molécula do complexo de histocompatibilidade de classe II

HLA-G- antígeno leucocitário humano G

HO-1- heme oxigenase 1

HPRT- hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

IDO- indoleamina -2,3- dioxigenase

IF2- fator de iniciação da tradução eucariótica

IFN- γ - interferon gama

IL-1- interleucina 1

IL-1 α - interleucina 1 alfa

IL-1 β - interleucina 1 beta

IL1RA- antagonista de receptor de interleucina 1

IL-4- interleucina 4

IL-5- interleucina 5

IL-6- interleucina 6

IL-8- interleucina 8

IL-10- interleucina 10

IL-12- interleucina 12

IL-13- interleucina 13

IL-17- interleucina 17

IL-23- interleucina 23

IL-35- interleucina 35

iNOS- óxido nítrico sintase induzida

LCR-líquido cefalorraquidiano

LEN- leucoencefalite necrosante

LPS- lipopolissacarídeo

M1- fenótipo da micróglia pró-inflamatório

M2- fenótipo da micróglia anti-inflamatório

MCP-1- proteína quimioatraente de monócitos 1

MEG- meningoencefalomielite granulomatosa

MEN- meningoencefalite necrosante

MHC II- molécula do complexo de histocompatibilidade de classe II

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

MSCs- células tronco mesenquimais

MUO- meningoencefalite de origem desconhecida

MUO-LCR- grupo experimental com líquido cefalorraquidiano de cão com MUO

MUO-S- grupo experimental com soro de cão com MUO

MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NF- κ B- fator nuclear kappa beta

NGF- fator de crescimento neural

NK- natural killer

NO- óxido nítrico

NOS- óxido nítrico sintase

P0- passagem celular zero

P1- passagem celular 1

P2- passagem celular 2

P3- passagem celular 3

P4- passagem celular 4

PD-L1- ligante de morte 1 programado

PD-L2- ligante de morte 2 programado

PGE2- prostaglandina E 2

PTGES2- prostaglandina E sintetase 2

qPCR- reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

RNA- ácido ribonucleico

RM- ressonância magnética

ROS- espécies reativas de oxigênio

RPS5- proteína ribossômica S5

RPS19- proteína ribossômica S19

SFB- soro fetal bovino

SNC- sistema nervoso central

TGF- β - fator de crescimento transformador beta

Th- linfócito T helper

TNF- α - fator de necrose tumoral beta

Treg- linfócitos T reguladores

TRLs- receptor tipo toll like

TSG-6- proteína do gene 6 induzida

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiv
Abstract.....	xv
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1.1 Meningoencefalite de origem desconhecida (MUO)	22
1.1.2 Etiopatogenia.....	23
1.1.3 Diagnóstico, tratamento e prognóstico	26
1.1. 4 Esclerose múltipla (EM)	28
1.1. 5 Células Estromais/ Tronco Mesenquimais Multipotentes (MSCs)	30
1.1. 6 MSCs e Neuroinflamação	31
1.1.7 Citocinas e Quimiocinas Pró-inflamatórias	32
1.1.8 Citocinas Anti-inflamatórias	35
1.1.9 Fatores neurotróficos	36
1.1.10 Prostaglandina E 2 (PGE2).....	38
1.1. 11 <i>Priming</i> de MSCs	38
Objetivos	42
BIBLIOGRAFIA	43
2. TRABALHO CIENTÍFICO.....	53
3 CONCLUSÃO GERAL	95
APÊNDICE	96

CHIMENES, N.C. ***Priming com IFN- γ e TNF- α aumenta potencial imunomodulador de células tronco mesenquimais caninas *in vitro****. Botucatu, 2023. 103 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A meningoencefalite de origem desconhecida (MUO) é uma enfermidade neuroimune em cães, com grande potencial de se tornar um modelo animal natural para a esclerose múltipla. O *priming in vitro* das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo canino (cAd-MSCs) é uma estratégia para potencializar a ação imunomodulatória e imunossupressora das cAd-MSCs. O objetivo deste trabalho foi avaliar o *priming* com IFN- γ e TNF- α , LCR e soro de cães com MUO nas cAd-MSCs. Para tanto, foi realizado o *priming in vitro* por 72 horas das cAd-MSCs (P3-P4) em seis grupos: controle (C), com IFN- γ em associação com TNF- α (IFN- γ + TNF- α), soro controle (C-S), soro de cães com MUO (MUO-S), LCR controle (C-LCR) e LCR de cães com MUO (MUO-LCR) e avaliada a expressão gênica para BDNF, GDNF, HGF, IDO, PTGE2, IL-10, IFN- γ e TNF- α por qPCR e quantificação proteica de GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-8 e MCP-1 por ensaio multiplexado. Comparando todos os grupos com o grupo C, o IFN- γ + TNF- α apresentou aumento de HGF, IDO e TNF- α e IL-8 ($p < 0,001$), nos grupos C-LCR e MUO-LCR houve aumento de IFN- γ e TNF- α e redução de BDNF e GDNF ($p < 0,001$), os grupos C-S e MUO-S apresentaram redução na quantificação proteica de IL-10 ($p < 0,001$), e o grupo C-S teve redução de BDNF e GDNF ($p < 0,001$) e o grupo MUO-S teve redução de HGF ($p < 0,001$). Diante dos resultados, a técnica *priming* IFN- γ + TNF- α demonstrou maior potencial de perfil imunomodulatório com tendência anti-inflamatória em comparação com os demais grupos.

Palavras-chaves: neuroimunes, citocinas, meningoencefalite, esclerose múltipla.

CHIMENES, N.C. **Priming $\text{INF-}\alpha$ and $\text{TNF-}\alpha$ enhances the immunomodulatory potential of canine mesenchymal stem cells in vitro.** Botucatu, 2023. 103 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Meningoencephalitis of unknown origin (MUO) is a neuroimmune disease affects dogs, with great potential to become a natural experimental model for multiple sclerosis. In vitro priming of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue (cAd-MSCs) is a strategy to enhances the immunomodulatory and immunosuppressive action of cAd-MSCs. The aim of this work is to evaluate the priming with $\text{INF-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$, CSF and serum from dogs with MUO on cAd-MSCs. Therefore, in vitro priming of cAd-MSCs was performed in six groups: control (C), with $\text{INF-}\alpha$ in association with $\text{TNF-}\alpha$ ($\text{INF-}\alpha + \text{TNF-}\alpha$), control serum (C-P), serum from dogs with MUO (MUO-P), CSF control (C-CSF) and CSF from dogs with MUO (MUO-CSF) and evaluated gene expression for BDNF, GDNF, HGF, IDO, PTGE2, IL-10, $\text{INF-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$ by qPCR and protein expression of GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-8 and MCP-1 by multiplex assay. In comparison with group C, the group with $\text{INF-}\gamma + \text{TNF-}\alpha$ showed an increase in HGF, IDO and $\text{TNF-}\alpha$ and IL-8 ($p = <0.001$), in the C-CSF and MUO-CSF groups there was an increase in $\text{INF-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$ and a reduction in BDNF and GDNF ($p = <0.001$), the C-S and MUO-S groups showed a reduction in IL-10 ($p = <0.001$), and the C-S group had a reduction in BDNF and GDNF ($p = <0.001$) and the MUO-S group had reduced HGF ($p = <0.001$). In view of the results, the $\text{INF-}\gamma + \text{TNF-}\alpha$ priming technique demonstrated a greater potencial for immunomodulatory profile with an anti-inflammatory tendency compared to the other groups.

Keywords: neuroimmune, cytokines, meningoencephalitis, multiple sclerosis.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As doenças neuroimunes de cães são subdivididas em várias categorias baseado nos achados histopatológicos, em virtude dos achados clínicos apresentarem limitações (COATES; JEFFERY, 2014). Diante disso, o termo meningoencefalomielite de origem desconhecida (MUO) é adotado para se referir às doenças inflamatórias não infecciosas, presumivelmente autoimunes, como as meningoencefalomielites granulomatosas (MEG), as meningoencefalites necrosantes (MEN) e as leucoencefalites necrosantes (LEN) (COATES; JEFFERY, 2014; GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010).

A MUO pode acometer cães de qualquer raça ou idade, com localização da lesão focal ou multifocal podendo acometer prosencéfalo, tronco encefálico, cerebelo ou medula espinhal, os sinais clínicos variam conforme o local acometido (GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010).

No sistema imune várias células atuam para prevenir sua superestimulação, incluindo células Treg (linfócitos T reguladores), Breg (células B reguladoras), macrófagos e células dendríticas supressoras (JIANG; XU, 2020). Essas células por sua vez modulam a reação imunológica por meio da secreção de citocinas como interleucina 10 (IL-10), fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e interleucina 35 (IL-35) (JIANG; XU, 2020).

Na patogenia das enfermidades neuroimunes as citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) possuem um papel de destaque (COATES; JEFFERY, 2014). Os linfócitos T helper (Th) 1, por exemplo, secretam altas concentrações de IFN- γ e TNF- α que ativam a micróglia para um fenótipo pró-inflamatório (M1) (COATES; JEFFERY, 2014).

Em contrapartida, os linfócitos Th2 e Treg tendem a contribuir para a neuroproteção por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias interleucina 4 (IL-4), IL-10, interleucina 13 (IL-13) que por sua vez, conduzem a micróglia a um fenótipo anti-inflamatório (M2), suprimindo a função das células T citotóxicas (COATES; JEFFERY, 2014).

Em humanos a doença inflamatória desmielinizante mais comum em adultos é a esclerose múltipla (EM), afeta mais de 2,5 milhões de pessoas no mundo todo, acometendo duas vezes mais mulheres do que homens, na idade entre 20 a 40 anos (THE LANCET NEUROLOGY, 2021).

Estima-se que no Brasil acometa em torno de 1,36/100.000 a 27,2/100.000 habitantes variando conforme a região do país, apresentando uma maior prevalência no Rio Grande do Sul e uma menor prevalência em Pernambuco (DA GAMA PEREIRA et al., 2015). Um outro estudo aponta ainda a ocorrência de esclerose múltipla no Brasil em uma taxa de 1,68/100.000 habitantes (VASANTHAPRASAD et al., 2022).

Caracterizada por uma desmielinização multifocal ou em placa no encéfalo e na medula espinhal, podendo acometer qualquer parte do sistema nervoso central (SNC) em associação ou isoladamente, com preferência pelos nervos ópticos, tronco cerebral, medula espinhal, cerebelo e substância branca perivascular, as principais alterações patológicas na EM são: a inflamação que é o principal gatilho para o dano ao tecido do SNC, a desmielinização, a perda ou dano axonal e a gliose (CONSTANTINESCU et al., 2011; HU; LUCCHINETTI, 2009).

A EM se desenvolve por meio de mecanismos imunomediados com fortes evidências de origem genética e apresenta desafios quanto sua resposta ao uso de drogas imunomoduladoras ou imunossupressoras convencionais (CONSTANTINESCU et al., 2011). Diante dessas características ela tem sido associada as encefalomyelites autoimunes em várias espécies animais que são utilizadas como modelo experimental, com o objetivo de fornecer informações sobre sua patogênese e permitir assim o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, inclusive avaliar o efeito das citocinas no SNC (CONSTANTINESCU et al., 2011).

A encefalomyelite autoimune experimental (EAE) em camundongos é o principal modelo animal utilizado para estudo da EM, pois através desse método é possível induzir várias características patológicas dessa doença (BAKER; AMOR, 2014; CONG et al., 2020). E como modelo experimental natural para a EM encontra-

se a MUO, com características clínicas e neuroimunológicas semelhantes entre si, como a regulação positiva da expressão de IFN- γ , interleucina 17 (IL-17) e molécula do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) no sistema nervoso e a associação genética da ação de MHC-II (GREER et al., 2010; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2013; SOSPEDRA; MARTIN; 2016).

Além disso mesmo que não ocorra a desmielinização na MUO o que é observado na forma comum da EM, em sua forma aguda fulminante na EM ocorre uma necrose cerebral extensa, cavitação ou tumefação e manifestação de lesões cerebrais difusas e discretas resultando em morte dentro de semanas a meses como na MUO (GREER et al., 2010).

O tratamento das doenças neuroimunes é comumente realizado com drogas imunossupressoras isoladas ou em associação, em cães consiste no uso de imunossupressores como: glicocorticoides, ciclosporina, azatioprina, e antineoplásicos como: procarbazona, citosina arabinosídeo, lomustina, vincristina, leflunomida e micofenolato de mofetil, e dentre todos os efeitos colaterais já observados que essas medicações podem causar, a mielossupressão é comum a todos eles (CORNELIS et al., 2019).

Em humanos para a EM utiliza-se corticoides nos casos de recaídas agudas, terapias modificadoras da doença como interferon beta, acetato de glatiramer, teriflunomida, fumarato de dimetilo, fingolimod, siponimod, ozanimod, cladribina, entre outras drogas, com os efeitos colaterais variando de reações locais a distúrbios autoimunes, conferindo uma expectativa de 13,1 anos de vida (IRIARTE; KATSAMAKIS; CASTRO, 1999).

Assim como a EM a MUO apresenta dificuldades quanto a uma resposta adequada as drogas convencionalmente utilizadas, neste contexto as Células Tronco Mesenquimais (MSCs) tem se tornado uma estratégia terapêutica inovadora, uma vez que oferecem propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, por meio da secreção de citocinas em resposta aos estímulos inflamatórios do microambiente e à interação com linfócitos B, linfócitos T, células

natural killer (NK), células dendríticas (CD), macrófagos/monócitos e neutrófilos (GENC et al., 2019; PERONI; BORJESSON, 2011).

As MSCs interagem com células T (Th1, Th2, Th17, T citotóxicas), podendo inibi-las por meio de fatores como: prostaglandina E2 (PGE2), fator de crescimento de hepatócito (HGF), TGF- β , IFN- γ , IL-10, fator inibidor de leucemia humano, antígeno leucocitário G (HLA-G) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (CARRADE; BORJESSON, 2013; PERONI; BORJESSON, 2011). Adicionalmente as MSCs promovem a sobrevivência e inibem a proliferação e maturação de células B e alteram o fenótipo das NK (CARRADE; BORJESSON, 2013; PERONI; BORJESSON, 2011).

Quando comparado com as terapias habituais o uso das MSCs apresenta um grande potencial para o tratamento de cães com MUO. Em um estudo clínico com grupos de 8 cães tratados, as MSCs se mostraram seguras e eficazes, demonstrando uma vantagem em relação ao uso de prednisona isoladamente ou em associação com citarabina, devido à não observação dos efeitos colaterais vistos nessas medicações (ZEIRA et al., 2015).

Contudo vários fatores extrínsecos e intrínsecos das MSCs podem interferir no seu efeito como enxerto insuficiente, baixa taxa de sobrevivência e a variação doador (LEE; KANG, 2020). Diante do exposto, para promover uma melhor eficácia no uso dessas células tem sido desenvolvido estratégias de *priming*, uma técnica que visa aumentar o potencial imunossupressor das MSCs (SILVA-CARVALHO et al., 2020).

O *priming* das MSCs pode ser realizado por diversas técnicas como o uso de citocinas, fatores de crescimento, hipóxia, drogas farmacológicas, biomateriais, além de diferentes condições de culturas (LEE; KANG, 2020; NORONHA et al., 2019). Como exemplo tem-se a estimulação de MSCs canina, com IFN- γ e TNF- α que foi capaz de induzir altas concentrações de IDO e PGE2 (AMORIM et al., 2020) e o uso de IFN- γ que se mostrou eficaz em reduzir os sinais da doença do enxerto contra o hospedeiro aumentando assim a taxa de sobrevivência dos acometidos quando comparado ao uso das MSCs sem a técnica *priming* (KIM et al., 2018).

O uso de fluidos biológicos como técnica *priming* de MSCs tem sido utilizado por vários autores com o objetivo de aumentar o efeito imunossupressor das MSCs. LEIJS et al. (2012) conseguiram aumentar os fatores imunomodulatórios das MSCs a partir do líquido sinovial de pacientes com doenças articulares. SILVA-CARVALHO et al. (2020) obtiveram bons resultados no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro através do *priming* de MSCs a partir de plasma sanguíneo de pessoas doentes, ambos estudos foram realizados em humanos.

FARIVAR et al. (2015) descrevem que o uso de LCR no cultivo de MSCs promoveu a expressão de genes (NESTIN, proteína 2 associada a microtúbulos e proteína glial fibrilar ácida) que geraram uma melhor diferenciação neural dessas células para o tratamento de doenças neurodegenerativas. LEE et al. (2019) relataram que o uso de líquido cefalorraquidiano (LCR) de paciente com doença de Alzheimer no armazenamento de MSCs promoveu *in vitro* uma maior expressão gênica de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) capaz de promover característica neuroprotetoras e neurotróficas se mostrando uma técnica boa para aumentar a eficácia das MSCs em pessoas doentes.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Meningoencefalite de origem desconhecida (MUO)

O termo Meningoencefalite de Origem Desconhecida (MUO) é utilizado para se referir a um conjunto de subtipos de doenças inflamatórias, idiopáticas, não infecciosas do SNC, que engloba as meningoencefalite granulomatosa (MEG), meningoencefalite necrosante (MEN) e leucoencefalite necrosante (LEN) (CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016). A MUO possui uma epidemiologia ainda desconhecida, porém confere uma das principais causas de doenças inflamatórias do SNC em cães, sendo apontada como responsável por 47,5 % das doenças inflamatórias que acometem o SNC desses animais na Inglaterra (GONÇALVES et al., 2022).

Por serem enfermidades cujo diagnóstico *ante mortem* se baseia na apresentação clínica, características de imagem avançada e análise do LCR, essas informações muitas vezes se sobrepõem, sendo possível a diferenciação dos subtipos de MUO apenas histopatologicamente no *post mortem* (PORTERO et al., 2019).

A MEG pode apresentar três tipos de manifestações clínicas: focal, disseminada e ocular, sendo a forma mais comum a disseminada caracterizada por sinais clínicos multifocais de início agudo acometendo cérebro, tronco encefálico caudal, cerebelo e/ou medula espinal, rapidamente progressivo (TALARICO; SCHATZBERG, 2010). Já a forma focal apresenta progressão lenta, apresentando lesões parecidas com granulomas únicos, podendo ser localizada em cérebro, fossa craniana caudal e/ou medula espinal (TALARICO; SCHATZBERG, 2010).

A forma ocular se caracteriza por deficiência visual de início agudo, com alterações pupilares e edema do disco óptico podendo apresentar mais raramente coriorretinite (TALARICO; SCHATZBERG, 2010). Raças toy e terriers são mais predispostas a ocorrência de MEG (CORNELIS et al., 2019), sendo a idade de maior prevalência de 4 a 8 anos de idade, com fêmeas demonstrando maior fator de risco em relação aos machos (GRANGER et al., 2010).

A MEN é caracterizada por sinais clínicos como convulsão, depressão, mudança de comportamento, andar em círculos e déficits visuais devido a infiltração de células mononucleares em leptomeninges. Cursa com quadro rapidamente progressivo, sendo mais prevalente em fêmeas e animais com menos de 4 anos (BARBER et al., 2011; GRANGER et al., 2010). Essa enfermidade foi primeiramente descrita em cães da raça Pug, sendo inicialmente denominada Encefalite do Pug. No entanto já existe descrição de sua ocorrência em raças de pequeno porte como Bruxelas Griffons, Chihuahua, Coton de Tulear, Maltês, Papillon, Pequinês, Shih Tzu, West Highland Terrier (COOPER et al., 2014; SCHRAUWEN et al., 2014).

Na LEN ocorre infiltrado de células inflamatórias na substância branca do SNC, com consequente desmielinização e necrose por cavitação associado a uma importante reação glial (EBERLY et al., 2015). Acomete principalmente cães com até 4 anos de idade, podendo estar presentes em cães de 4 meses a 10 anos, de qualquer sexo, e já foi descrito em raças como Yorkshire Terrier e Buldogue Francês, podendo apresentar como sinais clínicos déficits visuais, depressão, convulsão, andar em círculos, ataxia e inclinação de cabeça (EBERLY et al., 2015)

1.1.2 Etiopatogenia

Embora não se saiba ainda sua etiopatogenia acredita-se que a MUO tenha causa multifatorial, como predisposição genética, fatores ambientais e antígenos infecciosos, embora nenhum agente infeccioso tenha sido identificado ainda como causador da MUO (COATES; JEFFERY, 2014; CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016; NESSLER et al., 2021). Além de fatores que promovem uma resposta imunológica exacerbada, sendo considerada a suposição mais aceita como uma enfermidade de caráter imunomediado (COATES; JEFFERY, 2014; CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016; NESSLER et al., 2021).

As doenças autoimunes surgem da desregulação de um ou ambos os sistemas de resposta imunológica inata ou adaptativa, a resposta a neurotoxicidade e neuroproteção é conduzida por estados de ativação alterados por duas vias do sistema imunológico, as células T e a micróglia com macrófagos infiltrantes (COATES; JEFFERY, 2014). Uma vez que a resposta autoimune ocorre,

mecanismos através de citocinas agem com o intuito de amplificar essa resposta promovendo a ativação de linfócitos autorreativos e a liberação de autoantígenos de células danificadas levam a exacerbação da doença (COATES; JEFFERY, 2014).

Mesmo que a neuroinflamação já tenha sido investigada em várias doenças neurológicas, a forma como ela se manifesta na MUO ainda não foi determinada (COATES; JEFFERY, 2014). No entanto já sabe-se que a micróglia possui um papel muito importante nesse processo (COATES; JEFFERY, 2014). A micróglia possui a função de eliminar células mortas excedentes e realizar fagocitose sem necessariamente ser ativada (PRINZ; JUNG; PRILLER, 2019).

Uma vez diante de uma infecção ou inflamação do SNC as citocinas que vão determinar um fenótipo pró-inflamatório (M1), ou anti-inflamatório (M2), como por exemplo níveis aumentados de IFN- γ , IL-17, TNF- α , interleucina 1 (IL-1) e outras moléculas de sinalização derivadas de inflamação ou lesão aguda, faz com que a micróglia passe de um estado inativado para um estado fagocitário ativado com liberação de citocinas, TNF- α , IL-6, IL-1 β , espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), e diminuição na produção de fatores neurotróficos, levando a um quadro de citotoxicidade, ativação de astrócitos e neurodegeneração (Figura 1) (COATES; JEFFERY, 2014; SUZUMURA, 2015).

Por outro lado, quando a micróglia é induzida por citocinas como IL-2, IL-13, IL-10 e IL-4 ou complexos imunes, a M2 é ativada reduzindo as respostas pró-inflamatórias e levando a produção de altos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e fatores neurotróficos como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Figura 1) (COATES; JEFFERY, 2014; SUZUMURA, 2015).

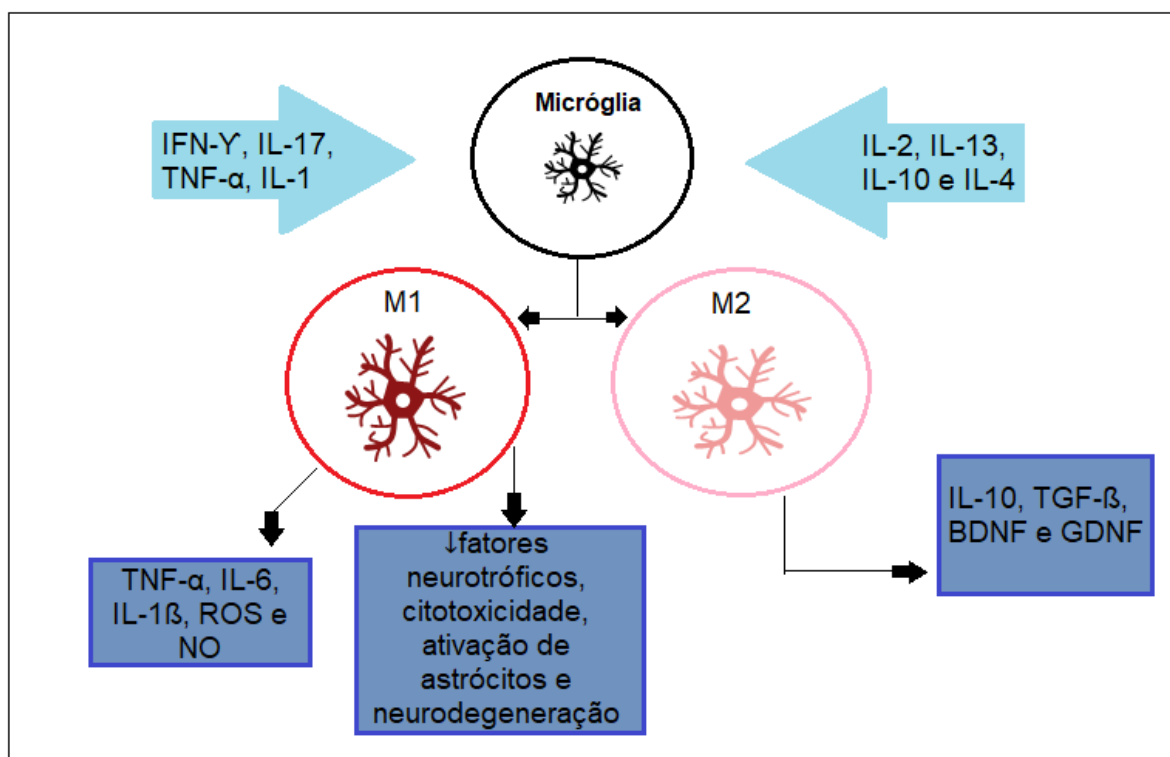


FIGURA 1. Esquema adaptado de (COATES; JEFFERY, 2014) representando as influências das citocinas pró e anti-inflamatórias sobre a micróglia. Quando a micróglia é induzida por IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-1 ela é ativada em um fenótipo pró-inflamatório M1, e quando induzida por IL-2, IL-13, IL-10 e IL-4 é ativada em um fenótipo anti-inflamatório M2.

Mesmo a MUO sendo ligada a uma enfermidade imunoimediada, estudos sugerem um risco genético associado a ocorrência de MUO em Pugs e Malteses (BARBER et al., 2011; GREER et al., 2010; SCHRAUWEN et al., 2014). Devido a semelhança com meningoencefalites virais em outras espécies como as lesões causadas por herpesvirus humano, a possibilidade de a MUO ser causada por uma infecção latente por herpesvírus já foi considerada (TALARICO; SCHATZBERG, 2010).

Contudo nenhum agente infeccioso foi detectado até o momento como causador da MUO, NESSLER et al. (2021) realizaram um sequenciamento de *next*

generation, cuja técnica tem por objetivo obter uma análise metagenômica do viroma em amostras de LCR de cães diagnosticados com MUO, e foi incapaz de detectar um causador viral novo ou conhecido com potencial para infectar mamíferos.

Outra possibilidade ainda apontada é que um patógeno como em infecções por flavivírus esteja presente, porém em níveis indetectáveis (TALARICO; SCHATZBERG, 2010). Condições mediadas por autoanticorpos ou células T também já foram consideradas, no entanto embora autoanticorpos contra a proteína do ácido fibrilar glial tenham sido detectados no LCR de cães com MUO eles não eram específicos (PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012).

1.1.3 Diagnóstico, tratamento e prognóstico

O diagnóstico clínico da MUO pode ser feito por meio de uma combinação de sinais neurológicos, alterações em exame de imagem avançada como hiperintensidades intra-axiais múltiplas únicas ou difusas, ponderadas em T2 na ressonância magnética e análise do LCR com presença de pleocitose com mais de 50% de monócito/linfócito e exclusão de agentes infecciosos (CORNELIS et al., 2019). O método de diagnóstico realizado através de biópsia também é descrito e embora não tenha relatos de complicações graves, é de difícil implantação na rotina clínica (CORNELIS et al., 2019).

Como o diagnóstico conclusivo de MUO só é possível a partir de exame histopatológico o uso de biomarcadores, tais quais proteínas de fase aguda, anticorpos, citocinas e marcadores de neuroimagem, tem sido considerado como uma alternativa diagnóstica (ANDERSEN-RANBERG; BERENDT; GREDAL, 2021). A proteína C reativa, por exemplo, embora se apresente em níveis normais na MUO, pode servir como uma ferramenta importante para o descarte de meningite-arterite responsiva a corticosteroides (ANDERSEN-RANBERG; BERENDT; GREDAL, 2021).

Um aumento de INF- γ na MEN e IL-17 na MEG podem atuar como um marcador desses subtipos, e o uso de tomografia por emissão de pósitrons para identificação de granulomas e espectroscopia de ressonância de prótons capazes

de identificar áreas de necrose se mostraram promissores (ANDERSEN-RANBERG; BERENDT; GREDAL, 2021).

Como base no tratamento da MUO a primeira escolha ainda é o uso de glicocorticoides em associação com drogas imunossupressoras sendo a principal utilizada a citosina arabinosídeo, STEE et al. (2020) analisaram o uso da citosina arabinosídeo em associação com glicocorticoides por infusão contínua e observaram que a sobrevida melhorou em 3 meses em comparação com a via subcutânea. Outras drogas imunossupressoras também podem ser empregadas como azatioprina, procarbazina e lomustina, vincristina e ciclosporina, Leflunomida e micofenolato de mofetil (CORNELIS et al., 2019).

No entanto, o grande prejuízo no uso de tais fármacos são os seus efeitos colaterais como alopecia localizada, dermatite, calcinose cutânea, piodermite profunda, toxicidade gastrointestinal e mielossupressão com citosina arabinosídeo; mielossupressão e enterite hemorrágica com procarbazina, leucopenia, trombocitopenia grave e gastroenterite hemorrágica com lomustina; mielossupressão e piometra com vincristina e ciclofosfamida; diarreia hemorrágica com micofenolato de mofetil; mielossupressão, cistite hemorrágica e piometra com vincristina e ciclofosfamida, pele fina, infecção do trato urinário, vômitos, úlcera de córnea, diabetes mellitus, insuficiência renal, ceratoconjuntivite seca, ruptura do ligamento cruzado, massa hepática, adenoma de glândula mamária, linfoma, sarna demodécica e sarna séptica com azatioprina (CORNELIS et al., 2019).

O tempo de sobrevida observado foi de 425 dias com procarbazina; 150-740 dias com lomustina; 198 dias com vincristina e ciclofosfamida; 250 dias com micofenolato de mofetil; 1834 dias com azatioprina (CORNELIS et al., 2019); 1095 dias com glicocorticoide e citosina arabinosídeo (STEE et al., 2020); 1215 dias com apenas glicocorticoide e quando associado com outro imunossupressor até 2469 dias (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013). LOWRIE; SMITH; GAROSI (2013) relataram que a destruição dos sulcos cerebrais e a hérnia do forame magno na RM foi relacionado a um alto fator de risco de mortalidade nas primeiras 12 semanas após o diagnóstico.

Um protocolo com uso de radioterapia foi demonstrado como mais uma opção terapêutica adjuvante para controle da progressão da doença durante o seu tratamento com glicocorticoides e imunossupressores, apresentando uma sobrevida de mais de 250 dias (BECKMANN et al., 2015). Como fator prognóstico tem se apontado o uso da concentração de lactato no sangue e LCR de cães com MUO, animais que apresentam valores acima de 4 mmol/L de lactato no LCR e no sangue estão associados a uma menor sobrevivência (PORTERO et al., 2019).

1.1. 4 Esclerose múltipla (EM)

A EM é uma doença neuroinflamatória crônica que acomete cérebro e medula espinal, afeta milhares de jovens adultos, principalmente mulheres, em média entre 20 a 30 anos (MCGINLEY MP, GOLDSCHMIDT CH, 2021). É uma enfermidade caracterizada pela infiltração de células imunes pela barreira hematoencefálica, que ocasiona inflamação, desmielinização, gliose e degeneração neuroaxonal, sendo considerada autoimune (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Estima-se que acomete em torno de 5 a 300 pessoas a cada 100 mil habitantes em todo o mundo (MCGINLEY MP, GOLDSCHMIDT CH, 2021).

No Brasil acomete em torno de 1,36/100.000 a 27,2/100.000 habitantes com maior prevalência no Rio Grande do Sul e uma menor prevalência em Pernambuco (DA GAMA PEREIRA et al., 2015). Em um estudo comparando diversos países do mundo aponta que a ocorrência de esclerose múltipla no Brasil ocorre em uma taxa média de 1,68/100.000 habitantes a menor prevalência observada nos países estudados (VASANTHAPRASAD et al., 2022).

A neuroinflamação na EM ocorre a partir de linfócitos autorreativos que iniciam o processo promovendo uma resposta aberrante contra autoantígenos do SNC, levando células Th1 a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e INF- γ , e Th17 a produção de IL-17 (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; KLINEOVA; LUBLIN, 2018).

Essa enfermidade pode se manifestar como uma síndrome clinicamente isolada em que ocorre um quadro clínico agudo com acometimento de um ou mais locais do SNC (DOSHI; CHATAWAY, 2016). E ainda na forma recorrente e

remitente em que o paciente apresenta disfunção neurológica intercalada com momentos de estabilidade, na forma primária-progressiva em que a incapacidade neurológica progressiva ocorre desde o primeiro momento, e na forma secundária progressiva em que a incapacidade neurológica ocorre mais tardiamente (DOSHI; CHATAWAY, 2016).

Os sintomas observados na EM são caracterizados por uma apresentação neurológica com neurite óptica, manifestações sensoriais e/ou motoras de mielite e sintomas do tronco cerebral, como oftalmoplegia interna, hemiparesia, mono/paraparesia, hipoestesia, disestesia, parestesia, disfunção do esfíncter urinário ou fecal, diplopia, oscilopsia, entre outros (OH; VIDAL-JORDANA; MONTALBAN, 2018). o diagnóstico de EM é realizado a partir dos sintomas clínicos relacionados a lesões desmielinizantes associados com exames de imagem compatíveis com EM (OH; VIDAL-JORDANA; MONTALBAN, 2018; SAND, 2015).

O tratamento da EM feito em três pilares, o manejo das recaídas agudas que consiste no tratamento de doenças infecciosas concomitantes e uso de metilprednisolona associado a fisioterapia, o tratamento modificador da doença e o tratamento sintomático (DOSHI; CHATAWAY, 2016). Dentre as drogas que podem ser utilizadas estão o interferon 1 beta, acetato glatirâmero, teriflunamida, fumarato de dimetila, fingolimode, natalizumabe, entre outros, contudo o grande desafio da EM são os enormes efeitos colaterais provocados por tais medicações associado com sua baixa efetividade sobre a doença (DOSHI; CHATAWAY, 2016).

Devido aos desafios encontrados na busca por mais estudos a respeito da etiopatogenia e desenvolvimento de opções terapêuticas mais efetivas para a EM, o uso de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* tem se mostrado muito importantes (PROCACCINI et al., 2015; TORRE-FUENTES et al., 2020). Uma dessas abordagens é o modelo autoimune e/ou inflamatório como a encefalite autoimune experimental (EAE), nesse sentido a EAE induzida em camundongos se mostra semelhante a EM devido a ativação da micróglia, infiltração de células perivasculares de linfócitos B e T na medula espinal, cerebelo e medula oblonga (PROCACCINI et al., 2015; TORRE-FUENTES et al., 2020).

Uma forte associação da MEN com os genes dog leucocyte antigen (DLA) classe II em cães da raça Pug aponta o papel do sistema imune nesse distúrbio, essa associação genética do MHC-II se assemelha a observada na EM (GREER et al., 2010). Além disso a MEN apresenta características clínicas, patológicas e radiológicas em comum com a forma fulminante aguda da EM, dessa forma a MEN se mostra um modelo animal de ocorrência natural para a EM corroborando um modelo ideal para estudos dos complexos fatores genéticos e ambientais associados as encefalites imunes (GREER et al., 2010).

1.1. 5 Células Estromais/ Tronco Mesenquimais Multipotentes (MSCs)

A MSCs são células multipotentes que podem ser isoladas de diversos locais como tecido adiposo, medula óssea, cordão umbilical, sangue periférico, endométrio, leite materno, placenta, líquido amniótico, geleia de Wharton, sangue do cordão umbilical, fígado e raiz dentária (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; GAO et al., 2016). Possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares como adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos, células das ilhotas pancreáticas e células neuronais (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; GAO et al., 2016).

Para serem consideradas MSCs, as células precisam apresentar crescimento *in vitro* aderente ao plástico, possuir um fenótipo CD 73, CD 90, antígenos de superfície CD 105 e falta de expressão de proteínas como CD 45, CD 34, CD 14, CD 11b, CD79a ou CD19, ou antígenos do MHC de classe II em humanos, além de capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019).

Outra característica das MSCs é o seu potencial anti-inflamatório e de privilégio imunológico, são células capazes de mediar a resposta imune das células T e B, suprimir secreção de citocinas e citotoxicidade, regular o equilíbrio de Th1/Th2, regular as células Treg, aumentar a viabilidade das células B, inibir sua proliferação, inibir a maturação, ativação ou apresentação de antígenos das células dendríticas, entre outras funções (Gao et al., 2016; Li e Hua, 2017). Seu efeito imunomodulador depende do tipo de célula imune, do microambiente local e do estado da doença,

podendo interagir com as células do sistema imune por contato célula-célula ou por meio de seu secretoma (GAO et al., 2016; LI; HUA, 2017).

O uso de MSCs tem sido apontado em vários estudos como uma boa opção terapêutica a ser empregada em diversas doenças demonstrada em modelos animais como osteoartrite, degeneração do disco intervertebral, ceratoconjuntivite seca, dermatite atópica, doença renal crônica, cardiomiopatia dilatada, doença inflamatória intestinal, em modelo animal de EAE como potencial tratamento para EM e no tratamento de MEG (HARRIS et al., 2012; HOFFMAN; DOWB, 2016; YANWU et al., 2020)

1.1. 6 MSCs e Neuroinflamação

A resposta imune inata tem como objetivo detectar vírus e parasitas e eliminar células anormais e detritos por meio de receptores de reconhecimento como os Toll-like (TRLs), que são muito expressos nas células da micróglia como iniciador da resposta inflamatória (CHEN; WANG; CAO, 2018). Isso leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas fundamentais na mediação da inflamação uma vez que regulam a sobrevivência das células recrutadas e a comunicação entre elas, quando secretadas são elas que conduzem ao início da neuroinflamação (CHEN; WANG; CAO, 2018).

Quando o sistema imunológico se encontra superestimulado as MSCs podem ter efeito supressor afim de evitar o auto-ataque, apresentam capacidade de inibir a ativação de macrófagos pró-inflamatórios, fazer com que as células se adaptem a um fenótipo regulatório aprimorado com níveis elevados de IL-10, arginase-1, e níveis reduzidos de TNF- α , IL-1 β e interleucina 12 (IL-12), e possuem efeitos imunossupressores sobre as células T (Th1, Th2, Th17, T citotóxicas) por meio da expressão de NO, IDO, PGE2 e proteína do gene 6 induzível por fator de necrose tumoral (TSG6) (CHEN; WANG; CAO, 2018; JIANG; XU, 2020).

Dessa forma, elas podem anular infiltrados de células Th1/Th17 e regular positivamente as células Treg, seu efeito terapêutico na EM tem sido associado a secreção TGF- β , NO, IDO, TSG6, PGE2, IL-10, antagonista do receptor de IL-1 e uma variante antagônica da quimiocina CCL2 (CHEN; WANG; CAO, 2018).

As MSCs identificam sinais de perigo por meio dos TLRs, o TLR3 induz a um fenótipo anti-inflamatório e o TLR4 a um fenótipo pró-inflamatório, na fase inicial da inflamação, as MSCs agem realizando o recrutamento de neutrófilos, elas ativam então as células T secretando quimiocinas e assim recrutando mais linfócitos, nesse momento há baixos níveis de TNF- α e IFN- γ que não são capazes de secretar óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) eIDO e suprimir os linfócitos (JIANG; XU, 2020). Contudo, quando os níveis de TNF- α e IFN- γ estão altos as MSCs conseguem secretar iNOS eIDO inibindo as células T e induzindo as Treg, quando em ambiente inflamatório as MSCs podem ainda promover a mudança de fenótipo dos macrófagos de M1 para M2 por meio daIDO ePGE2 (JIANG; XU, 2020).

A capacidade terapêutica das MSCs é atribuída a sua capacidade de diferenciação, modulação do sistema imunológico e da secreção de moduladores imunológicos comoIDO, PGE2, iNOS, TGF- β , IL-10, HGF, ligante de quimiocina 2 (CCL2), HLA-G, CD39, CD73, galectinas, ligante de morte 1 programado (PD-L1) e ligante de morte 2 programado (PD-L2), heme oxigenase 1 (HO-1), TSG6 e antagonista do receptor de interleucina 1 (JIANG; XU, 2020; NORONHA et al., 2019).

1.1.7 Citocinas e Quimiocinas Pró-inflamatórias

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

É uma citocina produzida por macrófagos/monócitos de caráter inflamatório agudo, é uma proteína importante no combate de infecções e câncer, tem função de promover a necrose, apoptose celular, e imunoestimulação, tem ação na reprogramação de macrófagos de um estado reparador para um patogênico inflamatório na autoimunidade (WANG et al., 2022). O bloqueio da sua atividade poderia levar a uma melhora na neuropatia clínica, infiltração de nervos periféricos e desmielinização, o IFN- γ pode regular positivamente a expressão de TNF- α em macrófagos (WANG et al., 2022).

Interferon gama (IFN- γ)

O interferon é uma citocina com funções antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora, que apresenta três famílias de citocinas as do tipo I, tipo II e tipo III, nesse contexto o IFN- γ é o único membro da família de interferons do tipo II, cuja função é induzir a sensibilidade central e ativar a micróglia, é capaz de regular a dor e infecção através de modulações neuroimunes (TAN et al., 2021). O IFN- γ é secretado por células NK, células gliais e células T ativadas, durante a infecção ou inflamação do SNC, apresenta ação antiviral e é capaz de induzir ao fenótipo M1 dos macrófagos com liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-12, interleucina 23 (IL-23) e TNF- α (TAN et al., 2021).

Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)

O GM-CSF é uma citocina indutora de desenvolvimento de macrófago e monócito, desempenhando uma regulação de populações de células mieloides maduras em condições inflamatórias e não inflamatórias, são produzidos por células hematopoiéticas como linfócitos e células não hematopoiéticas como fibroblasto, durante reações inflamatórias/autoimunes (HAMILTON, 2019; USHACH; ZLOTNIK, 2016).

Sua expressão é induzida por citocinas como interleucina 1 alfa (IL-1 α), IL-1 β , TNF- α e IL-12 e é suprimida pela IL-4, IL-10 e IFN- γ , quando em ambientes inflamatórios o GM-CSF tem efeito pró-inflamatório fazendo o recrutamento, ativação e aumentando a sobrevivência de células mieloides, possui capacidade de mudar o fenótipo de macrófagos para pró-inflamatórios por meio de indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias(USHACH; ZLOTNIK, 2016).

Em doenças inflamatórias/autoimunes GM-CSF foi associado a células Th17, mas também podem ser produzidos por células Th1, Th2 e CD8+, sendo apontado em papel importante no “feedback positivo” de citocinas pró-inflamatórias, fundamentais nos distúrbios de doenças inflamatórias e autoimunes, dessa forma o bloqueio/neutralização de GM-CSF poderia ser uma ferramenta terapêutica útil em indivíduos com EM ou MUO por exemplo (USHACH; ZLOTNIK, 2016).

Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória presente em inflamações crônicas e doenças autoimunes multifatoriais, dentre as suas funções pode induzir a reações de fase aguda, atuar na maturação de linfócitos, estimular síntese e secreção de várias imunoglobulinas e induzir a proliferação de células T (KAUR et al., 2020).

Na EM a IL-6 encontra-se em níveis elevados no LCR e plasma em pessoas doentes, e essa interleucina induz a manifestações neuropatológicas como as destruição de substância cinzenta e branca, além de levar ao aumento na expressão de IL-17 promovendo a desmielinização axonal (KAUR et al., 2020). O bloqueio da IL-6 pode levar a supressão preventiva ou terapêutica do desenvolvimento da doença (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Interleucina 8 (IL-8)

A IL8 é chamada atualmente de (CXCL8), é uma quimiocina, produzida por diversas células incluindo monócitos, linfócitos e granulócitos em condições inflamatórias (HA; DEBNATH; NEAMATI, 2017).

A CXCL8 possui atuação pró-inflamatória, é estimulada por citocinas como IL-1, IL-6, CXCL12 e TNF- α , ela tem papel no recrutamento de neutrófilos e induz uma explosão oxidativa de neutrófilos e liberação de grânulos nas doenças neuroinflamatórias, ocorre um infiltrado de neutrófilos provocado pela quimiotaxia anormal mediada pela CXCL8, estando presente em níveis mais elevados em indivíduos doentes em comparação com saudáveis (HA; DEBNATH; NEAMATI, 2017).

Proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1 /CCL2)

A MCP-1 é também conhecida como CCL2 é uma quimiocina importante no processo inflamatório, levando a infiltração de células como monócitos e macrófagos e outras citocinas no ambiente inflamado (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021). A CCL2 desempenha um papel importante na progressão de processos neuroinflamatórios e na neurodegeneração, podendo

contribuir para a migração de células gliais para os locais de neuroinflamação potencializando essa resposta (GUTIÉRREZ et al., 2022).

São quimiocinas expressas por MSCs, além disso as MSCs secretam metaloproteinases que levam a clivagem das CCL2, tornando elas truncadas, dessa forma ela age como um antagonista de receptor de quimiocina C-C tipo 2 e inibe a migração de células imunes, o CCL2 truncado desempenha a supressão de autoimunidade pelas MSCs (JIANG; XU, 2020).

1.1.8 Citocinas Anti-inflamatórias

Interleucina 2 (IL-2)

A IL-2 é uma citocina que atua como fator de crescimento para as células T e NK, altos níveis de IL-2 *in vivo* promovem a expansão de células T citotóxicas e baixos níveis promovem a proliferação, sobrevivência e atividade funcional de células Treg, uma vez que a ausência de IL-2 leva a apoptose dessas células (MIZUI, 2019). Ela é também essencial para a formação de células efectoras e de memória, estratégias de modificações na IL-2 tem sido considerada para o tratamento de doenças autoimunes, com o intuito de aumentar o número de células Treg e minimizar a geração de células efectoras de memória e NK (ABBAS et al., 2018).

Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 possui funções anti-inflamatórias importantes, afim de limitar a resposta imune a patógenos e dessa maneira evitar danos ao hospedeiro, é expressa por células do sistema imune inato como CD, macrófagos, mastócitos, NK, eosinófilo e neutrófilos, ela tem a capacidade de inibir a resposta do tipo Th1 e suprimir a resposta do tipo Th2 (SARAIVA; O'GARRA, 2010).

É uma citocina que pode ser gerada pelas MSCs em sua forma quiescente, possuem a capacidade de inibir a maturação de células apresentadoras de antígeno, a expressão de MHC, proliferação de células T e formação de células T

de memória, suprir a geração de Th17 e promover a formação de Treg, a PGE2 pode estimular a produção de IL-10 pelas MSCs (JIANG; XU, 2020).

Indoleamina -2,3- dioxigenase (IDO)

A IDO tem duas isoformas a IDO1 e a IDO2, a IDO é responsável pela depleção do triptofano por meio da sua catalisação, esse por sua vez é essencial para a proliferação das células T, uma vez que ocorre a depleção do triptofano isso causa uma mudança da via metabólica da glicólise para a fosforilação oxidativa, e leva a supressão das células T (GAO et al., 2016; JIANG; XU, 2020). Além disso o triptofano reduzido provoca a ativação de controle geral não depressível 2 (GCN2) e fator de iniciação da tradução eucariótica (IF2) que promovem a redução da síntese de proteínas, inibição da proliferação celular e apoptose de linfócitos (GAO et al., 2016; JIANG; XU, 2020).

O GCN2 ativado causa a diferenciação de Treg e inibe a conversão de Th17 por regulação negativa de IL-6, os metabólitos do triptofano são tóxicos para as células Th1 e T citotóxicas e menos tóxicos para Th2, convertendo as células Th1 em Th2(JIANG; XU, 2020). A IDO é expressa por células apresentadoras de antígenos e podem ser expressas por MSCs como forma de mediar a supressão imunológica, no estado quiescente das MSCs elas não expressam IDO, no entanto o IFN- γ pode induzir sua expressão e o PGE2 potencializa-la(JIANG; XU, 2020).

1.1.9 Fatores neurotróficos

Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é uma neurotrofina com funções importantes no crescimento, desenvolvimento, e plasticidade das sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas, além de influenciar na neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica (COLUCCI-D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020). É responsável pela sobrevivência neuronal, plasticidade e regulação de neurotransmissores, formação de novas sinapses, ramificação dendrítica e modulação do perfil de neurotransmissores excitatórios e inibitórios(LIMA GIACOBBO et al., 2019).

A expressão de BDNF na neuroinflamação é controlada por diversos estímulos da sinalização inflamatória como estresse, lesão cerebral e sinais pró-inflamatórios, quando esses estímulos são ativados vários eventos culminam no mal funcionamento neuronal, apoptose e neurotoxicidade, como uma maneira de amenizar os efeitos deletérios o fator Kappa β (NF- $\kappa\beta$) é ativado induzindo a expressão de diversos genes pró e anti-apoptóticos como o BDNF, dessa forma o papel do BDNF na neuroinflamação é sua capacidade de ser induzido e induzir o NF- $\kappa\beta$ (LIMA GIACOBBO et al., 2019).

Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)

O HGF contém propriedades nos processos de neuroproteção e atenuação da neurodegeneração de oligodendrócitos e/ou remielinização, além de estar envolvido em processo de reparo cerebral pós-isquêmico, é um potente imunomodulador que inibe as funções das células dendríticas e promove a diferenciação das células Treg produtoras de IL-10, demonstrando potencial papel no tratamento de doenças desmielinizantes imunomediadas como a EM (BENKHOUCHE et al., 2010). Além disso é capaz de inibir a secreção de TGF- β , e esse por sua vez que é capaz de inibir a progressão da EAE (BENKHOUCHE et al., 2010).

As MSCs podem expressar HGF que é um fator de crescimento anti-apoptótico, com capacidade de reduzir a fibrose dos tecidos durante a regeneração, em humanos já se sabe que as MSCs por meio da secreção de HGF podem induzir monócitos a um fenótipo imunomodulador, suprimir as funções e proliferação das células T, mudando o perfil de Th1 para Th2, estimular a secreção de IL-10 por monócitos, além de inibir a atividade de CD e promover células Treg para IL-10 (CHEN et al., 2014; JIANG; XU, 2020).

Fator neurotrófico derivado das células da glia (GNDF)

O GNDF é responsável pela diferenciação, manutenção e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, sendo expresso pela micróglia (ALDHSHAN et al., 2022).

1.1.10 Prostaglandina E 2 (PGE2)

É produzida pela ciclo-oxigenase 1 (COX1) e ciclo-oxigenase 2 (COX2) a partir do ácido araquidônico, a PGE2 promove seu efeito anti-inflamatório por meio da interação com os receptores de prostaglandina 2 e receptor de prostaglandina 4 expressos na superfície de células imunológicas (JIANG; XU, 2020). Esses por sua vez levam a ativação do AMP cíclico (cAMP), que induz a expressão de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e IL-10 com propriedades anti-inflamatórias e inibe fatores pró-inflamatórios como interleucina 12p70, TNF- α , ligante de quimiocina 3, ligante de quimiocina 4 por meio da supressão da via da IL-2 (JIANG; XU, 2020).

Além disso ela promove a diferenciação dos macrófagos para o fenótipo M2 e Th2, ao mesmo tempo que inibe a proliferação de Th1, baixos níveis de PGE2 tem efeitos pró-inflamatórios por meio da maturação de células dendríticas e proliferação de células T e altos níveis levam a um efeito anti-inflamatório (GAO et al., 2016; JIANG; XU, 2020). As MSCs expressam COX2 e produzem PGE2, essa produção pode ser ainda mais estimulada por meio do TNF- α e INF- γ (JIANG; XU, 2020).

1.1. 11 *Priming* de MSCs

Embora o uso das MSCs tenha se mostrado promissor para o tratamento de diversas doenças, vários fatores têm reduzido sua eficácia, como o enxerto insuficiente, a baixa taxa de sobrevivência e a variação das células dependentes do doador (como idade, sexo, raça, condição física, etc.) (LEE; KANG, 2020). Com isso várias estratégias tem sido desenvolvidas para melhorar a eficácia terapêutica após o transplante das MSCs (LEE; KANG, 2020).

Dessa forma, surge a técnica de *priming* celular, também conhecida como pré-condicionamento com mediadores inflamatórios, podendo ser realizada por meio do tratamento com citocinas, modificação do meio de cultura, modificação genética e co-administração com materiais bioativos, a fim de aumentar a sobrevivência e *homing* das MSCs *in vivo*, por meio da indução de fatores envolvidos no tráfego de *homing* para o tecido alvo e na sobrevivência das MSCs (Figura 2) (LEE; KANG, 2020; NORONHA et al., 2019).

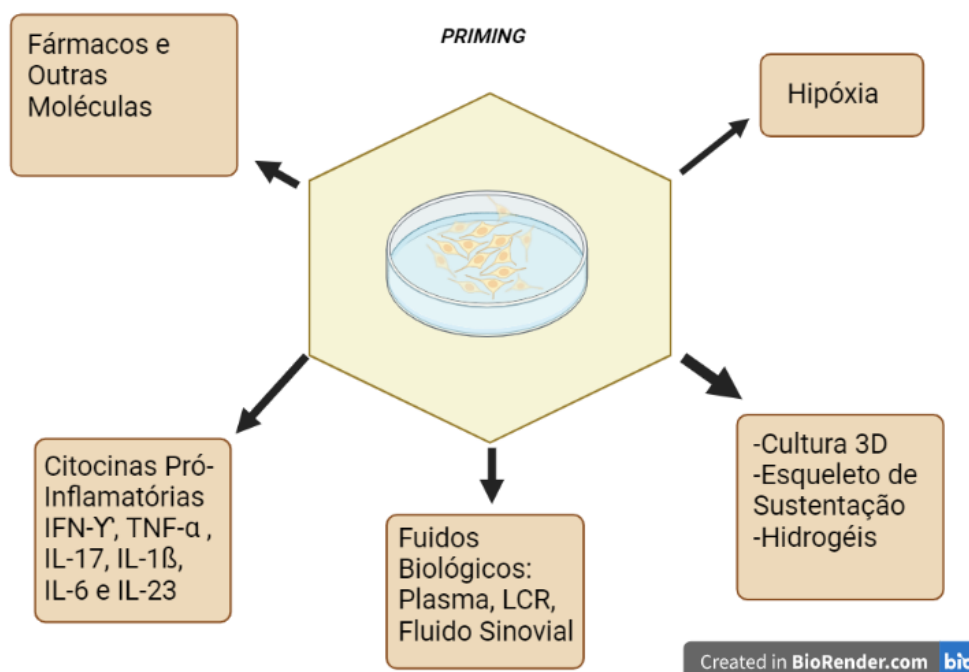


FIGURA 2. Esquema adaptado de (LI et al., 2022) demonstrando as possibilidades de técnica *priming*.

O *priming* de MSCs pode ser realizado com citocinas pró-inflamatórias ou fatores de crescimento com o objetivo de melhorar a função imunossupressora das MSCs e aumentar a secreção de fatores anti-inflamatórios e imunossupressores (NORONHA et al., 2019). Nessa técnica pode ser desenvolvida a partir do uso de IFN- γ (NORONHA et al., 2019) que já demonstraram reduzir os sintomas da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) quando comparado a o uso das MSCs sem a técnica *priming* (KIM et al., 2018).

Outro modelo é o uso de TNF- α que já demonstrou aumento na eficácia neuroprotetora nas células ganglionares da retina (MEAD et al., 2020), e a combinação de IFN- γ com TNF- α demonstrou um efeito sinérgico da atividade de IDO e produção de PGE2 (AMORIM et al., 2020). O uso da IL-17, combinado de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL-1 β , IL-6 e IL-23 também são descritas (NORONHA et al., 2019).

Outra técnica *priming* também realizada é a técnica por hipóxia celular caracterizada por breves episódios intermitentes de hipóxia ou anóxia, seguido pela reoxigenação celular com o intuito de melhorar a sobrevivência, proliferação e potencial de diferenciação das MSCs após o seu enxerto (MUSCARI et al., 2013). O uso de medicamentos farmacológicos ou agentes químicos tem sido usado como uma forma de melhorar o enxerto das MSCs e sua sobrevivência nos tecidos danificados, o uso de moléculas como o lipopolissacarídeo (LPS), melatonina, hormônio diidrotestosterona, oxitocina, curcumina, entre outras também é descrito (NORONHA et al., 2019).

O uso do sistema de cultura 3D é uma técnica que imita o microambiente natural *in vivo*, fornecendo interações célula-célula aprimoradas, essa técnica inclui cultura em esferoides multicelulares, esqueletos de sustentação e hidrogéis (LI et al., 2022). A formação de esferoide de MSCs pode ser realizada por meio da técnica de gota suspensa, abordagem de baixa fixação e agregação forçada e visa aumentar a proliferação, migração e eficácia de retorno das MSCs e aumentam a haste e facilita a diferenciação delas em diferentes linhagens celulares (LI et al., 2022).

No uso de esqueletos de sustentação, as células são ancoradas mecanicamente por meio das integrinas, proteínas transmembrana, essa técnica tem por objetivo fornecer o andaime necessário para o crescimento celular e nutrientes essenciais, e o cultivo de MSCs em hidrogéis de alginato apresentam um efeito imunodulador *in vitro* capaz de alterar o fenótipo de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório em M2 (LI et al., 2022).

Como técnica *priming* podemos citar a preparação das MSCs com drogas como ácido valpérico em combinação com lítio ou esfingosina-1-fosfato, ácido all-trans retinóico, por exemplo, podem aumentar o *homing*, mobilização e enxerto das MSCs, drogas imunossupressoras como rapamicina, ciclosporina e everolismo podem ser utilizadas para aumentar o efeito imunossupressor das MSCs (ALAGESAN et al., 2022).

Outras moléculas como LPS, melatonina, hormônio diidrotestosterona, oxitocina, curcumina, entre outros são citadas também como técnica *priming* (NORONHA et al., 2019). A modificação genética por métodos virais e não virais com o intuito de aumentar as propriedades terapêuticas e sobrevivências das MSCs também é descrito (ALAGESAN et al., 2022).

Ainda, o uso de fluidos biológicos tem se mostrado promissor; nessa linha, a utilização de plasma de pacientes com GVHD teve a capacidade de aumentar o efeito imunossupressor das MSCs se mostrando uma técnica próspera para o tratamento dessa doença (SILVA-CARVALHO et al., 2020). O uso de líquido sinovial a partir de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide aumentou a expressão de RNA mensageiro RNAm, IL-6 e IDO das MSCs (LEIJS et al., 2012).

Além disso, o uso de vesículas extracelulares das MSCs devido a sua capacidade terapêutica para doenças autoimunes e neurodegenerativas associado a sua melhor imunocompatibilidade e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica tem se mostrado uma ótima técnica alternativa ao uso das MSCs (ZHOU et al., 2021).

Hipótese

A estimulação *in vitro* das MSCs com INF- γ em associação com TNF- α , LCR ou soro de cães acometidos por MUO aumenta a expressão gênica e a secreção de fatores neurotróficos e citocinas anti-inflamatórias.

Objetivos

Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho é avaliar *in vitro* o efeito do *priming* com INF- γ + TNF- α , LCR ou o soro de cães com MUO, na expressão gênica e quantificação proteica de fatores neurotróficos e citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias das MSCs caninas.

Objetivos específicos

- Caracterizar as células estromais/tronco mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino (Ad-MSCs)
- Avaliar a viabilidade e a apoptose das MSCs caninas submetidas às diferentes técnicas de *priming* (INF- γ em associação com TNF- α , soro de cães hígidos, soro de cães com MUO, LCR de cães hígidos e LCR de cães com MUO).
- Avaliar a expressão gênica e o secretoma das MSCs caninas submetidas às diferentes técnicas de *priming* *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K. et al. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. **Science Immunology**, v. 3, n. 25, 2018.

ALAGESAN, S. et al. Enhancement strategies for mesenchymal stem cells and related therapies. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2022.

ALDHSHAN, M. S. et al. Glucose Stimulates Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Expression in Microglia through a GLUT5-Independent Mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 1–13, 2022.

AMORIM, R. M. et al. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: A promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

ANDERSEN-RANBERG, E.; BERENDT, M.; GREDAL, H. Biomarkers of non-infectious inflammatory CNS diseases in dogs — Where are we now? Part I: Meningoencephalitis of unknown origin. **Veterinary Journal**, v. 273, p. 105678, 2021.

ANDRZEJEWSKA, A.; LUKOMSKA, B.; JANOWSKI, M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. **Stem Cells**, v. 37, n. 7, p. 855–864, 2019.

BAKER, D.; AMOR, S. Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 3, n. 5, p. 555–564, 2014.

BARBER, R. M. et al. Identification of risk loci for necrotizing meningoencephalitis in Pug dogs. **The Journal of heredity**, v. 102 Suppl, p. 40–46, 2011.

BECKMANN, K. et al. A newly designed radiation therapy protocol in combination with prednisolone as treatment for meningoencephalitis of unknown origin in dogs: A prospective pilot study introducing magnetic resonance spectroscopy as monitor tool. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, 2015.

BENKHOUCHA, M. et al. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6424–6429, 2010.

CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. **Comparative Medicine**, v. 63, n. 3, p. 207–217, 2013.

CHEN, P.-M. et al. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 2, p. 295–303, 2014.

CHEN, X.; WANG, S.; CAO, W. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. **Cellular Immunology**, v. 326, p. 8–14, 2018.

COATES, J. R.; JEFFERY, N. D. Perspectives on meningoencephalomyelitis of unknown origin. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 44, n. 6, p. 1157–1185, 2014.

COLUCCI-D'AMATO, L.; SPERANZA, L.; VOLPICELLI, F. Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 1–29, 2020.

CONG, H. et al. Icariin ameliorates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating the major inflammatory signal pathways in a mouse relapse-remission model of multiple sclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, n. May, 2020.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, 2011.

COOPER, J. J. et al. Necrotizing meningoencephalitis in atypical dog breeds: A case series and literature review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 1,

p. 198–203, 2014.

CORNELIS, I. et al. Clinical presentation, diagnostic findings, prognostic factors, treatment and outcome in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin: A review. **Veterinary Journal**, v. 244, p. 37–44, 2019.

CORNELIS, I.; VOLK, H. A.; DE DECKER, S. Clinical presentation, diagnostic findings and long-term survival in large breed dogs with meningoencephalitis of unknown aetiology. **Veterinary Record**, v. 179, n. 6, 2016.

DA GAMA PEREIRA, A. B. C. N. et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, n. 6, p. 572–579, 2015.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DOSHI, A.; CHATAWAY, J. Doshi 2016. v. 16, n. 6, p. 53–59, 2016.

EBERLY, J. A. et al. Pathology in Practice. n. D, p. 361–363, [s.d.].

FARIVAR, S. et al. Neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by cerebrospinal fluid. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 9, n. 1, p. 87–93, 2015.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 1, 2016.

GENC, B. et al. Stem cell therapy for multiple sclerosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2019, n. 9, 2019.

GONÇALVES, R. et al. Inflammatory Disease Affecting the Central Nervous System in Dogs: A Retrospective Study in England (2010–2019). **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. January, p. 1–11, 2022.

GRANGER, N. et al. Clinical findings and treatment of non-infectious meningoencephalomyelitis in dogs: A systematic review of 457 published cases from 1962 to 2008. **Veterinary Journal**, v. 44, n. 3, p. 290–297, 2010.

GRANGER, N.; SMITH, P. M.; JEFFERY, N. D. Clinical findings and treatment of non-infectious meningoencephalomyelitis in dogs: A systematic review of 457 published cases from 1962 to 2008. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 290–297, 2010.

GREER, K. A. et al. Necrotizing meningoencephalitis of Pug Dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 2, p. 110–118, 2010.

GUTIÉRREZ, I. L. et al. CCL2 Inhibition of Pro-Resolving Mediators Potentiates Neuroinflammation in Astrocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, 2022.

HA, H.; DEBNATH, B.; NEAMATI, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. **Theranostics**, v. 7, n. 6, p. 1543–1588, 2017.

HAMILTON, J. A. Cytokines Focus GM-CSF in inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. 1–16, 2019.

HARRIS, V. K. et al. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 313, n. 1–2, p. 167–177, 2012.

HOFFMAN, A. M.; DOWB, S. W. Machine Translated by Google TRADUCIONAL E CLÍNICA Revisão Concisa: Testes com Células-Tronco Usando Modelos de Doenças de Animais de Companhia Machine Translated by Google. p. 1709–1729, 2016.

HU, W.; LUCCHINETTI, C. F. The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 4, p. 439–453, 2009.

IRIARTE, J.; KATSAMAKIS, G.; CASTRO, P. DE. Multiple Sclerosis multiple sclerosis. v. 51, n. January 2010, p. 169–180, 1999.

JIANG, W.; XU, J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell**

Proliferation, v. 53, n. 1, p. 1–16, 2020.

KAUR, S. et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, 2020.

KIM, D. S. et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . **EBioMedicine**, v. 28, p. 261–273, 2018.

KLINEOVA, S.; LUBLIN, F. D. Clinical course of multiple sclerosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1–12, 2018.

LEE, B. C.; KANG, K. S. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020.

LEE, J. et al. Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients as an optimal formulation for therapeutic application of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

LEIJS, M. J. C. et al. Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: An explorative in vitro study. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–7, 2012.

LI, M. et al. Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2022.

LI, N.; HUA, J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 13, p. 2345–2360, 2017.

LIMA GIACOBBO, B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 5, p. 3295–3312, 2019.

LOWRIE, M.; SMITH, P. M.; GAROSI, L. Meningoencephalitis of unknown origin: investigation of prognostic factors and outcome using a standard treatment protocol. **The Veterinary record**, v. 172, n. 20, p. 527, 2013.

MCGINLEY MP, GOLDSCHMIDT CH, R.-G. A. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. **Journal of the American Medical Association**, v. 325(, n. 8, p. 765–779, 2021.

MEAD, B. et al. TNF α -mediated priming of mesenchymal stem cells enhances their neuroprotective effect on retinal ganglion cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 61, n. 2, 2020.

MIZUI, M. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases. **Clinical Immunology**, v. 206, p. 63–70, 2019.

MUSCARI, C. et al. Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for applications in regenerative medicine. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2013.

NESSLER, J. N. et al. Canine Meningoencephalitis of Unknown Origin—The Search for Infectious Agents in the Cerebrospinal Fluid via Deep Sequencing. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. December, p. 1–6, 2021.

NORONHA, N. D. C. et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies (Stem Cell Research and Therapy (2019) 10 (131) DOI: 10.1186/s13287-019-1224-y). **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2019.

OH, J.; VIDAL-JORDANA, A.; MONTALBAN, X. Multiple sclerosis: Clinical aspects. **Current Opinion in Neurology**, v. 31, n. 6, p. 752–759, 2018.

PARK, E. S.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Comprehensive Immunohistochemical Studies on Canine Necrotizing Meningoencephalitis (NME), Necrotizing Leukoencephalitis (NLE), and Granulomatous Meningoencephalomyelitis (GME). **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 682–692, 2012.

PARK, E. S.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Th1-, Th2-, and Th17-Related Cytokine and Chemokine Receptor mRNA and Protein Expression in the Brain Tissues, T Cells, and Macrophages of Dogs With Necrotizing and Granulomatous Meningoencephalitis. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1127–1134, 2013.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 351–362, 2011.

PORTERO, M. et al. Cerebrospinal fluid and blood lactate concentrations as prognostic biomarkers in dogs with meningoencephalitis of unknown origin. **Veterinary Journal**, v. 254, 2019.

PRINZ, M.; JUNG, S.; PRILLER, J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. **Cell**, v. 179, n. 2, p. 292–311, 2019.

PROCACCINI, C. et al. Animal models of Multiple Sclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 182–191, 2015.

SAND, I. K. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 3, p. 193–205, 2015.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SCHRAUWEN, I. et al. Identification of novel genetic risk loci in maltese dogs with necrotizing meningoencephalitis and evidence of a shared genetic risk across toy dog breeds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

SILVA-CARVALHO, A. É. et al. GVHD-derived plasma as a priming strategy of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 107598, 2021.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R.; 2016. Immunology of multiple sclerosis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 7, n. 4, p. 285–292, 2007.

STEE, K. et al. Cytosine arabinoside constant rate infusion without subsequent subcutaneous injections for the treatment of dogs with meningoencephalomyelitis of

unknown origin. **Veterinary Record**, v. 187, n. 11, p. 98, 2020.

SUZUMURA, A. Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, v. 6, n. 3, p. 225–231, 2015.

TALARICO, L. R.; SCHATZBERG, S. J. Idiopathic granulomatous and necrotising inflammatory disorders of the canine central nervous system: A review and future perspectives. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, n. 3, p. 138–149, 2010.

TAN, P. H. et al. Interferons in Pain and Infections: Emerging Roles in Neuro-Immune and Neuro-Glial Interactions. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. November, p. 1–14, 2021.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. patterns (DAMPs), which are released from damaged or dying cells in noninfectious inflammations such as burn or trauma, directly or indirectly promote inflammation. During sterile surgical operations, an increase in serum IL66 levels precedes elevation of. v. 6, n. Kishimoto 1989, p. 1–16, 2014.

THE LANCET NEUROLOGY. Multiple sclerosis under the spotlight. **The Lancet Neurology**, v. 20, n. 7, p. 497, 2021.

TORRE-FUENTES, L. et al. Experimental models of demyelination and remyelination. **Neurologia**, v. 35, n. 1, p. 32–39, 2020.

USHACH, I.; ZLOTNIK, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 3, p. 481–489, 2016.

VASANTHAPRASAD, V. et al. Systematic literature review and meta-analysis of the prevalence of secondary progressive multiple sclerosis in the USA, Europe, Canada, Australia, and Brazil. **BMC Neurology**, v. 22, n. 1, p. 1–20, 2022.

WANG, Y. et al. Pathogenic TNF- α drives peripheral nerve inflammation in an Aire-deficient model of autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 4, p. 1–13, 2022.

YANWU, Y. et al. Mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 44, n. May, p. 102200, 2020.

ZEIRA, O. et al. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: Safety, feasibility and preliminary clinical findings. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2015.

ZHOU, T. et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1–24, 2021.

CAPÍTULO 2

2. TRABALHO CIENTÍFICO

O trabalho será enviado para a revista “Stem Cell Research and Therapy”

Normas de Publicação:

<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research>

Priming with INF- γ and TNF- α enhances the immunomodulatory potential of canine mesenchymal stem cells in vitro

Abstract

Background: Among neuroimmune diseases, multiple sclerosis (MS) is a neuroinflammatory disease responsible for physical disability in young adults. Meningoencephalitis of unknown origin (MUO) has been considered an important naturally occurring model for the study of multiple sclerosis. Therefore, mesenchymal stem cells (MSC), based on their immunomodulatory effects, have become a therapeutic strategy for neuroimmune diseases. As a great alternative to potentiate its immunomodulatory effect is MSC priming, which can be performed using cytokines and biological fluids. The goal of this study is to evaluate the in vitro priming with IFN- γ + TNF- α , liquid cerebrospinal fluid (CSF) or serum from dogs with MUO, in its ability to modify the polarization profile and secretome of such cells, what may in turn be applicable to treat neurodegenerative diseases such as MS.

Methods: Isolation and characterization of tissue-derived MSCs were performed in canine adipose tissue (cAd-MSCs), the viability and apoptosis of these cells and cAd-MSCs were evaluated in six groups: control (C), IFN- γ (50 ng/mL) in association with TNF- α (50 ng/mL) (IFN- γ + TNF- α), control serum (C-S), serum from dogs with MUO (MUO-S), control CSF (C-CSF) and CSF from dogs with MUO (MUO-CSF). Afterwards, the viability and morphology of the cAd-MSCs were evaluated after stimulation, and the gene expression of BDNF, GDNF, HGF, IDO, PTGE2, IL-10, IFN- γ and TNF- α in Ad-MSCs was analyzed by RT-qPCR and the protein secretion of GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-8 and MCP-1 by multiplexed assay.

Results: There was no impairment in the viability of Ad-MSCs in any priming group, but the IFN- γ + TNF- α , MUO-S and MUO-CSF groups showed better viability than the other groups ($p = <0.005$). Comparing all groups with group C the IFN- γ + TNF- α group had higher HGF, IDO and TNF- α gene expression and higher IL 8 protein quantification ($p = <0.001$), C-CSF and MUO-CSF groups had increased gene expression of IFN- γ and TNF- α and reduced gene expression of BDNF and GDNF ($p = <0.001$), while the C-S and MUO-S groups had reduction in IL-10 protein quantification and the C-S group had a reduction in BDNF and GDNF gene expression and the MUO-S group had lower HGF gene expression ($p = <0.001$).

Conclusions: In vitro priming with TNF- α + IFN- γ modulated the cAd-MSC towards an antiinflammatory profile that may in turn be translated to the disease clinic. This technique has the potential for better investigation of the inflammatory behavior and therapeutic purposes of neuroimmune diseases.

Keywords: autoimmune, interleukins, meningoencephalitis, multiple sclerosis.

Background

Neuroimmune diseases emerge from dysregulation of the innate and/or adaptive immune system, leading to an inflammatory response directed at the components of CNS cells; infections or other antigens are considered factors that trigger this inflammatory process by causing dysregulation of self-tolerance, with consequent lymphocyte overstimulation (1,2).

In humans, multiple sclerosis (MS) is considered a chronic disease, neuroinflammation of the brain and spinal cord and is often responsible for physical disability in young adults(3). The clinical manifestation is provoked by immune cell infiltration across the blood–brain barrier, promoting inflammation, demyelination, gliosis and neuroaxonal degeneration(3). It affects approximately 5 to 300 people in each 100,000 inhabitants throughout the world, being more common in women with an average age of 20 to 30 years (4).

Meningoencephalitis of unknown origin (MUO) is a general term used to refer to granulomatous meningoencephalitis (GME), necrotizing meningoencephalitis (NME) and necrotizing leukoencephalitis (NLE), which are histopathological subtypes that are differentiated just postmortem (2). Despite presenting an unknown epidemiology, MUO represents one of the main causes of CNS inflammatory diseases in dogs; in England, MUO was responsible for 47.5% of inflammatory diseases that affect the CNS in these animals (5).

MS and MUO profile neuroinflammation, although not fully elucidated, are similar. They are characterized by infiltrates of macrophages, followed by TCD8+ and TCD4+, B cells and plasmocytes, with T helper (Th) 1 and Th17 lymphocytes being the most active in the pathogenesis of these diseases (2,3). These cells secrete high levels of interferon gamma (IFN- γ), interleukin 17 (IL-17) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), leading to microglial activation (2,3).

c(2,3).

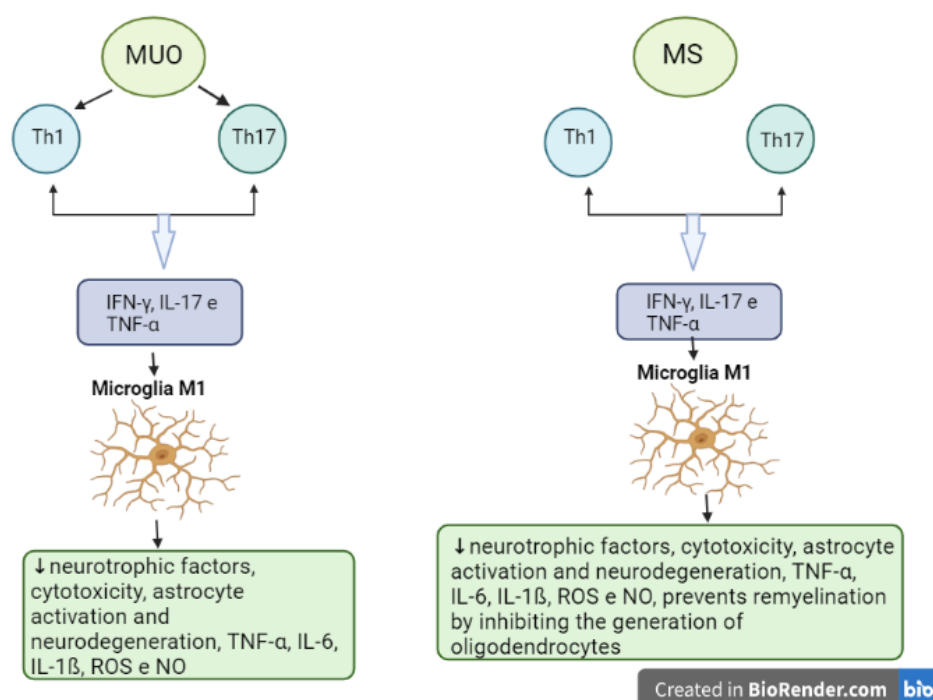


FIGURE 3. Scheme represents MUO and MS neuroinflammation.

Given the uncertainties still present in the etiopathogenesis of MS, the model for understanding and developing new therapeutic options that has been proposed is experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced in mice; however, this model does not comprise all MS particularities (6).

Thus, MUO, as it affects more female than male, presents a condition of neuroinflammation, a multifactorial pathogenesis, with an autoimmune basis involving genetic and nongenetic factors, demonstrating characteristics that resemble MS (3,6,7). When in the acute fulminant form MS resembles MEN, one subtype of MUO (7).

Another relationship observed is that in severe MS variants, there is extensive brain necrosis, cavitation or swelling and manifestation of mild and diffuse cerebral lesions, resulting in death within weeks to months, as in MUO; therefore, MUO disease similar to MS in human was appointed as a natural animal model for this disease (3,6,7).

Neuroimmune diseases have a poor prognosis; however, there are treatments aimed at improving the quality of life of patients and decreasing long-term disability through immunosuppressive drugs that, in addition to producing adverse effects, do not prevent degenerative processes of the CNS; therefore, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) is indicated as an alternative therapeutic for CNS autoimmune diseases (8).

The use of MSCs as a treatment for neuroimmune diseases has shown positive effects in experimental models due to their immunomodulatory and neuroprotective properties(9). However, even with good results, several factors can influence MSC effectiveness, such as the low survival rate, in vitro senescence, functional quiescence after application and variation of donor-dependent cells (such as age, sex, race, etc.) (10).

In view of this, several strategies have been proposed to optimize MSC therapeutic potential, such as priming techniques, including hypoxia, 3D spheroid

culture, use of pro-inflammatory cytokines, pharmacological drugs, use of molecules such as melatonin and turmeric and biological fluids (11,12).

The use of biological fluid MSC priming techniques, such as plasma, synovial fluid and cerebrospinal fluid (CSF), has already been suggested as a good option to enhance MSC immunomodulatory and neuroprotective effects (13–15).

Therefore, the objective was to evaluate the effect of priming with IFN- γ and TNF- α , CSF and dog serum from canine adipose tissue (cAd-MSCs) with MUO, herein we demonstrate that the priming of cAd-MSCs modifies the polarization profile and secretome of such cells, what may in turn be applicable to treat neurodegenerative diseases such as MS.

Methods

All experimental procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of the São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu (protocol nº 0171/2021). Collecting blood and CSF were collected from dogs naturally affected by MUO treated at the FMVZ Veterinary Neurology Service Unesp, and collection of canine adipose tissue was performed according to the free and informed consent of the animal owners.

Experimental Design

Adipose tissue was collected from healthy dogs (n=5) for mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue (cAd-MSC) isolation (description below), differentiation and characterization.

cAd-MSCs five lineages were used to prime six groups in duplicate: control (C) cultured with standard culture medium only; IFN- γ in association with TNF- α (IFN- γ + TNF- α), with standard culture medium plus IFN- γ (50 ng/mL) (17) in combination with TNF- α (50 ng/mL) (17); control serum (C-S) cultured with standard culture medium supplemented with 10% processed serum from healthy dog blood; serum

from dogs with MUO (MUO-S), cultivated with standard culture medium with 10% serum processed from dog serum with MUO; control CSF (C-CSF), cultivated with standard culture medium added with 10% of CSF collected from healthy dogs and MUO (MUO-CSF), cultivated with standard culture medium added with 10% CSF collected from dogs with MUO.

Priming was completed in 72 hours, and cAd-MSCs were observed for their morphology at zero hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours. cAd-MSC viability was determined after 72 hours, and cAd-MSC gene expression of BDNF, GDNF, HGF, IDO, PTGE2, IL-10, IFN- γ and TNF- α was analyzed by qPCR and protein secretion of GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-8 and MCP-1 by multiplexed assay.

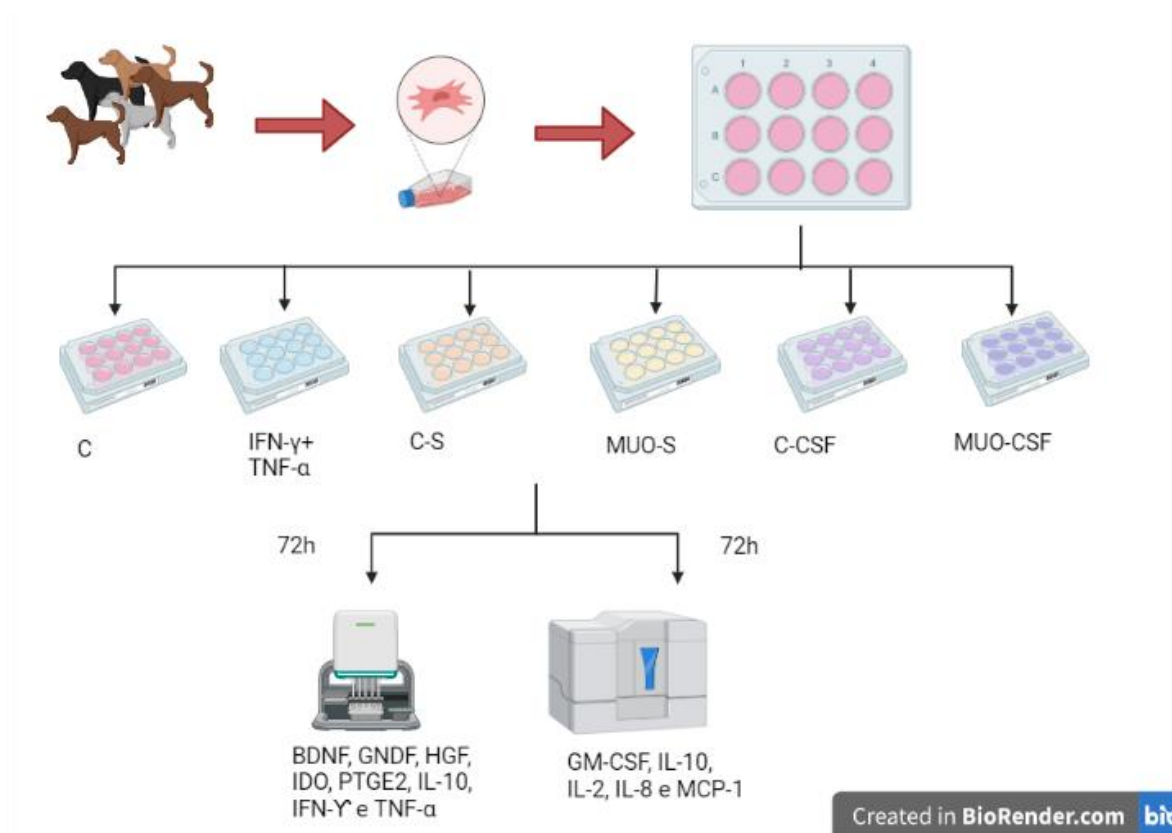


Figure 4. Experimental design. cAd-MSCs were isolated from 5 dogs, priming was carried out in 6 groups (control (C), IFN- γ (50 ng/mL) in association with TNF- α (50 ng/mL) (IFN- γ + TNF- α), control serum (C-S), serum from dogs with MUO (MUO-S),

control CSF (C-CSF) and CSF from dogs with MUO (MUO-CSF)), and after 72 hours, cAd-MSC gene expression for BDNF, GDNF, HGF, IDO, PTGE2, IL-10, IFN- γ and TNF- α was determined by qPCR, and protein secretion of GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-8 and MCP 1 was determined by multiplexed assay.

Canine Adipose Tissue Collection, Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Canine Adipose Tissue (cAd-MSCs)

Adipose tissue samples were collected from healthy females aged 6 to 60 months weighing between 10 and 20 kg who were undergoing elective ovariohysterectomy based on previously published studies (17).

After general anesthesia under aseptic conditions, up to 2 grams of adipose tissue was collected from the abdominal inner wall, which was conditioned with 20 mL of Dulbecco's solution phosphate buffered saline (DPBS), 3% penicillin (10,000 units/mL) with streptomycin (10,000 μ g/mL) and 0.5% amphotericin B (250 μ g/mL) (all from Nova Biotechnologia™, São Paulo, Brazil). The samples were then stored refrigerated at 4°C for up to 24 hours. Therefore, the canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (cAd-MSC) isolation protocol was initiated as previously described (17–19) with modifications.

Concurrently to the adipose tissue, 2 mL of blood was collected from the jugular vein to perform qPCR for pathogens: *Distemper virus*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Cryptococcus* sp., *Ehrlichia* sp. and *Babesia canis*. For MSC isolation, enzymatic digestion was performed with collagenase IA (2 mg/mL) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C in a humid atmosphere containing 95% air and 5% CO₂ for 4 hours. The enzyme was blocked with standard culture medium containing 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% fetal bovine (SFB), 1% penicillin (10,000 units per mL) with streptomycin (10,000 μ g/mL) and 0.5% amphotericin B (250 μ g/mL) (all from Nova Biotechnologia™, São Paulo Brazil).

The suspension was centrifuged, and the pellet was resuspended in 2 mL of standard culture medium and cultured and incubated in an oven at 37°C° in a humid

atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. The isolated cells (passage zero, P0) were subjected to enzymatic dissociation after confluence reached 80-90%. For the formation of the cAd-MSC bank in different passages, the protocol was carried out until several passages 1 to 3 (P1-P3) were obtained.

For cryopreservation, the cAd-MSCs were submitted to the trypsin protocol after reaching 80% confluence, as described above. One milliliter of freezing medium consisting of 90% FBS (Nova Biotecnologia™, São Paulo, Brazil) and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) was used. The suspensions were conditioned cells in a -80°C freezer for 24 hours, followed by permanent storage in liquid nitrogen.

cAd-MSCs were characterized by differentiation into osteogenic and adipogenic strains and chondrogenic and immunophenotypic analysis by flow cytometry according to previously described methods (20–22). The differences were carried out according to the manufacturer's instructions (StemPro® Adipogenesis, Osteogenic, Chondrogenic Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA). cAd-MSC strains Immunophenotypic analysis was performed at passages P2-P3 in reactions containing the following conjugated antibodies: CD 45 (FITC Rat anti-dog, 11-5450-42) (eBioscience, *Invitrogen*™, Waltham, Massachusetts, USA), CD 14 (APC Mouse anti-human, 561708) (BD, Pharmigen™, San Diego, CA, EUA), CD 29 (APC Mouse anti-human, 17-0299-42) (eBioscience, *Invitrogen*™, Waltham, Massachusetts, USA), HLA-DR MHC II (FITC, Mouse anti-human, 555560) (BD, Pharmigen™, San Diego, CA, EUA), CD44 (PE anti-mouse, 561860) (BD, Pharmigen™, San Diego, CA, EUA), and CD34 (PE Anti-dog, 559369) (BD, Pharmigen™, San Diego, CA, EUA).

The analyses were performed on a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Company, San Jose, USA), standardizing a total of 3x10⁴ events per tube, and the data were evaluated with the software Cell Quest Pro and FlowJo® (Becton Dickinson Company, San Jose, USA).

Cell Viability and Apoptosis Rate of the MSC Bank

The evaluation of the cAd-MSC bank viability and proliferation was carried out, and the analysis of the four cAd-MSC strains (n=4), out of the five belong to the cell bank, in the P3-P4 passage was performed in reactions containing Annexin (APC, 550475) (BD, Pharmingen™, San Diego, CA, EUA) and propidium iodide (FITC, BMS500PI) (eBioscience, *Invitrogen*™, Waltham, Massachusetts, USA).

The analyses were performed in a BD flow cytometer (Becton Dickinson Company, San Jose, USA), standardizing a total of 3×10^3 events per tube, and the data were evaluated with the software Cell Quest Pro and FlowJo® (Becton Dickinson Company, San Jose, USA).

CSF Collection and Canine Serum Processing

CSF and blood were collected from healthy dogs and with MUO in the cistern magna and jugular vein, respectively, and then the blood was centrifuged for 10 minutes at 1500 r.p.m. to serum separation. In these animals, the quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) test was performed with the CSF for viral pathogens: Distemper, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Cryptococcus* sp., *Ehrlichia* sp. and *Babesia canis*. CSF and serum were stored frozen at -80°C until priming. As inclusion criteria, the dogs in the group with MUO were selected based on previously established definitions (16) (Supplementary material).

Before priming, the collected CSF and serum samples were separately submitted to an evaluation of cytokine protein expression to determine the inflammation profile of each sample to priming. Quantification of protein expression of cytokines IL-6, interleukin 8 (IL-8), interleukin 10 (IL-10), GM-CSF and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was performed using the assay panel multiplexado MILLIPLEX® (CCYTOMAG-90K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

cAd-MSC Cellular Metabolic Activity Rate after Cultivation with CSF and Canine Serum

Concentrations with CSF and serum of 5%, 10%, 15% and 20% were tested regarding MSC metabolic activity to establish the best ratio for the experiment (Supplementary material).

The cAd-MSCs were submitted to culture medium with canine blood serum and canine CSF at different concentrations for a period of 72 hours for analysis. At the end of the treatment period, the medium was removed, and the cAd-MSCs were incubated in MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide) solution for 4 hours at 37°C in a humid atmosphere containing 95% air and 5% CO₂.

After removing the MTT solution, the cells were homogenized with 200 µL of DMSO, and the absorbance was analyzed at 570 nm in an Asys Expert Plus® microplate reader (BioChrom). Thus, the concentration of 10% CSF and canine serum for priming was standardized.

cAd-MSC Priming

Samples collected from control CSF (C-CSF), CSF from dogs with MUO (MUO-CSF), control serum (C-S) and serum from dogs with MUO (MUO-S) were analyzed for cytokines IL-6, interleukin 8 (IL-8), interleukin 10 (IL-10), GM-CSF and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) used in priming cAd-MSCs (Supplementary Material).

Ad-MSCs were divided into 6 priming groups: nonstimulated cells grown in standard control culture medium (C); stimulated cells in médium standard culture (previously described) with IFN-γ (50 ng/mL, Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA) in combination with TNF-α (50 ng/mL, Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA) as per described (17) (IFN-γ+ TNF-α); cells stimulated with standard culture medium with 10% control healthy animal serum (C-S); cells stimulated with medium standard culture with 10% canine serum from animals with MUO (MUO-S); cells stimulated with standard culture medium with 10% (100 µ/mL) canine CSF control, animals with

no history of neurological disease (C-CSF) and cells stimulated with standard culture medium with 10% canine CSF from animals with MUO (MUO-CSF).

Aliquots of the cAd-MSC lineage (n=5) in P3 from the MSC bank were submitted to the 6 priming groups. The aliquotes were submitted to rapid thawing, plating and expansion in standard culture medium. A total of 1×10^4 cells/cm² were plated per well in a 24-well adherent plate, with 0.5 mL of total volume of standard culture in duplicate. After reaching 70-80% confluence, the cells were primed for 72 hours. Then, the conditioned medium was collected.

For the secretory profile study of soluble factors, conditioned medium was collected and cryopreserved at -80°C until further analysis. Next, 400 µL of TRIZOL was added (TRIzol™, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brazil) and homogenized to loosen the cells. Then, the cAd-MSCs were collected and cryopreserved at -80°C until further analysis.

Cell Viability Analysis of cAd-MSC Priming

At the same time, as priming, five cAd-MSC lineages (n=5) in P3 from the MSC bank were analyzed for cell viability in the 6 priming groups. After 72 hours of priming, the total cell number was counted, and the cell viability of the 6 groups was determined using a 0.4% trypan blue solution (Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) and a Neubauer chamber.

Gene Expression of Anti-inflammatory Cytokines and Neurotrophic Factors Instimulated and Control cAd-MSCs

The gene expression profile of neurotrophic factors was evaluated using RT-qPCR on cAd-MSCs. Ribonucleic acid (RNA) was extracted from the total number of Ad-MSCs after priming using a TRIzol hybrid method (TRIzol™, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brazil) and chloroform, followed by the RNA extraction kit Mini RNAeasy™ (Qiagen, São Paulo, Brazil).

The RNA yield was determined by spectrophotometry with the Thermo Scientific NanoDrop 2000 equipment (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA).

The RNA is diluted obtaining a volume of 10 µL for all samples. Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis was performed with reagents from the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions and reverse transcription for obtaining the cDNA with the Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific), under the following thermocycling conditions: 10 minutes at 25°C; 12 minutes at 37°C; and 5 minutes at 85°C. The cDNA obtained was diluted with RNA-free water to a total volume of 110 µL. Samples were cryopreserved at -80°C until subsequent analysis by Quantitative Real Time Polymerization Reaction (qPCR). 2 µL of cDNA and the enzyme PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania) and the thermal cycler QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific) were used. The canine primers used were drawn as stated in the GeneBank® database (Table 1).

Six canine reference genes were studied, corresponding to the enzyme prostaglandin endoperoxidase synthase 2 (PTGES2); anti-inflammatory cytokines IDO and IL-10; and neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor (BDNF), brain-derived neurotrophic factor (GDNF) and hepatocyte growth factor (HGF). Three endogenous canine genes were used, which corresponded to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), ribosomal protein S5 (RPS5), and ribosomal protein S19 (RPS19).

TABLE 1. Primers used in qPCRs. PTGES2, prostaglandin endoperoxidase synthase 2. IDO, indoleamine-2,3-dioxygenase. IL-10, interleukin-10. BDNF, brain-derived neurotrophic factor. GDNF, derived neurotrophic factor from glia. HGF, hepatocyte growth factor. HPRT, guanine hypoxanthine phosphoribosyltransferase. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. RPS5, S5 ribosomal protein. RPS19, ribosomal protein S19.

Initiator	Sequence (5' -> 3')
BDNF	(F) GTGTCTGAAAGGCCAACTGAAG
	(R) CGTGTAACCCATGGGATTGC

GDNF	(F) GGTTTGCTACAGCCAGCAGTT
	(R) CGCACCATGTTCAAAATCCA
HGF	(F) ATGGTTCTTGGCGTCATTGTT
	(R) AATGCCAGGACGATTTGGAA
IL-10	(F) CCCAGGATGGCAACTCTTCTC
	(R) CGGGATGGTATTTTGCAGATC
IDO	(F) TGTGGACCCAAGCACGTTTT
	(R) AGTTGCCTTTCCAACCAGACA
PTGES2	(F) GCCTGCAGCTGACCCTGTA
	(R) CACGGACCTTGCTGCAGAA
INF- γ	(F) TCT CAC CAA GAT CCA ACC TAA GG
	(R) TGC GGC CTC GAA ACA GA
TNF- α	(F) TGG AAT CAT TGC CCT GTA AGG
	(R) TGA TCA AAG GGT CGG TTT GG
HPRT	(F) CGGCTTGCTCGAGATGTGAT
	(R) GCACACAGAGGGCTATGT
RPS5	(F) GAGGCCTCAGGCTGTGCAT
	(R) AGCCAAATGGCCTGATTCAC
RPS19	(F) GGGTCCTCCAAGCCCTAGAG
	(R) CGGCCCCCATCTTGGT

Secretion Profile of Soluble Factors from the Conditioned Medium of cAd-MSC Priming and Controls

The quantification of protein expression was performed using the cAd-MSC culture supernatants using the multiplex assay panel MILLIPLEX® (CCYTOMAG-90K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The soluble factors GM-CSF, MCP-1, IL-2, IL-8 and IL-10 were quantified in the medium conditioning of cAd-MSC cell cultures in the control group and priming groups.

The test was carried out according to the manufacturer's instructions and the MAGPIX® 200™ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) analyzer. The collected images were quantified with Luminex xPONENT® 4.3 software, and the subsequent plotting of the standard curves and data analysis were performed with MILLIPLEX® Analyst 5.1 software.

Analysis of Results

For nonparametric variables, the Kruskal–Wallis test was applied followed by Dunn's test to compare the median of each group within the same source, and Tukey's test was used to compare the medians of sources within each group. Repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to compare the averages within each group. Statistical differences were considered when $p < 0.05$. Analyses were performed using the Sigma Stat 3.5 program.

Results

cAd-MSC Isolation, Cultivation, Characterization, Viability and Apoptosis

Ad-MSC strains ($n = 5$) reached 80-90% confluence at 7 days of culture. All strains showed adhesion to the surface of the vial of culture and fibroblastoid morphology (Figure 5). After reraising, the Ad-MSCs in passages P1-P3 reached 80% confluence in 5-6 days of culture.

The Ad-MSC strains showed the ability to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic cells in vitro (Figure 5).

cAd-MSC immunophenotypic analysis (Figure 5) demonstrated the expression of the surface antigens CD29: 99.62% and CD44: 99.19%, associated with cells of mesenchymal origin, and did not express the antigens hematopoietic CD45: 2.04%, CD14: 1.71%, CD34: 1.59%, and the HLA-DR antigen (MHC class II): 1,71%.

The strains of As-MSCs in passage P3 presented an average viability of 97.6% (dog 1), 97.8% (dog 2), 99.22% (dog 3), 98.04% (dog 4) and 98.8% (dog 5), with late apoptosis rates of 1.19%, 1.04%, 0.5%, 0.89% and 0.93%, early apoptosis rates of 0.25%, 0.14%, 0.6%, 0.15% and 0.25% and cellular necrosis rates of 0.96%, 1.03%, 0.22%, 0.93% and 0.74%, respectively (Figure 5) (Supplementary material).

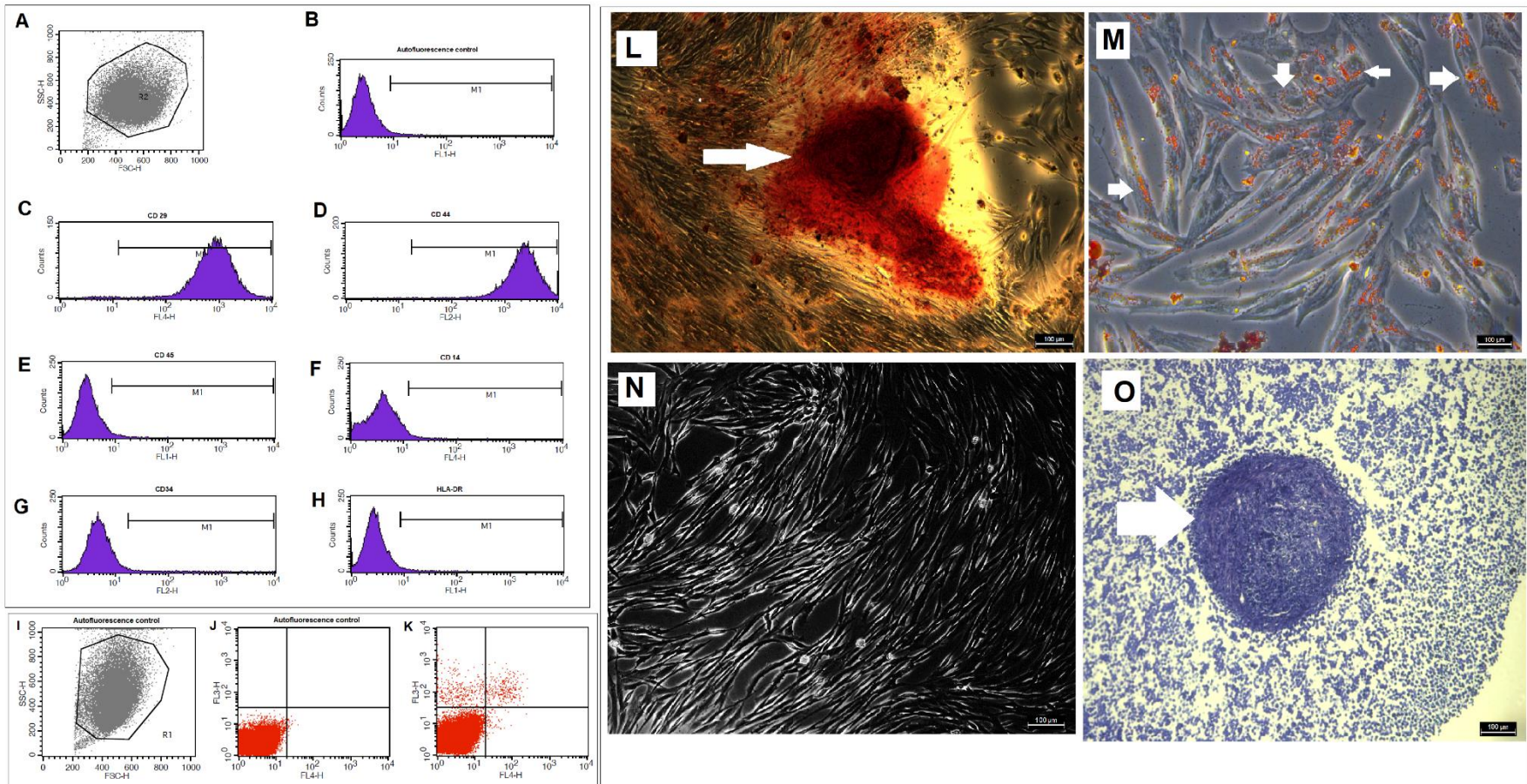


Figure 5. cAd-MSC immunophenotypic analysis (A-H), cAd-MSC viability and apoptosis (I-K) and cAd-MSC ability to differentiate (L-O). Gate (A) of the cAd-MSCs analyzed (cell size versus granularity), control autofluorescence (B), and the histograms followed by the percentage of markers: CD29: 99.62% (C), CD44: 99.19% (D), CD45: 2.04% (E), CD14: 1.71% (F), CD-34: 1.59% (G), HLA-DR (MHC class II): 1.71% (H). Differentiation osteogenic (L) after 21 days, through calcified

matrix and trabeculae formation (Alizarin Red S staining) indicated by the white arrow, 10x magnification; Adipogenic differentiation (M) after 14 days, by the formation of lipid deposits intracytoplasmic or lipid droplets (Oil Red O stain), indicated by white arrows, 10x magnification; Appearance microscopic analysis of canine Ad-MSCs after isolation (N); Chondrogenic differentiation (O) by micromass formation and presence of extracellular matrix glycosaminoglycans (Toluidine Blue staining and Hematoxylin Eosin), indicated by the white arrows, 10x magnification. Osteogenic, adipogenic and chondrogenic scale bars, 100 μm . Gate (I), control autofluorescence (J) and cell viability (K). The histogram (K) shows cell viability in the lower left quadrant, early apoptosis (annexin) in the upper left quadrant, late apoptosis (propidium iodide) in the lower right quadrant and cell necrosis in the upper quadrant.

cAd-MSC Priming

cAd-MSCs five lineages in duplicate, after 72 hours of culture in 24-well plates, 80-90% confluence was observed in the cAd-MSC priming and control groups. cAd-MSCs demonstrated the formation of cellular aggregates in the IFN- γ + TNF- α group compared to C group. The cAd-MSCs in the C-S and MUO-S groups showed a more rounded cell morphology with growth in the cell cluster with the presence of few spaces filled by cells in comparison with the C group, and the cAd-MSCs in the C-CFS and MUO-CSF groups showed a more fusiform shape compared to C group (Figures 6, 7 and 8).

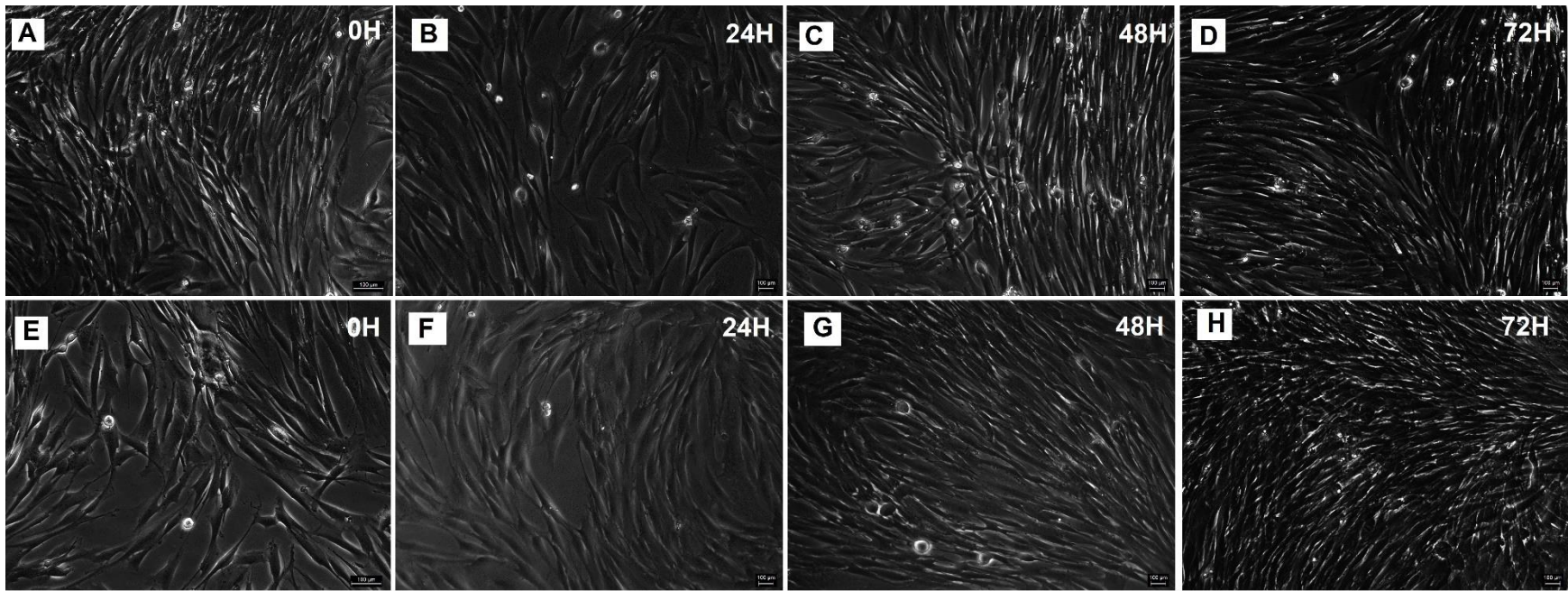


FIGURE 6. Control and *priming* with INF- γ and TNF- α of cAd-MSCs. Group C (A, B, C and D) at 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) and 72 h (D) showed a smaller cell cluster than the cells of the IFN- γ + TNF- α group (E, F, G and H). Morphology of the cAd-MSCs of the IFN- γ + TNF- α group at 0 h (E), 24 h (F), 48 h (G) and 72 h (H). 20x magnification. Scale bar, 100 μ m.

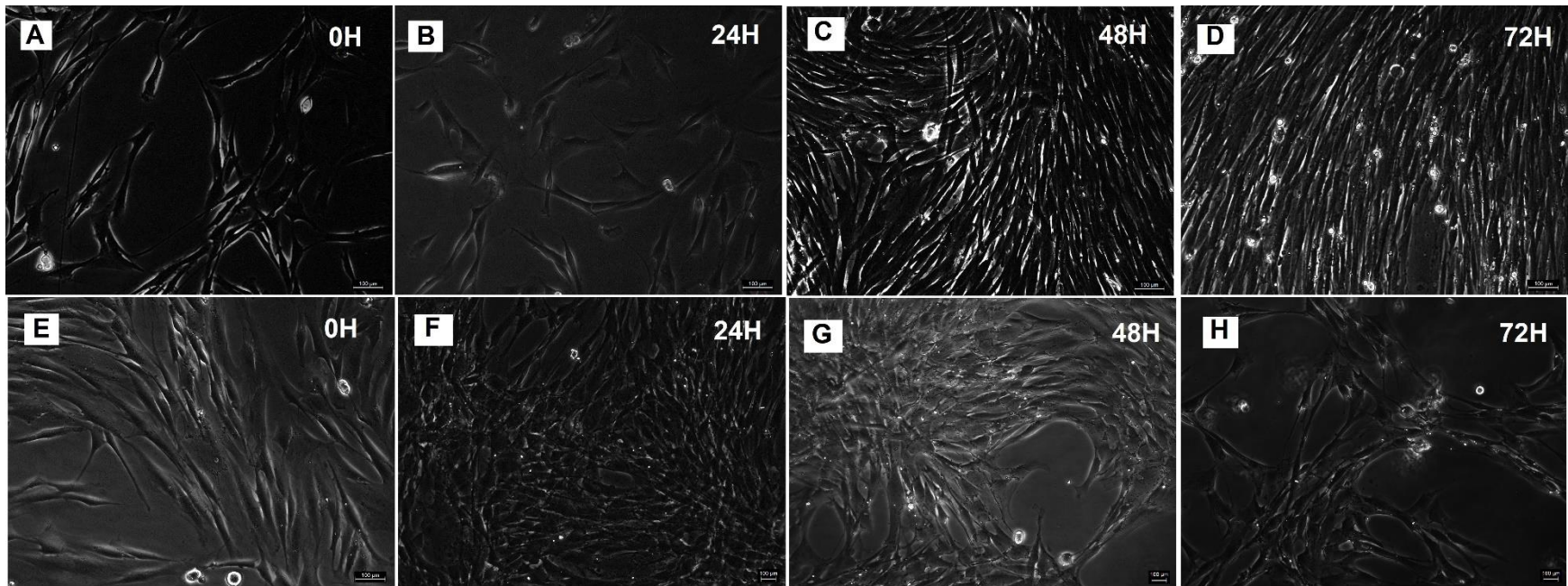


Figure 7. cAd-MSC priming with healthy and MUO dog serum. Groups C-S (A, B, C and D) at 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) and 72 h (D) and the MUO-S group at 0 h (E), 24 h (F), 48 h (G) and 72 h (H) both showed a less fusiform morphology than group C, with growth in clusters with spaces between cell groups, with or without cells. 20x magnification. Scale bar, 100 μ m.

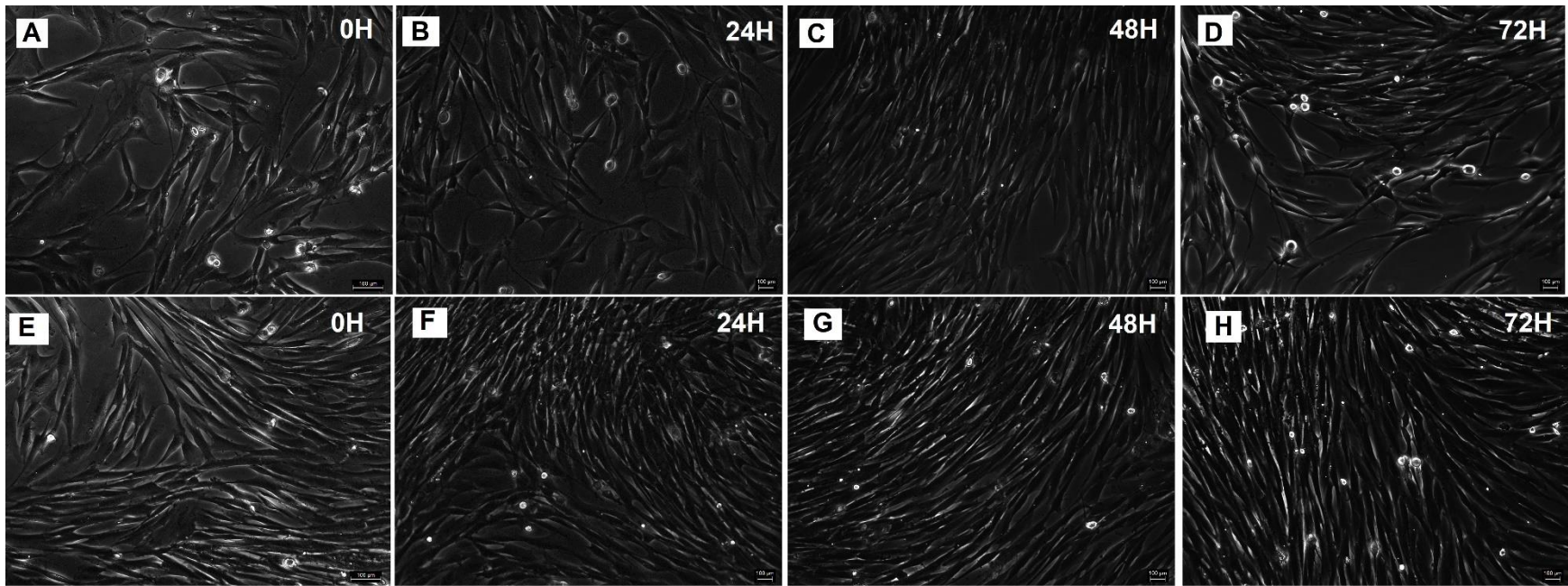


FIGURE 8. cAd-MSCs priming with CSF from healthy dogs and MUO. C-CSF group (A, B, C and D) with 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) and 72 h (D), and MUO-CSF group with 0 h (E), 24 h (F), 48 h (G) and 72 h (H) both groups showing a more fusiform aspect of the cells compared to group C. 20x magnification. Scale bar, 100 μ m.

Cell Viability Analysis of MSCs after Priming

Cell viability using 0.4% trypan blue solution and observed Neubauer chamber averaged 90% in the C control group, 98.48% IFN- γ + TNF- α group, 96.09% C-S group, 98% MUO-S group, 95.83% C-CSF group and 97.73% MUO-CSF group (Figure 9). There was a significant difference ($p= 0.009$) in the IFN- γ + TNF- α , MUO-S and MUO-CSF groups compared with the other groups.

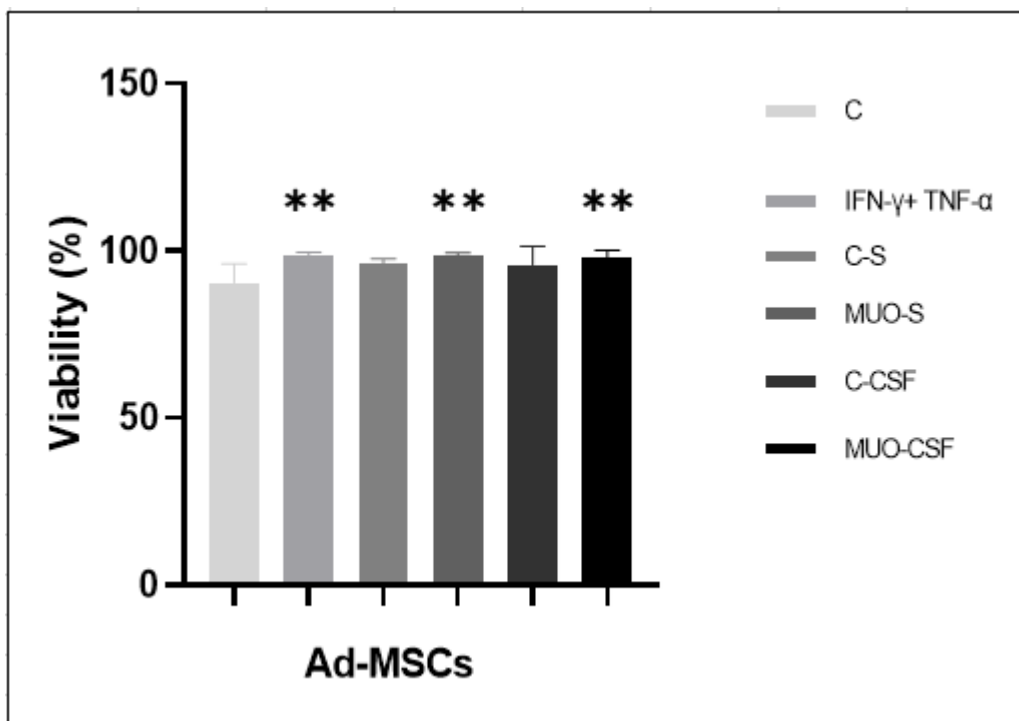


Figure 9. Post- priming cAd-MSC viability. C group ($\bar{x} \pm \sigma^2 = 0.0968 \pm 0.0570$), IFN- γ + TNF- α ($\bar{x} \pm \sigma^2 = 0.0152 \pm 0.0105$), C-S ($\bar{x} \pm \sigma^2 = 0.0391 \pm 0.146$), MUO-S ($\bar{x} \pm \sigma^2 = 0.0148 \pm 0.00903$), C-CSF ($\bar{x} \pm \sigma^2 = 0.0217 \pm 0.0141$), MUO-CSF ($\bar{x} \pm \sigma^2 = 0.0217 \pm 0.0141$). The IFN- γ + TNF- α , MUO-S and MUO-CSF groups showed significantly higher cell viability than the other groups. ($p < 0.005^{**}$).

Gene Expression of Anti-inflammatory Cytokines and Neurotrophic Factor α Ad-MSCs

Based on C group considered the control group of the experiment, there was a significant increase in the gene expression of HGF, IDO and TNF- α in the IFN- γ +TNF- α group ($p = <0.001$). There was a significant increase in TNF- α gene expression and IFN- γ in the C-CSF and MUO-CSF groups compared to the C group ($p = <0.001$). There was a significant reduction in the gene expression of BDNF and GDNF in the C-S, C-CSF and MUO-CSF groups compared to the C group ($p = <0.001$), and there was a significant reduction in HGF gene expression in the MUO-S group compared to group C ($p = <0.001$).

There were no significant differences in IL-10 expression ($p = 0.071$) and PTGES2 in the comparison between the priming groups and the C group (Supplementary Material) (Figure 10).

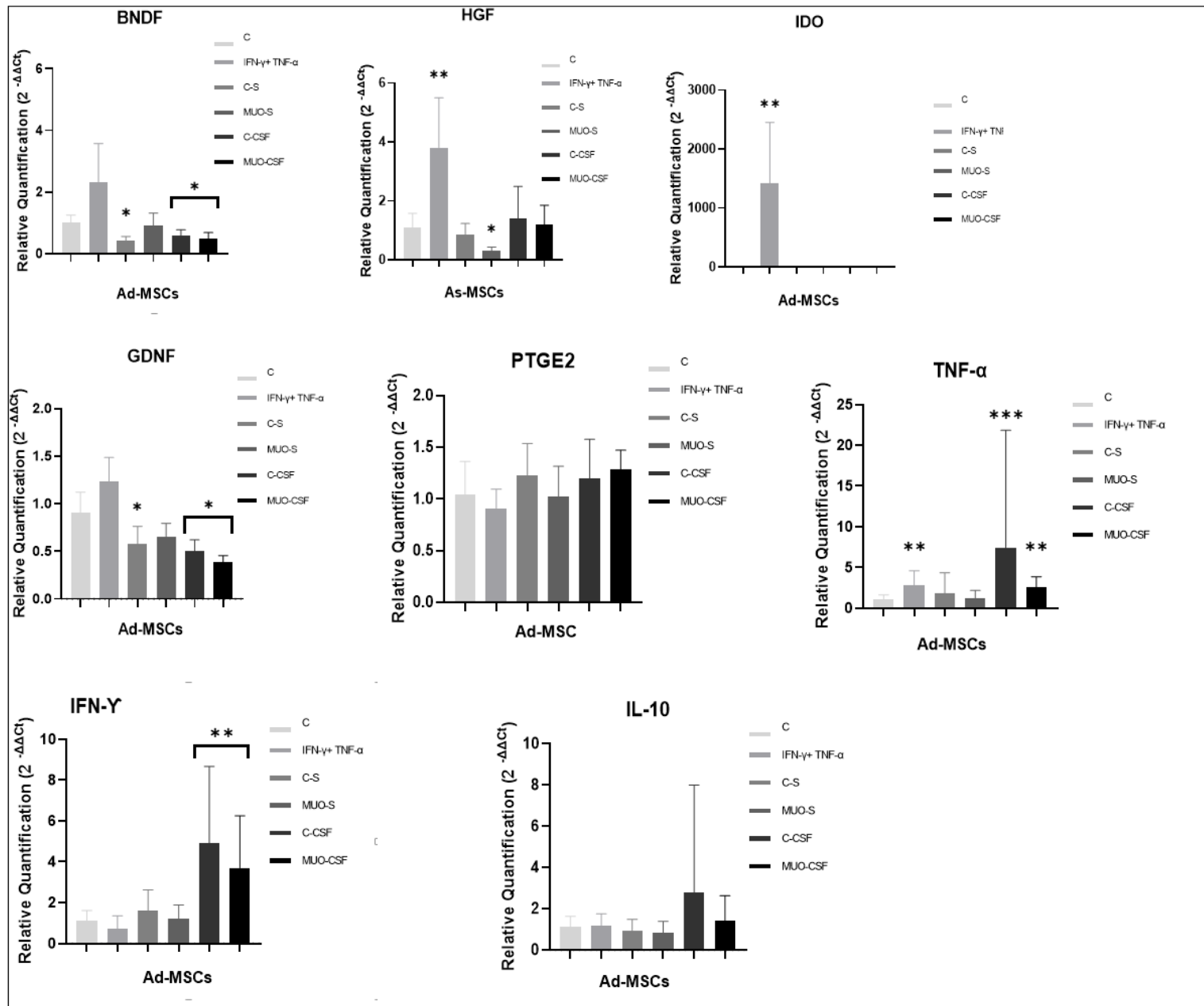


FIGURE 10. Relative gene expression of BDNF, GDNF, HGF, IDO, INF- γ , TNF- α , PTGE2 and IL-10 in the priming groups of cAd-MSCs. Decrease in gene expression of BDNF e GDNF nos grupos priming IFN- γ + TNF- α , C-CSF e MUO-CSF in comparison with group C ($p < 0.001$)*. Reduction in HGF gene expression. in the MUO-S group compared to the C group ($p < 0.001$)*. increase in HGF and IDO gene expression in the IFN- γ + TNF- α group ($p < 0.001$)**. Increase in the gene expression of IFN- γ in the MUO-S and C-CSF groups and of TNF- α in the IFN- γ + TNF- α and MUO-CSF groups compared to group C ($p < 0.001$)**. Higher TNF- α gene expression was observed in the MUO-S group than in the IFN- γ + TNF- α and MUO-CSF groups ($p < 0.001$ ***). There were no significant differences in IL-10 expression ($p = 0.071$) and PTGES2 in the comparison between priming groups and C group. Median and percentiles 25-75% were considered for the variables BDNF, GDNF, HGF, IDO, INF- γ , TNF- α , PTGE2 and IL-10.

Secretion Profile of Soluble Factors from the Conditioned Medium of cAd-MSCs

There was a significant increase in IL-8 cytokine secretion in the FN- γ + TNF- α priming group compared to the control C group ($p < 0.001$). There was a significant decrease in the secretion of the IL-10 cytokine in the C-S and MUO-S groups in comparison to the C group ($p < 0.001$). There were no significant differences in the secretion of GM-CSF, IL-2 and MCP-1 between the priming groups IFN- γ + TNF- α , C-S, MUO-S, C-CSF and MUO-CSF with C ($p > 0.05$) (Supplementary Material) (Figure 11).

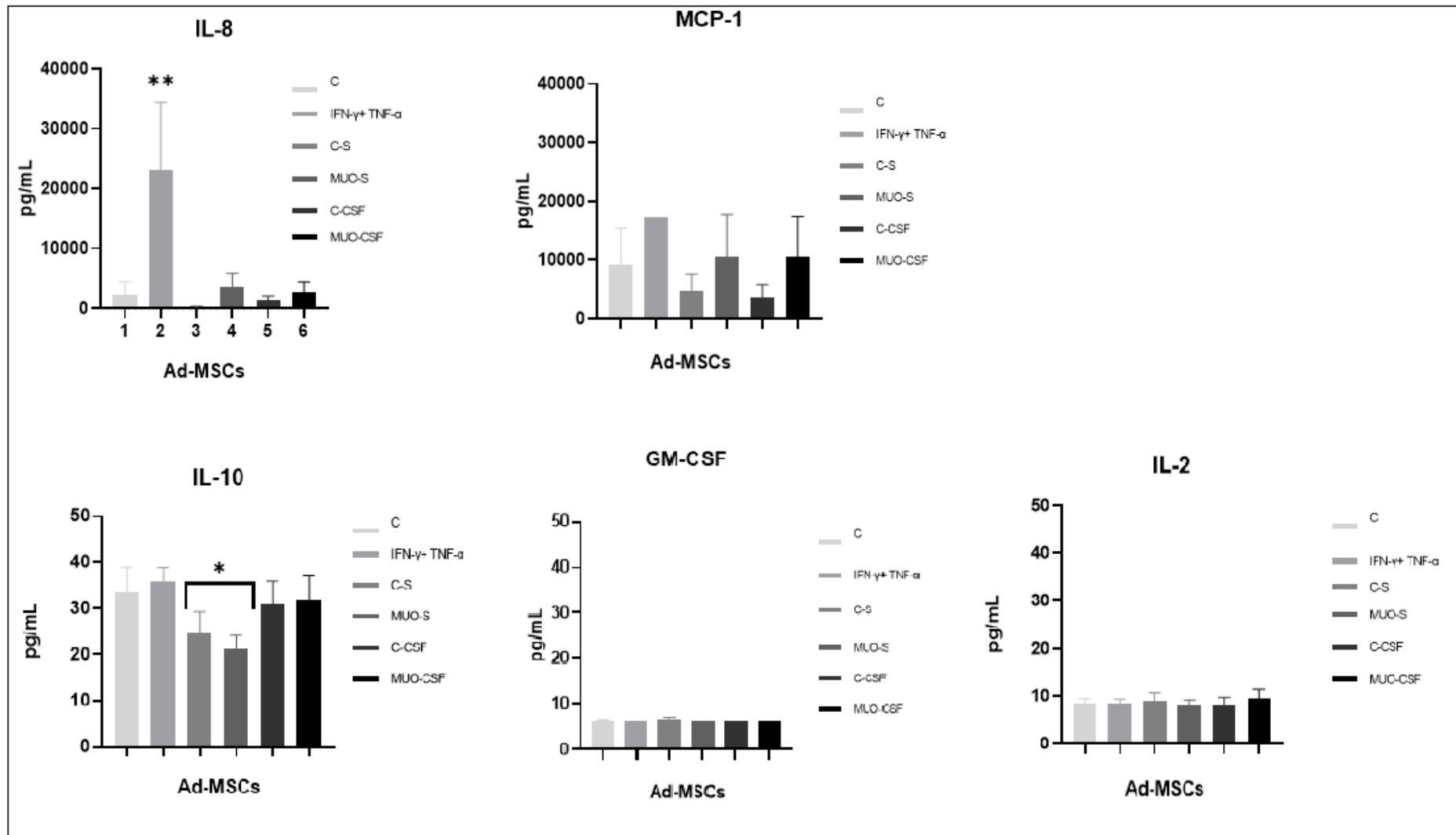


FIGURE 11. Secretion profile of IL-8, IL-10, GM-CSF, IL-2 and MCP-1 in the cAd-MSC priming groups. Significant increase in IL-8 cytokine secretion in the IFN- γ + TNF- α group compared to the C group ($p < 0.001$)**. Significant decrease in IL-10 cytokine secretion in the C-S and MUO-S groups compared to the C group ($p < 0.001$)*. There were no significant differences in the secretion of GM-CSF, IL-2 and MCP-1 between the priming groups and the C group ($p > 0.05$). . Median and percentiles 25-75% were considered for the variables GM-CSF, IL-8 and MCP-1. Standard deviation were considered for the variables IL-2 and IL-10.

Discussion

The study presented here meets the minimum criteria for isolated cells to be classified as MSCs based on what has already been described (20,23,24).

Although the immunological mechanisms of MUO are not yet fully understood, it is already known that the neuroinflammation process of several CNS diseases is similar. In this sense, microglia has a key role in this process, being responsible for the secretion of several factors neuroprotective and neurotoxic agents, such as the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and INF- γ and neuroprotective factors such as BDNF, GDNF and nerve growth factor (NGF) (25).

Therefore, the gene expression of BDNF, GDNF, HGF, PTGE2, IDO, TNF- α , INF- γ and IL-10 in cAd-MSCs and the protein expression of IL-2, IL-8, IL-10, MCP-1 and GM-CSF by primed Ad-MSCs in six groups were determined to evaluate the proinflammatory and anti-inflammatory profiles of these cells.

In the IFN- γ + TNF- α priming after 72h, it was possible to observe an upregulation of gene expression HGF, IDO and TNF- α , with an increase in IL-8 protein expression compared with the C group. Previous studies after IFN- γ and TNF- α priming for 96 hours showed a significant increase in IDO and PTGE2 gene expression and an increase in IL-8 and IL-2 protein expression (17).

An increase in PTGE2 expression after IFN- γ and TNF- α priming was also described (26). Similar responses were observed in IFN- γ priming, where there was an increase in IDO expression with a demonstration of a better response after performing this technique for the treatment of GVHD (27), and IFN- γ priming in another study also led to an increase in the expression of BDNF, HGF, GDNF and IL-10 (28).

Although the literature reports a similar response to that found in this study, a difference was observed in the expression of HGF and TNF- α and not in the expression of PTGE2; however, an increase in the expression of HGF PTGE2, TGF- β , MCP-1, IL-6 and IL-10 and a low secretion of INF- γ and TNF- α were described when performing IFN- γ priming (10). Our study did not observe significant

differences in the gene expression of IL-10, GDNF, BDNF and MCP-1 and PTGE2 protein expression.

IL-8 is a chemokine also known as CXCL8 that plays a proinflammatory role in the recruitment of neutrophils and the induction of neutrophil oxidative burst and granule release in neuroinflammatory disease (29), however, it has the ability to stimulate MSC to produce vascular endothelial growth factor, which in turn promotes angiogenesis and vasculogenesis (30), demonstrating a beneficial effect in enhance IL-8 protein expression.

Both TNF- α and IFN- γ are proinflammatory cytokines with microglial activation capacity for an M1 inflammatory phenotype in neuroinflammation (31–33). However, when MSCs are subjected to high levels of IFN- γ and TNF- α , they are able to secrete iNOS and IDO, which regulate T lymphocytes and stimulate regulatory T cells (Tregs), in addition to changing the microglial phenotype to M2 with anti-inflammatory effects (31–33).

Considering that HGF plays an important role in neuroprotection, attenuation of oligodendrocyte neurodegeneration and/or remyelination and immunomodulatory effects that inhibit the functions of dendritic cells and promote the differentiation of IL-10-producing Treg cells, the expression of this neurotrophic factor is beneficial when considered for the treatment of immune-mediated demyelinating diseases such as MS (34). In this way, cAd-MSC IFN- γ and TNF- α priming showed immunomodulatory and immunosuppressive characteristics, with potential therapy for immune-mediated neuroinflammatory diseases.

For the C-CSF and MUO-CSF priming groups, an increase in the gene expression of TNF- α and IFN- γ and a decrease in the gene expression of BDNF and GDNF were observed compared with the C group. Demonstrating both C-CSF and MUO-CSF had the opposite effect to what was expected, promoting an action with inflammatory tendency in cAd-MSCs to the detriment of an immunomodulatory effect.

In particular, BDNF plays a role in neuronal survival, plasticity and regulation of neurotransmitters, formation of new synapses, dendritic branching and modulation of the profile of excitatory and inhibitory neurotransmitters, and GDNF plays a role in the survival of dopaminergic neurons. A negative regulation of these neuroprotective factors is not interesting (35,36).

When considering the behavior of human MSCs in a CSF environment, to identify their performance after intrathecal administration, it was observed that after 48 hours, there was no change in the morphology of the cells, but there was a reduction in metabolic activity, with increased IL-6 gene expression and gene expression of several growth factors has been reported as BDNF and GDNF, was not observed TNF- α and INF- γ gene expression as in this study (37).

Regarding the metabolic activity of the cAd-MSCs in our study, there was no change when they were subjected to different concentrations of CSF in the culture medium, and CSF had an effect on gene expression opposite to that described (37).

In another study carried out with the use of CSF from healthy human patients for the induction of MSCs in neural cells with 10 μ L of CSF to 2 ml of culture medium, it was demonstrated after 3 days there was a change in the morphology of cells that have become slimmer, triangular and irregular, with cell differentiation after 7 days of culture (38), the morphology alteration is similar to observed in cells in both C-CSF and MUO-CSF priming groups after 72 h.

This fact suggests that although the CSF in our study did not induce cAd-MSCs to express immunomodulatory characteristics and immunosuppressants, it should be evaluated as method of inducing MSCs in neural cells for the treatment of neurodegenerative diseases. Considering the description of studies in which there was a positive regulation of CSF MSCs for neuroprotective factors, studies with different concentrations are important to elucidate whether CSF is capable of inducing Ad-MSCs to an anti-inflammatory profile.

In the C-S priming group, it was possible to observe a significant reduction in BDNF and GDNF gene expression; in the MUO-S group, a decrease gene

expression in HGF and a significant reduction in IL-10 protein expression were observed in the MUO-S and C-S groups when comparing these groups with the C group. A study that used plasma from human patients with GVHD as a priming technique for MSCs noted an increase in the expression of TGF- β and HGF without induction of IDO and IL 10 and a reduction in the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) (39).

However, they noted a greater immunosuppressive capacity in up to 57% by evaluating the ability of stimulated MSCs to control T-cell proliferation and Treg generation (39), and an assessment of the ability of T-cell regulatory activity by serum-stimulated cAd-MSCs would be important for further evaluation of its immunomodulatory effect and immunosuppressant.

Nevertheless, Ad-MSC downregulation of BDNF, GDNF and HGF indicates a reduction in the neuroprotective effect, and considering that IL-10 can inhibit the maturation of antigen-presenting cells, MHC expression, T-cell proliferation and memory T-cell formation, supply the generation of Th17 cells and promote Treg formation (40), its downregulation suggests a loss of the immunomodulatory and immunosuppressive effect of cAd-MSCs after priming with plasma.

MCP-1, also known as CCL2, is an important chemokine in the inflammatory process, leading to infiltration of cells such as monocytes and macrophages (41). GM-CSF has a pro-inflammatory effect by recruiting, activating and increasing the survival of myeloid cells and is capable of changing the phenotype of macrophages to pro-inflammatory (42). Interleukin 2 (IL-2) acts as a growth factor for T and natural killer (NK) cells, and high levels of IL-2 in vivo promote the expansion of cytotoxic T cells (43), showing no significant difference in the secretion of the priming groups with the C group.

When comparing cAd-MSC priming in the IFN- γ , TNF- α , C-S, MUO-S, C-CSF, MUO-CSF groups with the C group and between groups, the IFN- γ +TNF- α priming technique promoted an immunomodulatory effect and immunosuppressive effect on cAd-MSCs better than the C group, whereas the other groups performed worse.

This study, in addition to demonstrating the difference in the profile of cAd-MSCs between the priming techniques used, is still of paramount importance since the mechanisms of neuroinflammation are not fully elucidated. This fundamental study is capable of demonstrating the profile of cAd-MSCs when subjected to inflammatory media that mimic the microenvironment of patients with neuroimmune diseases such as MUO and MS to provide more effective techniques for the treatment of these diseases and ensure a better understanding of the behavior of cAd-MSCs in contact with CSF and plasma from animals with MUO.

One of the limitations found was the ability to standardize the environment inflammation of the CSF and serum used, which although they were collected from animals at the time of diagnosis of MUO, there are animals with evolutions of the different disease, sex, age and previous history. Including animals that had already undergone previous treatment, even if of short duration, with immunosuppressants at the time of diagnosis.

The CSF profile of dogs with MUO demonstrated the presence of GM-CSF, which has inflammatory potential, along with IL-10, although having an anti-inflammatory effect, is secreted in acute inflammation by macrophages, mast cells, NK, eosinophils and neutrophils and IL-6 (40). The serum of dogs with MUO presented IL-8, and MCP-1 conferred a more proinflammatory character than the control serum samples.

Conclusion

Our results demonstrate TNF- α in association with INF- γ priming increased the immunomodulatory profile of cAd-MSCs, due to upregulation of key anti-inflammatory cytokines except IL-10 compared with the C group. The priming with CSF from dogs with MUO enhance the pro-inflammatory expression genes TNF- α and INF- γ and a decrease in the neuroprotective expression genes of BDNF and GDNF when compared with the C group. And serum priming from dogs with MUO had a significant decrease gene expression in HGF and significant reduction in anti inflammatory interleukin IL-10 protein quantification when comparing with the C

group, showing no significant immunomodulatory profile with anti-inflammatory tendency in both.

Studies such as this one, the first one using CSF and canine serum as priming, are essential to obtain more information about the behavior of cAd-MSC in neuroimmune diseases. And experiments with different concentrations of CSF and plasma are still needed to better explain the profile of Ad-MSCs in the inflammatory environment of neuroimmune diseases. Thus, it is fundamental to carry out in vitro studies such as this one for a better investigation of the inflammatory behavior of neuroimmune diseases.

List of abbreviations

Ad-MSCs- mesenchymal stem cells derived from adipose tissue

BDNF- brain-derived neurotrophic factor

C- experimental control group

cAd-MSCs- mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue

CCL2- chemokine ligand 2

cDNA- complementary deoxyribonucleic acid

C-CSF- experimental group with cerebrospinal fluid from control dogs

COX-2- cyclo-oxygenase 2

CNS- central nervous system

C-S- experimental group with control serum

CSF- cerebrospinal fluid

CXCL8- interleukin 8

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO- dimethyl sulfoxide

DPBS- Dubecco's Phosphate Buffered Saline

EAE- experimental autoimmune encephalitis

GDNF- brain-derived neurotrophic factor

GM-CSF- granulocyte and macrophage colony stimulating factor

HGF- hepatocyte growth factor

HLA-DR- histocompatibility complex class II molecule

HPRT- hypoxanthine guanine phosphoriboxyltransferase

IDO- indoleamine 2,3-dioxygenase

INF- γ - interferon gamma

IL-2 interleukin 2

IL-6- interleukin 6

IL-8- interleukin 8

IL-10- interleukin 10

MCP-1- monocyte chemoattractant protein 1

MGE- meningoencephalites granulosa

MHC II- class II histocompatibility complex molecule

MS- multiple sclerosis

MSCs- mesenchymal stem cells

MUO- meningoencephalitis of unknown origin

MUO-CSF- experimental group with cerebrospinal fluid from dogs with MUO

MUO-S- experimental group with serum from dogs with MUO

MTT- (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

NGF- neural growth factor

NK- natural killer cells

NLE- necrotizing leukoencephalitis

NME- necrotizing meningoencephalitis

NO- nitric oxide

P0- zero cell passage

P1- cell passage 1

P2- cell passage 2

P3- cell passage 3

P4- cell passage 4

PTGES2- prostaglandin E synthetase 2

RM- ressonância magnética

RNA- ribonucleic acid

ROS- Reactive Oxygen Species

RPS5- ribosomal protein S5

RPS19- ribosomal protein S19

RT-qPCR- quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction

SFB- sino fetal bovine

Th- helper T lymphocyte

TNF- α - tumor necrosis factor beta

Treg- regulatory T cells

Declarations

Ethical approval and consent to participate

All experimental procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, UNESP-Botucatu (protocol No. 0171/2021). Blood collection and CSF of dogs naturally affected by MUO treated at Veterinary Neurology and collection of canine adipose tissue were performed according to the free and informed consent of the guardians of the animals.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its information files complementary.

Competitive interests

"The authors declare that they have no conflicting interests" in this section.

Financing

Author Contributions

References

1. Cornelis I, Volk HA, De Decker S. Clinical presentation, diagnostic findings and long-term survival in large breed dogs with meningoencephalitis of unknown aetiology. *Vet Rec.* 2016;179(6).
2. Coates JR, Jeffery ND. Perspectives on meningoencephalomyelitis of unknown origin. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2014;44(6):1157–85.
3. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(9):545–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3871>
4. McGinley MP, Goldschmidt CH R-GA. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *J Am Med Assoc* [Internet]. 2021;325((8):765–779.

Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2776694>

5. Gonçalves R, De Decker S, Walmsley G, Butterfield S, Maddox TW. Inflammatory Disease Affecting the Central Nervous System in Dogs: A Retrospective Study in England (2010–2019). *Front Vet Sci*. 2022;8(January):1–11.
6. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079–106.
7. Greer KA, Wong AK, Liu H, Famula TR, Pedersen NC, Ruhe A, et al. Necrotizing meningoencephalitis of Pug Dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2010;76(2):110–8.
8. Genc B, Bozan HR, Sermin Genc, Genc and K. Stem cell therapy for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;2019(9).
9. Ravanidis S, Bogie JFJ, Donders R, Craeye D, Mays RW, Deans R, et al. Neuroinflammatory signals enhance the immunomodulatory and neuroprotective properties of multipotent adult progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;6(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0169-z>
10. Lee BC, Kang KS. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–10.
11. Li M, Jiang Y, Hou Q, Zhao Y, Zhong L, Fu X. Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022;13(1):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02822-2>
12. Noronha NDC, Mizukami A, Calíari-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM,

- Covas DT, et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies (Stem Cell Research and Therapy (2019) 10 (131) DOI: 10.1186/s13287-019-1224-y). Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):1–21.
13. Lee J, Kwon SJ, Kim JH, Jang H, Lee NK, Hwang JW, et al. Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients as an optimal formulation for therapeutic application of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. Sci Rep [Internet]. 2019;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-37252-9>
 14. Leijls MJC, van Buul GM, Lubberts E, Bos PK, Verhaar JAN, Hoogduijn MJ, et al. Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: An explorative in vitro study. Front Immunol. 2012;3(AUG):1–7.
 15. Farivar S, Mohamadzade Z, Shiari R, Fahimzad A. Neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by cerebrospinal fluid. Iran J Child Neurol. 2015;9(1):87–93.
 16. Talarico LR, Schatzberg SJ. Idiopathic granulomatous and necrotising inflammatory disorders of the canine central nervous system: A review and future perspectives. J Small Anim Pract. 2010;51(3):138–49.
 17. Amorim RM, Clark KC, Walker NJ, Kumar P, Herout K, Borjesson DL, et al. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: A promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):1–12.
 18. Chung DJ, Hayashi K, Toupadakis CA, Wong A, Yellowley CE. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. Res Vet Sci [Internet]. 2012;92(1):66–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.012>
 19. Russell KA, Chow NHC, Dukoff D, Gibson TWG, La Marre J, Betts DH, et al.

- Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2016;11(12).
20. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant*. 2010;19(3):279–89.
 21. Luna ACL, Madeira MEP, Conceição TO, Moreira JALC, Laiso RAN, Maria DA. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Res Notes*. 2014;7(1):1–12.
 22. Zhan XS, El-Ashram S, Luo DZ, Luo HN, Wang BY, Chen SF, et al. A comparative study of biological characteristics and transcriptome profiles of mesenchymal stem cells from different canine tissues. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
 23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
 24. Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, et al. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2014;161(1–2):21–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.06.002>
 25. Suzumura A. Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2015;6(3):225–31.
 26. Yang HM, Song WJ, Li Q, Kim SY, Kim HJ, Ryu MO, et al. Canine mesenchymal stem cells treated with TNF- α and IFN- γ enhance anti-inflammatory effects through the COX-2/PGE 2 pathway. *Res Vet Sci*. 2018;119(May):19–26.

27. Kim DS, Jang IK, Lee MW, Ko YJ, Lee DH, Lee JW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine* [Internet]. 2018;28:261–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002>
28. Rodríguez-Sánchez DN, Pinto GBA, Cartarozzi LP, de Oliveira ALR, Bovolato ALC, de Carvalho M, et al. 3D-printed nerve guidance conduits multi-functionalized with canine multipotent mesenchymal stromal cells promote neuroregeneration after sciatic nerve injury in rats. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):1–20.
29. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics.* 2017;7(6):1543–88.
30. Hou Y, Ryu CH, Jun JA, Kim SM, Jeong CH, Jeun SS. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. *Cell Biol Int.* 2014;38(9):1050–9.
31. Wang Y, Guo L, Yin X, McCarthy EC, Cheng MI, Hoang AT, et al. Pathogenic TNF- α drives peripheral nerve inflammation in an Aire-deficient model of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(4):1–13.
32. Tan PH, Ji J, Yeh CC, Ji RR. Interferons in Pain and Infections: Emerging Roles in Neuro-Immune and Neuro-Glial Interactions. *Front Immunol.* 2021;12(November):1–14.
33. Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 2020;53(1):1–16.
34. Benkhoucha M, Santiago-Raber ML, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6424–9.
35. Aldhshan MS, Jhanji G, Poritsanos NJ, Mizuno TM. Glucose Stimulates Glial

- Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Expression in Microglia through a GLUT5-Independent Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):1–13.
36. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol.* 2019;56(5):3295–312.
 37. Krull AA, Setter DO, Gendron TF, Hrstka SCL, Polzin MJ, Hart J, et al. Alterations of mesenchymal stromal cells in cerebrospinal fluid: insights from transcriptomics and an ALS clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):1–14.
 38. Ge W, Ren C, Duan X, Geng D, Zhang C, Liu X, et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neural Stem Cells Using Cerebrospinal Fluid. *Cell Biochem Biophys.* 2015;71(1):449–55.
 39. Silva-Carvalho AÉ, Rodrigues LP, Schiavinato JL, Alborghetti MR, Bettarello G, Simões BP, et al. GVHD-derived plasma as a priming strategy of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1–12.
 40. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(3):170–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2711>
 41. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2021;101:107598. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
 42. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol.* 2016;100(3):481–9.
 43. Abbas AK, Trotta E, Simeonov DR, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol.* 2018;3(25).

CAPÍTULO 3

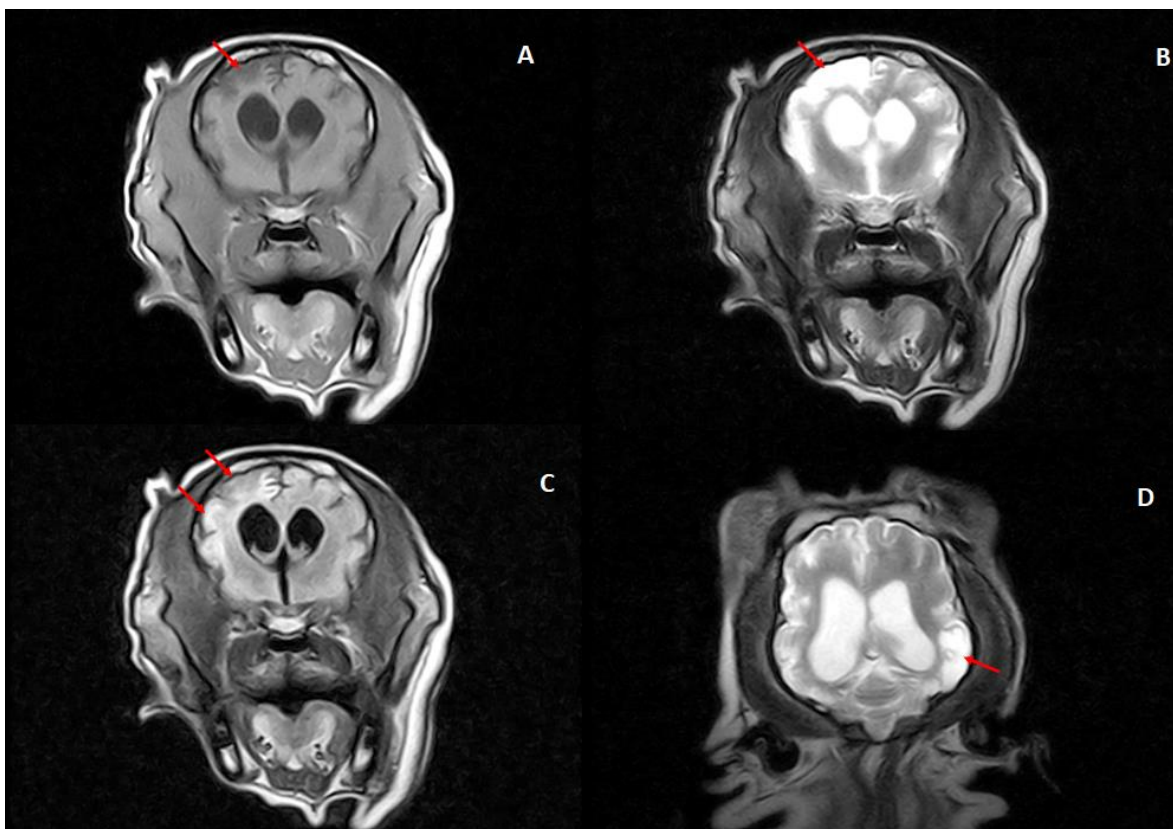
3 CONCLUSÃO GERAL

O priming celular é uma técnica nova que tem por objetivo melhorar a capacidade imunomoduladora das MSCs, e o uso de fluidos biológicos é algo inédito demonstrando a importância deste estudo ser o primeiro estudo com uso de LCR e soro sanguíneo em Ad-MSCs na espécie canina. Embora o LCR e o soro de cães com MUO não tenham produzido o efeito imunomodulador significativo nas Ad-MSCs novos estudos com concentrações e tempo de estimulação diferentes são fundamentais para melhor conhecimento do perfil dessas células submetidas a um ambiente com LCR e soro de cães com MUO.

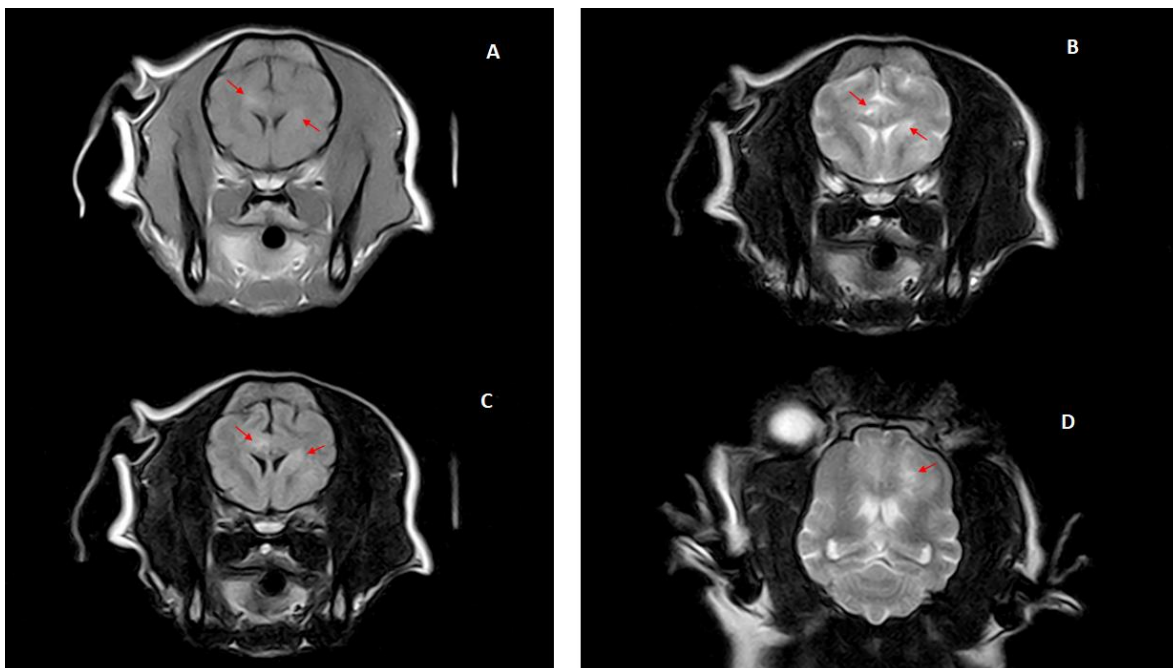
A técnica *priming* das cAd-MSCs com o uso de INF- γ +TNF- α se mostrou com um perfil com maior tendência imunomodulatória e imunossupressora em comparação com o grupo controle e entre os grupos. A viabilidade das cAd-MSCs não sofreu alteração nos grupos avaliados após o *priming* e sua taxa metabólica não foi prejudicada quando submetidas a diferentes concentrações de LCR e Soro.

O modelo experimental proposto é de suma importância para o estudo *in vitro* do comportamento das cAd-MSCs em ambientes que mimetizam as doenças neuroimunes como a esclerose múltipla, contudo apresentando limitações como a dificuldade de padronização do LCR e soro inflamatório. Como perspectivas futuras novos estudos com diferentes concentrações de LCR e soro podem se demonstrar resultados mais favoráveis a essas técnicas *priming*.

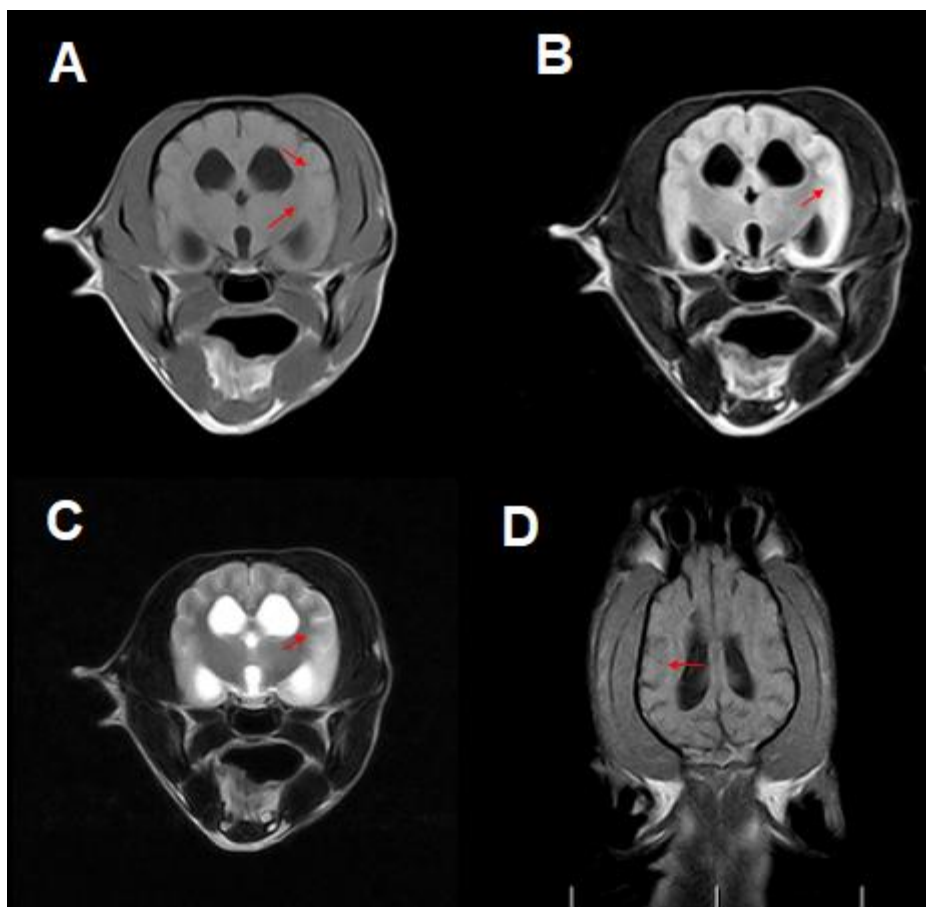
APÊNDICE



Apêndice 1: Imagens de ressonância magnética do encéfalo do cão 01. A: Corte transversal ponderado em T1. Área de hiposinal indicando necrose cérebro-cortical (seta vermelha). B: Corte transversal ponderado em T2. Área de hipersinal representando necrose cérebro-cortical (seta vermelha). C: Corte transversal ponderado em FLAIR. Áreas de hipersinal representando inflamação e necrose cérebro-cortical (setas vermelhas). D: Corte dorsal ponderado em T2. Área de hipersinal representando necrose cérebro-cortical (seta vermelha).



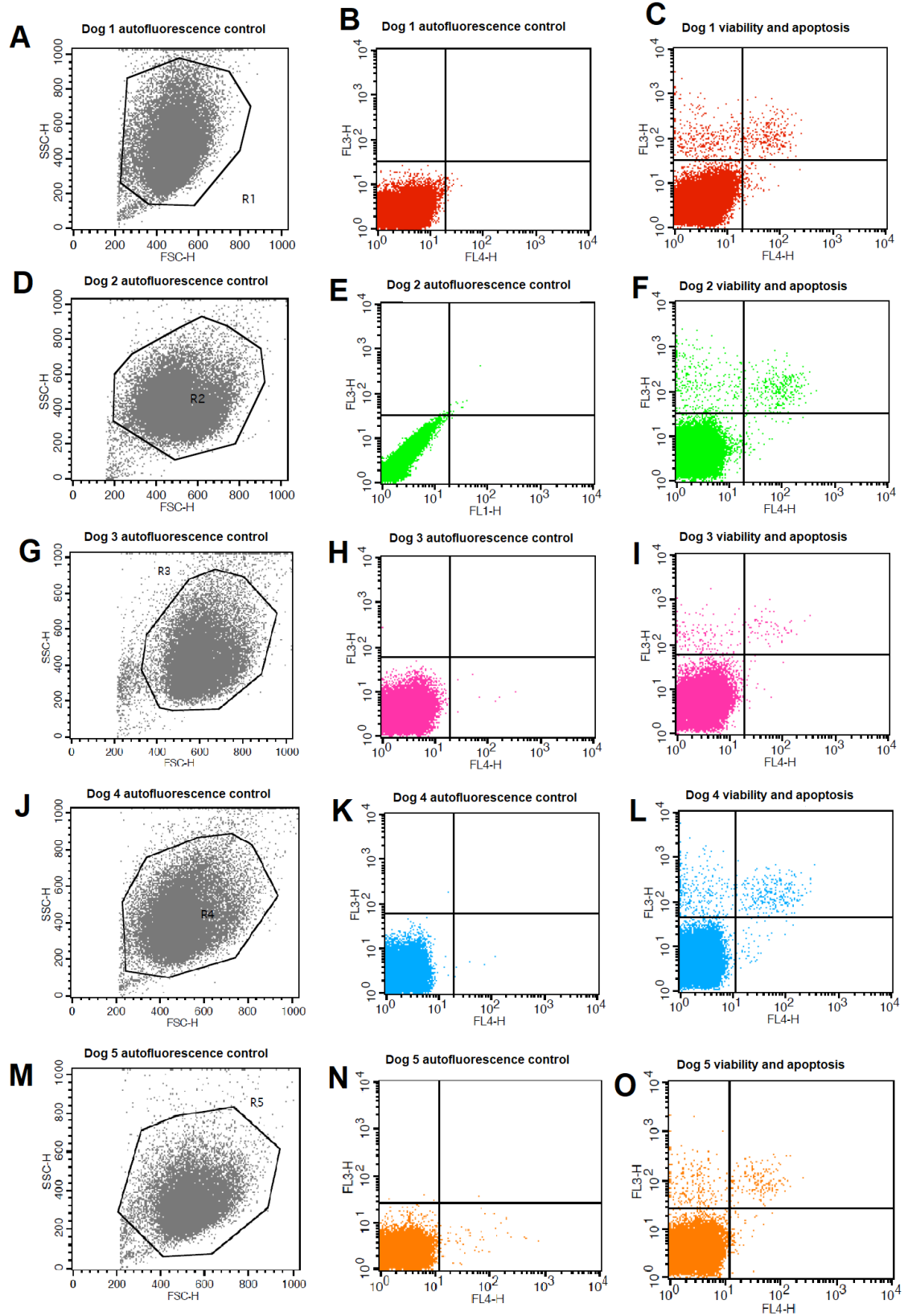
Apêndice 2: Imagens de ressonância magnética do encéfalo do cão 02. A: Corte transversal ponderado em T1 pós contraste. Área de hipersinal indicando processo inflamatório (setas vermelhas). B: Corte transversal ponderado em T2. Área de hipersinal indicando processo inflamatório (setas vermelhas). C: Corte transversal ponderado em FLAIR. Áreas de hipersinal indicando inflamação (setas vermelhas). D: Corte dorsal ponderado em T2. Área de hipersinal indicando inflamação (seta vermelha).



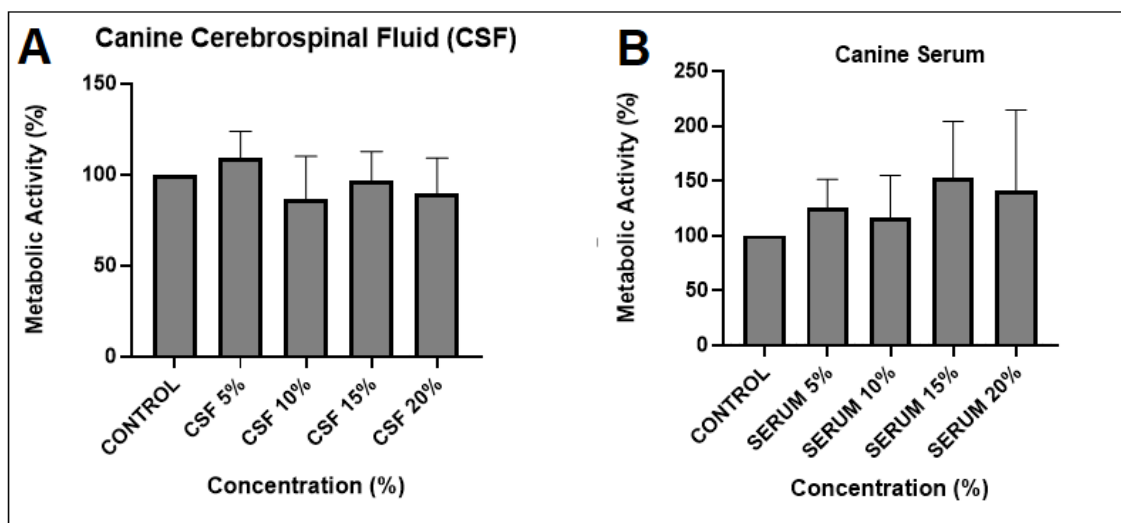
Apêndice 3. Imagens de ressonância magnética do encéfalo do cão 03. A: Corte transversal ponderado em T1 pós contraste. Área de hipersinal indicando processo inflamatório (seta vermelha). B: Corte transversal ponderado em T2. Área de hipersinal indicando processo inflamatório (seta vermelha). C: Corte transversal ponderado em FLAIR. Áreas de hipersinal indicando inflamação (seta vermelha). D: Corte dorsal ponderado em T1. Área de hipersinal indicando inflamação (seta vermelha).

	Cão 1	Cão 2	Cão 3
Células (cél/μL)	21	25	8
Proteína	19,6 mg/dL	23,5 mg/dL	79,2 mg/dL
Pleocitose	Linfocítica	Linfocítica	Linfocítica

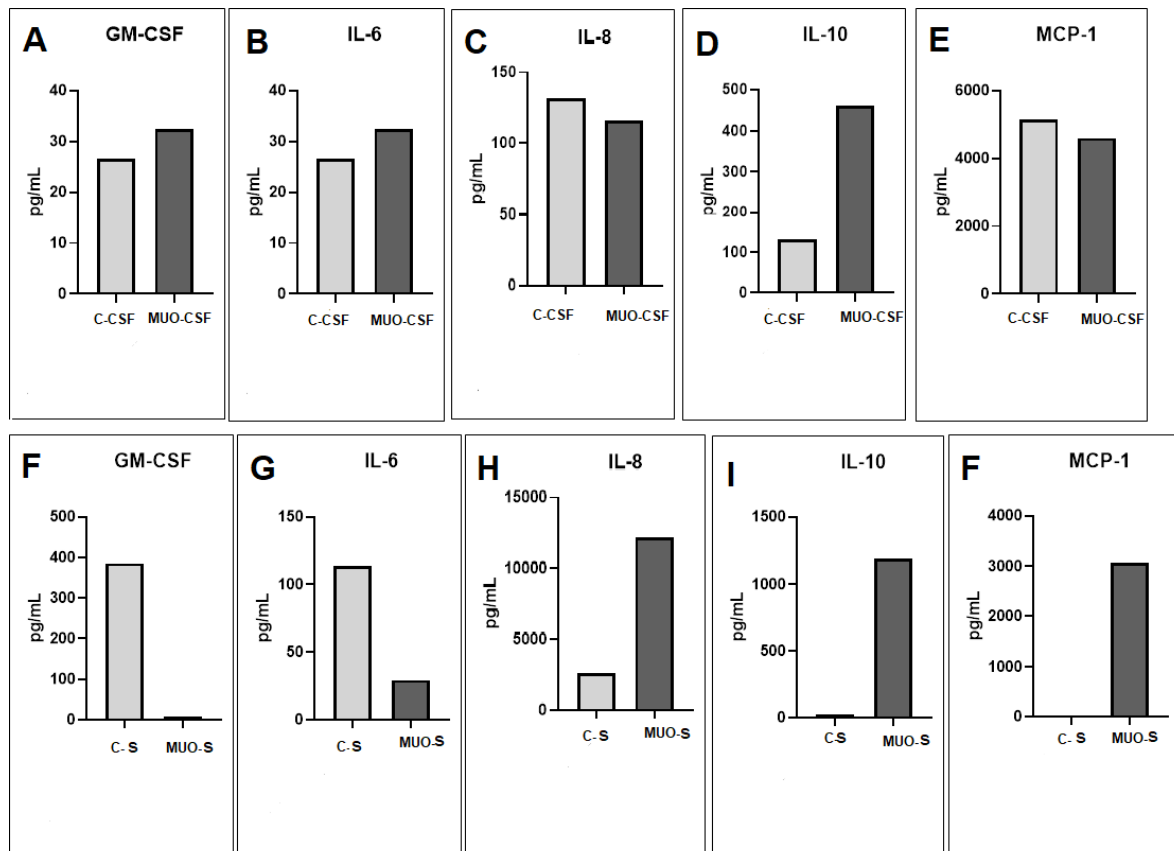
Apêndice 4. Análise do LCR dos cães 1, 2 e 3.



Apêndice 5. Viabilidade e apoptose das Ad-MSCs. Gate (A, D, G, J, M), autofluorescência controle (B, E, H, K, N) e viabilidade celular (C, F, I, L, O) de cinco linhagens de Ad-MSCs. Nos histogramas da coluna da direita observa-se em cada um: a viabilidade celular no quadrante inferior esquerdo, a apoptose precoce (anexina) no quadrante superior esquerdo, a apoptose tardia (iodeto de propídeo) no quadrante inferior direito e a necrose celular no quadrante superior direito.



Apêndice 6. Atividade metabólica celular (%) de grupos experimentais tratados com LCR canino nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% (A), e com soro canino nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% (B). Os grupos tratados com LCR canino não apresentaram diferença em comparação com o grupo controle, porém na comparação entre grupos a concentração de 5% teve uma atividade metabólica maior que 10 % de LCR ($p=0,035^*$). Os grupos tratados com soro canino não apresentaram diferença com o grupo controle e nem entre os grupos ($p=0,051$).



Apêndice 7. Análise descritiva de amostras de LCR (n=1) e soro (n=2) de cães saudáveis em comparação com o LCR (n=3) e soro (n=1) de cães com MUO usados no *priming* de cAd-MSCs.

	GM-CSF	IL-2	IL-8	IL-10	MCP-1
C	6.4[6.4-6.4]	8.371 ± 0.969	1449 [1187-2437]	33.560 ± 5.316	7823 [5024-17316]
INF-Y+ TNF-α	6.4[6.4-6.4]	8.464 ± 0.772	20262 [11576-32736]	35.833 ± 3.030	17316 [17316-17316]
C-S	6.4[6.4-6.4]	8.825 ± 1.736	73.495 [72.150-87.740]	24.900 ± 4.374	3945.500 [3317-7617]
MUO-S	6.4[6.4-6.4]	8.040 ± 1.054	2898 [2334-3443]	21.250 ± 2.882	11220.500 [3929-17316]
C-CSF	6.4[6.4-6.4]	8.197 ± 1.464	1124.500 [900.940-2147]	30.980 ± 4.929	3599 [2133.750-3997.250]
MUO-CSF	6.4[6.4-6.4]	9.421 ± 1.900	2712 [1330-3243]	31.787 ± 5.207	11159 [3017-17316]
	P=0,198	p= 0,268	p= <0.001	p= <0.001	p= <0.001
	Median and percentiles 25-75%	$\bar{x} \pm \sigma^2$	Median and percentiles 25-75%	$\bar{x} \pm \sigma^2$	Median and percentiles 25-75%

Apêndice 8. Análise estatística da expressão gênica relativa de BDNF, GDNF, HGF, IDO, INF- γ , TNF- α , PTGE2 e IL-10 no priming das cAd-MSCs.