

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM
CÃES COM MENINGOENCEFALOMIELITE DE ORIGEM DESCONHECIDA

Giovana Boff Sánchez

Botucatu - SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM
CÃES COM MENINGOENCEFALOMIELITE DE ORIGEM DESCONHECIDA

Giovana Boff Sánchez

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins
Amorim

Botucatu - SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sánchez, Giovana Boff.

Transplante de células-tronco mesenquimais alogênicas
em cães com meningoencefalomielite de origem desconhecida
/ Giovana Boff Sánchez. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Rogério Martins Amorim
Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Transplante de células-tronco
mesenquimais. 3. Doenças autoimunes. 4. Meningoencefalite.
5. Neuroimunomodulação.

Palavras-chave: Doenças autoimunes desmielinizantes do
SNC; Intratecal; Meningoencefalite; Neuroimunomodulação;
Terapia celular.

Nome do Autor: Giovana Boff Sánchez

Título: TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS
EM CÃES COM MENINGOENCEFALOMIELITE DE ORIGEM DESCONHECIDA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -
UNESP/Botucatu.

Prof^a. Dr^a Elenice Deffune

Membro

Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. Departamento de
Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP/Botucatu.

Prof^a. Dr^a Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Membro

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade
Estadual de Campinas.

Prof. Dr Jose Ademar Villanova Junior

Membro

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, Escola de Ciências da Vida.

Data da Defesa: 05/02/2021.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Eliana Boff e Celso Araujo Pinto, meu irmão Gabriel Boff Araujo Pinto e meus avós Wanda Boff e Mario João Boff pelo afeto incondicional e apoio constante em todos os momentos da minha vida. Ao meu marido, amigo e colega de trabalho Diego Noé Rodríguez Sánchez por seu afeto, apoio e colaboração e nesta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim pela orientação, ensinamentos, incentivo e confiança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pelo apoio financeiro com a bolsa de Doutorado (Processo 2018/3101-8).

À Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune pela contribuição intelectual e por ceder as instalações do seu laboratório para a realização das análises *in vitro*. À Dra. Majorie de A. Golim e Alline Márcia M. Braz pela contribuição nas análises imunofenotípicas.

Às assistentes de suporte acadêmico/UNIPEX Vickeline N. Androcioli e Ana Paula D. P. da Cruz por auxiliarem nas etapas de cultivo celular e aos técnicos Thiago-FOB-Bauru por colaborar com as análises multiplexadas e Heraldo André Catalan pela realização das imagens de Ressonância Magnética dos cães.

À Prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma Lima e por ceder as instalações e equipamentos do seu laboratório e aos seus orientados Maycon T. E. Silva e Vinicius P. Rodrigues pelo auxílio nas análises *in vitro*.

Aos colegas Mariana Cristina Ramos, Felipe Sanchez, Ana Livia Bovolato e César P. C. Lobo e aos residentes do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da FMVZ pela colaboração em diferentes etapas deste trabalho. A todos professores, funcionários, colegas e amigos do laboratório de engenharia celular-LEC, da unidade de pesquisa experimental-UNIPEX e do Serviço de Neurologia da FMVZ-UNESP que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

Aos tutores dos cães participantes que acreditaram neste estudo permitindo a sua realização.

À FMVZ-UNESP-Botucatu pela possibilidade de realizar a este Curso de pós-graduação e por ceder suas instalações e serviços para que esse trabalho pudesse ser realizado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

40d	Momento experimental 40 dias pós-tratamento/transplante
80d	Momento experimental 80 dias pós-tratamento/transplante
ACZ	Acetazolamida
Ad-MSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, do inglês <i>adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells</i>
ALT	Alanino aminotransferase
anti-GFAP	Anticorpos contra proteína ácida fibrilar glial, do inglês <i>anti- glial fibrillary acidic protein</i>
APCs	Células apresentadoras de antígeno, do inglês <i>antigen presenting cells</i>
Ara-C	Citarabina ou arabinosídeo de citosina, do inglês <i>arabinoside cytosine</i>
AZA	Azatioprina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BM-MSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, do inglês <i>bone marrow mesenchymal stromal/stem cells</i>
C1-C5, C6-T2, T3-L3	Segmentos medulares C1-C5, C6-T2, T3-L3
CB	Cérebro
CD	Grupamento de diferenciação, do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CD (cél.)	Células dendríticas/ <i>dendritic cells</i> (DC)
CL	Cerebelo
cMSC (grupo)	Grupo experimental de cães tratado com células-tronco mesenquimais alogênicas do tecido adiposo
COX-1, 2	Ciclo-oxigenase 1, 2 (enzima)
CTCN	Contagem total de células nucleadas do líquido cefalorraquidiano
CTL	Linfócitos T citotóxicos, do inglês <i>cytotoxic T lymphocytes</i>
DBPS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DLA-II	Antígeno leucocitário canino de classe II, do inglês <i>dog leukocyte antigen class II</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMTs	Terapias modificadoras de doença, do inglês <i>modifying therapies disease</i>

E	Estimação do número de eritrócitos ou concentração de proteínas do líquido cefalorraquidiano
EAE	Encefalomielite autoimune experimental, do inglês <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
ECB	Esclerose concêntrica de Baló
EDM	Presença de edema perilesional nas imagens de ressonância magnética
EDSS	Escala expandida do estado de incapacidade, do inglês <i>expanded disability status scale</i>
EFM	Presença de efeito de massa nas imagens de ressonância magnética
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática, do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	Esclerose múltipla
EMDA	Encefalomielite disseminada aguda
EMPP	Esclerose múltipla primária progressiva
EMPR	Esclerose múltipla progressiva recorrente
EMRR	Esclerose múltipla remitente recorrente
EMSP	Esclerose múltipla secundária progressiva
ER	Número de eritrócitos no líquido cefalorraquidiano e hemograma
EROS	Espécies reativas de oxigênio/ <i>reactive oxygen species</i> (ROS)
FA	Fosfatase alcalina
FLAIR	Sequência de recuperação de inversão atenuada por fluido, do inglês <i>fluid attenuation inversion recovery</i>
FM	Herniação no forame magno nas imagens de ressonância magnética
FURO	Furosemida
GABAP	Gabapentina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia, do inglês <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial, do inglês <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HER	Presença de herniações nas imagens de ressonância magnética
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos, do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>

HIPER	Hiperintensidade na sequência estudada nas imagens de ressonância magnética
HIPO	Hipointensidade na sequência estudada nas imagens de ressonância magnética
HLA-II	Antígeno leucocitário humano de classe II, do inglês <i>human leukocyte antigen class II</i>
HO	Hemoxigenase, do inglês <i>hemoxygenase</i>
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, do inglês <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
IA (via)	Via intra-arterial
IDO	Indoleamina 2,3- dioxigenase, do inglês <i>indoleamine 2 3-dioxygenase</i>
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL7R	Receptor da interleucina -7, do inglês <i>interleukin-7 receptor</i>
INF	Líquido cefalorraquidiano inflamatório
IP (via)	Via intra-parenquimatosa
ISCT	Sociedade Internacional para Terapia Celular, do inglês <i>International Society for Cellular Therapy</i>
ISO	Isointensidade na sequência estudada nas imagens de ressonância magnética
IT (via)	Via intratecal
IV (via)	Via intravenosa
KBr	Brometo de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LEN	Leucoencefalite necrosante, do inglês <i>necrotizing leucoencephalitis</i>
LEV	Levetiracetam
M	Momento experimental correspondente ao estudo <i>in vivo</i>
M1	Macrófagos/micróglia anti-inflamatórios
M2	Macrófagos/micróglia pró-inflamatórios
MARE	Meningite-arterite responsiva a esteroides
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>

ME	Meningoencefalite eosinofílica
MEG	Meningoencefalomielite granulomatosa
MEN	Meningoencefalite necrosante
MERT	Escala de Resposta ao Tratamento para Cães com MUO
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade tipo I, do inglês <i>major histocompatibility complex type I</i>
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade tipo II, do inglês <i>major histocompatibility complex type II</i>
MSCs	Células-tronco mesenquimais, do inglês <i>mesenchymal stem cells</i>
MUO	Meningoencefalomielite de origem desconhecida, do inglês <i>meningoencephalomyelitis of unknown origin</i>
N-INF	Líquido cefalorraquidiano não-inflamatório
N/a	Não se aplica
Nº LES	Número de lesões no(s) segmento(s) das imagens de ressonância magnética
NK (células)	Células <i>natural killer</i> , do inglês <i>natural killer cells</i>
NL	Neurolocalização das lesões nas imagens de ressonância magnética
OME	Omeprazol
ON	Óxido nítrico (NO)/ <i>nitric oxide</i> (ON)
P0, P1-P3	Passagem das MSCs após o isolamento (passagem zero, 1-3)
PAC (grupo)	Grupo experimental de cães tratados com protocolo de citarabina e prednisona
PB	Fenobarbital, do inglês <i>phenobarbital</i>
PGE₂	Prostaglandina E ₂ , do inglês <i>prostaglandin E₂</i>
PMSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas da placenta, do inglês <i>placental-derived mesenchymal stromal/stem cells</i>
PRAZ	Prazozina
Pré	Momento experimental pré-transplante do estudo <i>in vivo</i>
PRED	Prednisona
PT	Dosagem de proteínas totais do líquido cefalorraquidiano
PTGES2	Prostaglandina-endoperoxidase sintase 2, do inglês <i>prostaglandin endoperoxide synthase-2</i>
qPCR	Reação de polimerização em cadeia em tempo real quantitativa, do inglês <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>

RAN	Ranitidina
RM	Ressonância magnética
RPS19	Proteína ribossomal S19
RPS5	Proteína ribossomal S5
SC (via)	Via subcutânea
SCF	Sucralfato
SFAL	Herniação no subfalcina nas imagens de ressonância magnética
SNC	Sistema nervoso central
T1-W	Sequência de tempo ponderado em T1, do inglês <i>T1-weighted sequence</i>
T1-W C+	Captção de contraste intravenoso na sequência de tempo ponderado em T1
T2-W	Sequência de tempo ponderado em T2, do inglês <i>T2-weighted sequence</i>
TAL	Tálamo
TAL-C	Tálamo-cortical
TD	Tempo desde os sinais clínicos serem notados pela primeira vez pelo tutor até o diagnóstico do animal
TE	Tronco encefálico
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta, do inglês <i>transforming growth factor beta</i>
Th	Linfócitos T auxiliares, do inglês <i>T helper cells</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRD	Tramadol
T_{reg}	Linfócitos T regulatórios, do inglês <i>regulatory T cells</i>
V/H	Presença de hidrocefalia ou ventriculomegalia nas imagens de ressonância magnética
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
VO (via)	Via oral

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Predisposições dos subtipos histopatológicos da MUO.....	23
QUADRO 2. Iniciadores utilizados nas reações de qPCR.....	47
QUADRO 3. Condições de termociclagem das amplificações por qPCR.....	47
QUADRO 4. Via de transplante de Ad-MSCs utilizada nos cães do grupo cMSC.....	53
QUADRO 5. Escala de Ressonância Magnética para Cães com MUO (ERM).	57
QUADRO 6. Escala de Resposta ao Tratamento para Cães com MUO (MERT).	59
QUADRO 7. Resultados da Escala EDN dos grupos PAC e cMSC.	78
QUADRO 8. Resultados da Escala ERM dos grupos PAC e cMSC.....	82
QUADRO 9. Avaliação da resposta ao tratamento dos grupos PAC e cMSC pela escala MERT.	91
QUADRO 10. Efeitos adversos manifestados após os transplantes de Ad-MSCs no grupo cMSC.	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismo proposto de polarização dos macrófagos/micróglia na MUO.	26
FIGURA 2. Potenciais efeitos imunomoduladores das MSCs.	31
FIGURA 3. Potenciais mecanismos das MSCs na neurodegeneração.	33
FIGURA 4. Delineamento experimental do estudo in vivo.	51
FIGURA 5. Protocolo de imunossupressão utilizado no grupo PAC.	52
FIGURA 6. Imagem representativa do transplante de Ad-MSCs do grupo cMSC pela via intratecal.	54
FIGURA 7. Aparência microscópica das Ad-MSCs e PMSCs caninas após isolamento.	63
FIGURA 8. Caracterização imunofenotípica (A) e capacidade de diferenciação (B) das Ad-MSCs caninas.	66
FIGURA 9. Caracterização imunofenotípica (A) e capacidade de diferenciação (B) das PMSCs caninas.	68
FIGURA 10. Ad-MSCs (A-C) e PMSCs (D-F) caninas após a estimulação in vitro com INF- γ (B, E) e INF- γ combinado com TNF- α (C, F) e controles (A, D).	69
FIGURA 11. Expressão gênica relativa de BDNF, GDNF, HGF, IL-10, IDO, e PTGES2 após a estimulação das Ad-MSCs e PMSCs caninas com INF- γ e INF- γ combinado com TNF- α .	72
FIGURA 12. Perfil de secreção de GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e MCP-1 após a estimulação das Ad-MSCs e PMSCs caninas com INF- γ e INF- γ combinado com TNF- α .	74
FIGURA 13. Avaliação da recuperação funcional cães dos grupos PAC e cMSC pela Escala EDN.	77
FIGURA 14. Avaliação neurológica dos cães 4 (A, B), 7 (C, D) e 12 (E, F) do grupo PAC, no pré-tratamento (A, C, E) e 80 dias pós-tratamento (B, D, F).	79
FIGURA 15. Avaliação neurológica dos cães 5 (A, B) e 8 (C, D) e 10 (E, F) do grupo cMSC, no pré-tratamento (A, C, E) e 80 dias pós-tratamento (B, D, F).	80

FIGURA 16. Imagens de RM da região cervical do cão 4 do grupo PAC no momento pré-tratamento (A-C) e 80 dias pós-tratamento (D-F), nos planos sagital (A, B, D, E) e transversal (C, F).....	83
FIGURA 17. Imagens de RM do encéfalo do cão 7 do grupo PAC nos momentos pré-tratamento (A-E) e 80 dias pós-tratamento (F-J) nos planos sagital (A, F) e transversal (B, C, D, E, G, H, I, J), na sequência de tempo ponderado em T2.	84
FIGURA 18. Imagens de RM do encéfalo do cão 12 do grupo PAC nos momentos pré-tratamento (A-E) e 80 dias pós-tratamento (F-J), nos planos sagital (A, E) e transversal (B, C, D, F, G, H).....	85
FIGURA 19. Imagens de RM do encéfalo do cão 5 do grupo cMSC nos momentos pré-transplante (A-D) e 80 dias pós-transplante (E-H), nos cortes sagital (A, E) e transversal (B, C, D, F, G, H).....	86
FIGURA 20. Imagens de RM do encéfalo do cão 8 do grupo cMSC nos momentos pré-transplante (A-C) e 80 dias pós-transplante (D-F), no corte transversal.	87
FIGURA 21. Imagens de RM do encéfalo do cão 10 do grupo cMSC nos momentos pré-transplante (A-C) e 80 dias pós-transplante (D-F), nos cortes sagital (A, B) e transversal (B, C, D, F, G, H), na sequência tempo ponderado em T2.....	88
FIGURA 22. Análise do LCR nos momentos pré-tratamento e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.	89
FIGURA 23. Parâmetros hematológicos nos momentos pré-tratamento e aos 40 dias e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.....	93
FIGURA 24. Parâmetros bioquímicos nos momentos pré-tratamento e aos 40 dias e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.....	94

SUMÁRIO

RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Meningoencefalomielite de Origem Desconhecida (MUO)	23
2.1.1 Etiopatogenia e Mecanismos de Neuroinflamação e Neurodegeneração....	24
2.1.2 Tratamento e Prognóstico	28
2.2 Células Tronco Mesenquimais (MSCs).....	30
2.2.1 Potencial Terapêutico para Doenças Neuroimunes	30
2.2.2 MSCs: Fontes de obtenção, Imunoevasão e Potencialização dos Efeitos Terapêuticos	34
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Estudo <i>in vitro</i>.....	41
4.1.1 Coleta do Tecido Adiposo Canino e Isolamento das Ad-MSCs.....	41
4.1.2 Coleta da Placenta Canina e Isolamento das PMSCs.....	42
4.1.3 Formação do Banco de Ad-MSCs e PMSCs caninas	43
4.1.4 Diferenciação em Linhagens Mesodermas e Análise Imunofenotípica das Ad-MSCs e PMSCs Caninas	43
4.1.5 Estimulação Direta das Ad-MSCs e PMSCs <i>in vitro</i> com IFN- γ e IFN- γ Combinado com TNF- α	45
4.1.6 Expressão Gênica de Citocinas Anti-inflamatórias e Fatores Neurotróficos das Ad-MSCs e PMSCs Estimuladas e Controles.....	46

4.1.7 Perfil de Secreção de Fatores Solúveis do Meio Condicionado das Ad-MSCs e PMSCs Estimuladas e Controles.....	48
4.2 Estudo <i>in vivo</i>	48
4.2.1 Animais e Momentos Experimentais	49
4.2.1.1 Grupo PAC.....	49
4.2.1.2 Grupo cMSC	50
4.2.2 Tratamento Imunossupressor e Terapia Celular	51
4.2.2.1 Grupo PAC.....	51
4.2.2.2 Grupo cMSC	52
4.2.3 Observações Adicionais	54
4.2.3 Acompanhamento: Parâmetros clínicos, Laboratoriais e de Imagem Avançada.....	55
4.2.3.1 Exclusão de Doenças Infecciosas	55
4.2.3.2 Avaliação da Recuperação Funcional	55
4.2.3.3 Avaliação da Redução das Lesões por Imagem de RM.....	56
4.2.3.4 Análise do LCR.....	57
4.2.3.5 Avaliação da Resposta ao Tratamento	59
4.2.3.6 Efeitos Adversos e Alterações Hematológicas e Bioquímicas	59
4.3 Análise Estatística	60
5 RESULTADOS	62
5.1 Estudo <i>in vitro</i>.....	62
5.1.1 Isolamento das Ad-MSCs e PMSCs caninas	62
5.1.2 Diferenciação em Linhagens Mesodermas e Análise Imunofenotípica das Ad-MSCs e PMSCs caninas	64
5.1.3 Estimulação Direta das Ad-MSCs e PMSCs com IFN- γ e IFN- γ combinado com TNF- α	69
5.1.3.1 Comportamento das Ad-MSCs e PMSCs após estimulação direta	69
5.1.3.2 Expressão Gênica de Citocinas e Fatores Neurotróficos pelas Ad-MSCs e PMSCs após estimulação direta.....	70
5.1.4 Perfil de secreção de fatores solúveis do meio condicionado das Ad-MSCs e PMSCs após estimulação <i>in vitro</i> com IFN- γ ou IFN- γ combinado com TNF- α	73

5.2 Estudo <i>in vivo</i>	75
5.2.1 Características Gerais dos Grupos Estudados.....	75
5.2.2 Localização Neuroanatômica e Sinais Clínicos.....	75
5.2.3 Avaliação da Recuperação Funcional	76
5.2.4 Avaliação da Redução das Lesões por Imagem de RM.....	81
5.2.6 Análise do LCR.....	89
5.2.7 Avaliação da Resposta ao Tratamento	90
5.2.8 Efeitos Adversos.....	90
5.2.9 Alterações Hematológicas e Bioquímicas	93
6 DISCUSSÃO.....	96
7 CONCLUSÕES.....	105
8 REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS	120
(A) Fármacos administrados nos cães dos grupos PAC e cMSC em associação com o respectivo tratamento	120
(B) Escala de Déficit Neurológico (EDN).....	121
(D) Características das imagens de ressonância magnética no pré-tratamento e aos 80 dias pós-tratamento do grupo PAC	124
(E) Características das imagens de ressonância magnética pré-transplante e 80 dias pós-transplante do grupo cMSC	126
(F) Análise do líquido cefalorraquidiano do pré-tratamento e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.	127
9 TRABALHO CIENTÍFICO	129

RESUMO

PINTO, G. B. A. Transplante de Células-tronco Mesenquimais Alogênicas em Cães com Meningoencefalomielite de Origem Desconhecida. Botucatu, 2021. 168 Páginas. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A meningoencefalomielite de origem desconhecida (MUO) canina é uma doença neuroinflamatória de provável origem imunomediada, altamente debilitante, que apresenta prognóstico desfavorável e falha terapêutica com o uso de imunossupressores. As células-tronco mesenquimais (MSCs) são promissoras para o tratamento de doenças neuroimunes, porém, diferentes fontes podem apresentar variações no potencial imunomodulador e neuroprotetor. *In vitro*, avaliamos a expressão gênica de BDNF, GDNF, HGF, IDO, IL-10 e PTGES2 e o perfil secretório de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF e MCP-1 de MSCs caninas derivadas do tecido adiposo (Ad-MSCs) e placenta (PMSCs) após estimulação única com INF- γ e combinada com INF- γ com TNF- α . *In vivo*, avaliamos a resposta terapêutica ao transplante de Ad-MSCs alogênicas em cães com MUO que apresentaram falha terapêutica ao tratamento imunossupressor. Grupo PAC: 12 cães com MUO tratados com o protocolo imunossupressor de citarabina (ara-C) e prednisona. Grupo cMSC: Cinco cães que apresentaram falha terapêutica tratados com dois transplantes de $2,5 \times 10^6$ Ad-MSCs pela via intratecal (IT) (totalizando seis transplantes) ou intravenosa (IV) (totalizando três transplantes), com intervalo de 40 dias. Avaliamos a recuperação funcional, redução das lesões inflamatórias por ressonância magnética (RM) e líquido cefalorraquidiano (LCR). *In vitro*, observamos aumento significativo na expressão de BDNF, GDNF, HGF e IDO pelas Ad-MSCs após as estimulações, e na expressão de IDO pelas PMSCs após a estimulação combinada. Houve tendência a maior expressão de IL-10 nas células estimuladas de ambas fontes. Houve aumento significativo na secreção de IL-6 pelas Ad-MSCs e de IL-8 pelas PMSCs após estimulação. *In vivo*, houve tendência a melhora funcional e dos parâmetros inflamatórios no LCR em ambos grupos, indicando efeitos positivos. No grupo cMSC, a maioria dos cães teve remissão parcial e eventos adversos leves foram observados em 4/6 animais após transplantes IT, sendo ausentes pela via IV. Todos os cães do grupo PAC desenvolveram efeitos adversos. Não houve diferenças significativas nas variáveis de hemograma e bioquímica dentro e entre os grupos. O transplante de Ad-MSCs alogênicas em cães com MUO demonstrou efeitos benéficos.

Palavras-chave: Doenças autoimunes desmielinizantes (SNC), Interleucinas, Meningoencefalite, Mielite, Neuroimunomodulação, Terapia Baseada em Células e Tecidos.

ABSTRACT

PINTO, G. B. A. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Canine Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin. Botucatu, 2021. 168 Pages. Doctoral Thesis. São Paulo State University (UNESP), Botucatu Campus.

Canine meningoencephalomyelitis of unknown origin (MUO) is an immune-mediated neuroinflammatory disease, highly debilitating, with poor prognosis and therapeutic failure. Mesenchymal stem cells (MSCs) are promising for the treatment of neuroimmune diseases. Different sources may present differences in the immunomodulatory/neuroprotective potential. *In vitro*, we evaluated the gene expression of BDNF, GDNF, HGF, IDO, IL-10 and PTGES2 and the secretory profile of IL-2, IL-6, IL-18, IL-10, GM-CSF and MCP-1 of canine MSCs derived from adipose tissue (Ad-MSCs) and placenta (PMSCs) after priming with the pro-inflammatory cytokines INF- γ alone and combined INF- γ and TNF- α . *In vivo*, we evaluated the clinical response to allogeneic Ad-MSCs transplantation in dogs with MUO. PAC group: 12 dogs treated with immunosuppressant cytarabine (ara-C) and prednisone. cMSC group: 5 dogs of PAC group with therapeutic failure were treated with 2.5×10^6 /kg Ad-MSCs by intrathecal (IT) (n = 6) or intravenous (IV) (n = 3) delivery routes (40 days of interval). Functional recovery and the reduction of inflammatory lesions by magnetic resonance imaging (MR) and cerebrospinal fluid (CSF) were evaluated. *In vitro*, there was significant increase of BDNF, GDNF, HGF and IDO expression by Ad-MSCs after priming and expression of IDO after combined priming by PMSCs. Ad-MSCs had a significant increase in the secretion of IL-6 and PMSCs of IL-8 after priming. *In vivo*, a trend towards functional improvement was observed in both groups after treatment. In the cMSC group, most dogs had partial remission and mild adverse events were observed in 4/6 animals after IT transplantations, being absent by IV. Clinical and laboratory variables showed no statistical differences. Allogeneic Ad-MSCs transplantation demonstrated beneficial effects in dogs with MUO.

Key-words: Cell- and Tissue-Based Therapy, Demyelinating Autoimmune Diseases (CNS), Interleukins, Meningoencephalitis, Myelitis, Neuroimmunomodulation.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A meningoencefalomielite de origem desconhecida (*meningoencephalomyelitis of unknown origin*, MUO) é considerada uma das causas mais comuns de doença inflamatória do sistema nervoso central (SNC) de cães (COATES; JEFFERY, 2014). É caracterizada por um grupo de doenças idiopáticas e não infecciosas que apresentam sinais neurológicos semelhantes e características histopatológicas distintas (CORNELIS et al., 2019; TALARICO; SCHATZBERG, 2010). As lesões neurológicas apresentam início agudo, evolução progressiva e geram sinais clínicos de meningoencefalite, meningoencefalomielite ou meningomielite (COATES; JEFFERY, 2014; CORNELIS et al., 2017).

O diagnóstico clínico se baseia no histórico, exame neurológico, e alterações das imagens de ressonância magnética (RM) e do líquido cefalorraquidiano (LCR) (COATES; JEFFERY, 2014; GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010). O diagnóstico definitivo dos subtipos é obtido por histopatologia (COATES; JEFFERY, 2014; GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010).

A etiopatogenia da MUO não é totalmente compreendida, entretanto, se hipotetiza que apresente origem autoimune pela identificação de células inflamatórias que expressam moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II) e devido a predominância de linfócitos T CD3+ nas lesões do SNC (COATES; JEFFERY, 2014; HIGGINS et al., 2008; KIPAR et al., 1998; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012; SPITZBARTH; BAUMGÄRTNER; BEINEKE, 2012; SUZUKI et al., 2003). Fatores genéticos e ambientais também tem sido relacionados com o desenvolvimento da doença (HIGGINS et al., 2008; KIPAR et al., 1998; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012; SUZUKI et al., 2003).

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, crônica e multifocal do SNC, que afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo, sendo uma das principais causas de deficiência funcional em jovens adultos (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; FREEDMAN et al., 2010; HARRIS et al., 2018; MARTINO et al., 2010; PEGORETTI et al., 2018). O modelo animal de neuroinflamação mais utilizado para a EM é a encefalomielite autoimune experimental (EAE), sendo gerado ao produzir inflamação e desmielinização no SNC de murinos susceptíveis imunizados com proteínas específicas da mielina (CONSTANTINESCU et al., 2011; RAFEI et al., 2009a). Este

modelo contribuiu significativamente para o entendimento da EM, contudo, não abrange todas as características clínicas, patológicas e imunológicas da EM por apresentar tendência a direcionar uma resposta imune específica (CONSTANTINESCU et al., 2011; LASSMANN; BRADL, 2017). Interessantemente, a MUO tem sido correlacionada à EM em vários aspectos, visto que ambas apresentam características etiopatogênicas, histopatológicas, clínicas e radiológicas semelhantes e, desta forma, pode ser utilizada como um modelo experimental natural para a doença (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; GREER et al., 2010; JEFFERY et al., 2017; MOON et al., 2015; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012).

Para a MUO, a imunossupressão é o principal tratamento, baseando-se no uso de altas doses de corticosteroides geralmente associados a outros imunomoduladores e imunossupressores (CORNELIS et al., 2017). Entretanto, além de ocasionarem efeitos adversos, o efeito terapêutico obtido pode ser temporário ou ineficaz a longo prazo, acarretando em progressão da lesão e óbito em > 26% dos cães nos primeiros dias após o diagnóstico (CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016b; FLEGEL et al., 2011; JUNG et al., 2013; LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013; WONG et al., 2010; ZARFOSS et al., 2006). De modo semelhante, atualmente não existe um tratamento que seja capaz de prevenir ou reverter efetivamente os processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos presentes na EM (SCOLDING et al., 2017; WINGERCHUK; CARTER, 2014).

Neste contexto, a terapia celular baseada nas células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells*, MSCs) dispõe de um amplo potencial para o tratamento de doenças neuroimunes (PAUL; ANISIMOV, 2013; UCCELLI; MANCARDI, 2010). Além de apresentarem capacidade de modulação dos sistemas imunes inato e adaptativo, as MSCs estimulam o microambiente regenerativo mediadas, principalmente, pela secreção de fatores solúveis que estimulam angiogênese, neurogênese, sinaptogênese, e ativação astrocítica, e promovem efeitos anti-apoptóticos em neurônios e células da glia (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; CIERVO et al., 2017; PAUL; ANISIMOV, 2013; UCCELLI; LARONI; FREEDMAN, 2011).

No ambiente inflamatório, as MSCs adquirem fenótipo imunossupressor e incrementam sua capacidade de proliferação e condições de sobrevivência (NORONHA et al., 2019). Esta ativação pode ser alcançada *in vitro* por meio da estimulação com citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocinas predominantes no ambiente neuroinflamatório de cães com MUO e humanos com EM (KIM et al., 2018; LE BLANC et al., 2003; PARK; UCHIDA;

NAKAYAMA, 2013; PARK et al., 2012; PEGORETTI et al., 2018; PRASANNA et al., 2010; SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Observações preliminares com MSCs humanas indicam que as propriedades terapêuticas das MSCs diferem entre as fontes celulares (MELIEF et al., 2013), porém, poucos estudos compararam a expressão e secreção de fatores solúveis de fontes de MSCs caninas. Neste âmbito, o estudo da expressão e secreção *in vitro* de fatores solúveis pelas MSCs caninas após a estimulação direta com IFN- γ e TNF- α constitui uma ferramenta em potencial para se avaliar a ação destas MSCs no ambiente similar ao da doença-alvo. Por meio de mecanismos imunomoduladores, imunossupressores, neuroprotetores e neurorregenerativos, o estudo das MSCs para o tratamento da MUO canina poderia se tratar de uma alternativa, além de fornecer informações translacionalmente relevantes para os ensaios clínicos da EM.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Meningoencefalomielite de Origem Desconhecida (MUO)

A MUO compreende uma síndrome de meningoencefalomielites idiopáticas não-infecciosas do SNC de cães que inclui vários subtipos em que a autoimunidade é a principal patogenia suposta, entre elas: meningite-arterite responsiva a esteroides (MARE); meningoencefalite eosinofílica (ME); síndrome do tremor idiopático; meningoencefalomielite granulomatosa (MEG); meningoencefalite necrosante (MEN); e leucoencefalite necrosante (LEN) (COATES; JEFFERY, 2014). O acrônimo “MUO” é empregado para designar a MEG, MEN e LEN, cujo diagnóstico definitivo é obtido apenas pela histopatologia (COATES; JEFFERY, 2014).

Cães de quaisquer raças, porte e sexo podem apresentar MUO, contudo, têm sido descritas predisposições genéticas específicas para os subtipos histopatológicos (GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010) (Quadro 1).

QUADRO 1. Predisposições dos subtipos histopatológicos da MUO.			
	MEG	MEN	LEN
Idade	4 a 8 anos	< 4 anos	< 4 anos
Raça	Predominante em raças pequenas e terriers. Pode acometer raças médias e grandes	Pug, Maltês, Pequinês, Papillon, Chihuahua, Shih Tzu, entre diversas outras raças pequenas	Yorkshire Terrier e Buldogue Francês, entre outras raças pequenas
Sexo	Sem predisposição	Fêmeas	Fêmeas

MEG, meningoencefalomielite granulomatosa. MEN, meningoencefalite necrosante. MUO, meningoencefalomielite de origem desconhecida. LEN, leucoencefalite necrosante. Fonte: Adaptado de CORNELIS et al. (2019), GRANGER, SMITH, JEFFERY (2010) e SCHATZBERG (2010).

Dentre os subtipos histopatológicos, distintos cursos clínicos podem ser observados (CORNELIS et al., 2019). Por exemplo, na MEG podem ser observadas três

apresentações clínicas: (1) multifocal/disseminada, caracterizada pelo início agudo e progressão rápida dos sinais neurológicos; (2) focal, marcada pela lenta progressão dos sinais clínicos; e (3) ocular, caracterizada por sinais agudos de disfunção visual (COATES; JEFFERY, 2014). A MEN geralmente causa sinais clínicos cérebro-talâmicos agudos e rapidamente progressivos, e a LEN produz sinais clínicos cérebro-talâmicos e do tronco cerebral, com início agudo e curso crônico (COOPER et al., 2014; SCHATZBERG, 2010). Recentemente, relataram-se sinais neurológicos de cães com meningiomielite de origem desconhecida, que incluem ataxia, paresia ou plegia e, comumente, hiperestesia espinal (CORNELIS et al., 2017).

Semelhantemente, a EM acarreta sintomas que se correlacionam com a disseminação espaço-temporal das lesões no SNC. A apresentação clínica é heterogênea e inclui distúrbios sensoriais e visuais, fadiga, dor, déficits cognitivos e comprometimento motor (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Diferentes subtipos foram reconhecidos, entre eles: Esclerose múltipla remitente recorrente (EMRR); secundária progressiva (EMSP); primária progressiva (EMPP); e progressiva recorrente (EMPR) (ELLWARDT; ZIPP, 2014). A MEN tem sido relacionada com as formas agudas e fulminantes doença de Marburg, doença de Schilder, esclerose concêntrica de Baló (ECB), encefalomielite disseminada aguda (EMDA), doenças do espectro neuromielite óptica (*Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders*, NMOSD), entre outras, que até recentemente eram denominadas como variantes não-prototípicas da EM (GREER et al., 2010; TORRENTE; POLLI, 2008; WINGERCHUK; CARTER, 2014; ZETTL; STÜVE; PATEJDL, 2012).

A MUO é definida clinicamente pelos sinais neurológicos progressivos focais ou multifocais associados à lesão intra-axial única ou múltipla/difusa em tempo ponderado de T2 na ressonância magnética (RM) do SNC, ao líquido cefalorraquidiano (LCR) com características inflamatórias, e à exclusão de infecção por agentes patogênicos (COATES; JEFFERY, 2014; TALARICO; SCHATZBERG, 2010).

2.1.1 Etiopatogenia e Mecanismos de Neuroinflamação e Neurodegeneração

A etiopatogenia exata da MUO persiste desconhecida. De modo semelhante a EM, acredita-se que seja multifatorial, na qual o risco genético associado a fatores que desencadeiam uma resposta imune exacerbada reduz as respostas protetoras e/ou estimula respostas pró-inflamatórias no SNC (COATES; JEFFERY, 2014; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Análises genômicas identificaram fatores de risco genético associado aos subtipos histopatológicos da MUO (BARBER et al., 2011; SCHRAUWEN et al., 2014). Foram identificados dois *loci* de risco genético para a MEN em cães da raça Pug, incluindo uma região associada ao antígeno-leucocitário canino (DLA) de classe II no cromossomo 12 (BARBER et al., 2011). Em cães da raça Maltês, o risco genético à MEN foi identificado nos cromossomos 4 e 15. Além disto, a análise de haplotipos e o mapeamento fino sugeriram que o gene do receptor da interleucina 7 (IL7R) poderia ser um dos genes subjacentes associados (SCHRAUWEN et al., 2014). Interessantemente, o DLA-II e o IL7R têm sido implicados na EM (GREER et al., 2010; SCHRAUWEN et al., 2014; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Estudos de imunohistoquímica revelaram que linfócitos T CD3⁺ são as células inflamatórias mais abundantes nas lesões dos subtipos histopatológicos da MUO e que macrófagos CD163⁺ com forte expressão de MHC-II são encontrados com maior predomínio na MEG, subtipo que têm sido relacionado a uma reação de hipersensibilidade tardia (KIPAR et al., 1998; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012; SUZUKI et al., 2003). Linfócitos B foram identificados nas lesões *post-mortem* e no LCR de cães com MEG, MEN e LEN, assim como no SNC de pacientes com EM, porém, o exato papel destas células nas respectivas doenças ainda não foi esclarecido (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012; SPITZBARTH et al., 2010).

As citocinas representam os principais mediadores da resposta imune local e sistêmica no SNC (SPITZBARTH; BAUMGÄRTNER; BEINEKE, 2012). PARK, UCHIDA e NAKAYAMA (2013) avaliaram a expressão de mRNA de citocinas e receptores de quimiocinas relacionados aos linfócitos T auxiliares (*T helper cells*, Th)-1, Th-2 e Th-17 nas lesões do SNC de cães com os subtipos da MUO. Foi observada uma maior expressão da citocina pró-inflamatória IFN- γ em cães com MEN e das interleucinas (IL)-4 e IL-17 em cães com MEG (PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2013). Além disto, nos cães com MEG a elevada produção de IL-17 foi relacionada aos macrófagos/micróglias infiltrados no tecido inflamado (PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2013). Em humanos com EM, a IL-17 produzida por linfócitos Th17 aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e permite a entrada de linfócitos Th1 (KEBIR et al., 2007; TZARTOS et al., 2008).

As respostas autoimunes do SNC podem ocorrer em consequência a falhas na tolerância central e periférica, por mimetismo molecular, apresentação de auto-antígeno

ou reconhecimento de antígenos liberados na periferia. Como consequência, ocorre a ativação de linfócitos auto-reativos nos órgãos linfoides, que migram pela corrente sanguínea e infiltram o SNC através da BHE (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; LYCK; ENGELHARDT, 2012; SOSPEDRA; MARTIN, 2016). Os linfócitos T são reativados por células apresentadoras de antígeno (*antigen presenting cells*, APCs) ativadas, como células dendríticas, micróglia e macrófagos (MARTINEZ, 2008; SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Os desequilíbrios imunológicos do microambiente, como a presença de presença de IFN- γ , podem induzir a polarização fenotípica de macrófagos alternativamente ativados ou anti-inflamatórios (M2) para classicamente ativados ou pró-inflamatórios (M1) (MARTINEZ, 2008; SOSPEDRA; MARTIN, 2016). As micróglia também realizam a troca fenotípica mediada por citocinas. As micróglia M1 aumentam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (ON), e reduzem a produção de fatores neurotróficos. Por outro lado, as micróglia M2 produzem altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β e fatores neurotróficos, reduzindo as respostas pró-inflamatórias (Figura 1) (BIBER; OWENS; BODDEKE, 2014; MARTINEZ, 2008; MICHELUCCI et al., 2009).

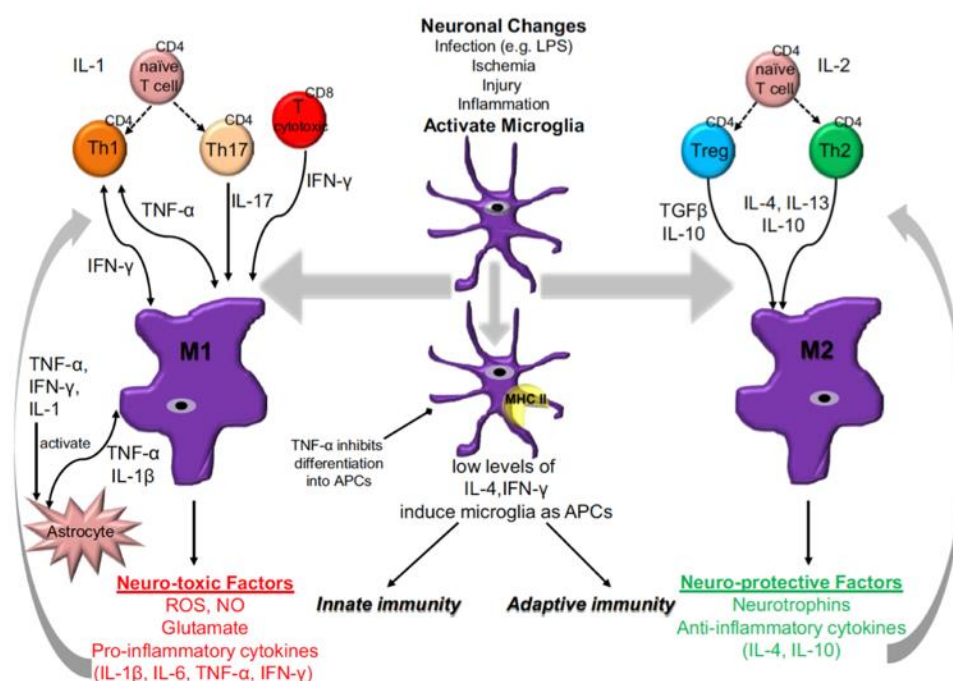


FIGURA 1. Mecanismo proposto de polarização dos macrófagos/micróglia na MUO.

O equilíbrio entre a micróglia M2 “neuroprotetora” e a micróglia M1 “neurotóxica” alterna de acordo com as condições fisiológicas durante o processo de doença. A secreção das citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α , IL-17) estimula a produção e secreção de fatores neurotóxicos pelas micróglias M1, enquanto a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) estimula a produção dos fatores neuroprotetores pelas micróglias M2. ROS, *reactive oxygen species*, espécies reativas de oxigênio; NO, *nitric oxide*, óxido nítrico; (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, interleucinas; TNF- α , *tumor necrosis factor* alpha, fator de necrose tumoral alfa; INF- γ , interferon gama; APCs, *antigen presenting cells*, células apresentadoras de antígenos; (Th)1, Th2, Th17 cells, linfócitos T auxiliares 1, 2,17; TGF- β , *transforming grow factor*, fator de crescimento transformante beta. Fonte: COATES E JEFFERY (2014).

A inflamação crônica no SNC leva a secreção de produtos neurotóxicos pelas micróglias M1, como EROS, espécies reativas de nitrogênio, glutamato, citocinas e quimiocinas, alterando o metabolismo celular nos neurônios e axônios que ocasiona dano mitocondrial, estresse metabólico, hipóxia crônica e injúria neuroaxonal (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; SOSPEDRA; MARTIN, 2016). O desequilíbrio energético e a desmielinização levam à ativação e disfunção de canais iônicos que, em associação ao acúmulo de glutamato, promovem o desequilíbrio de $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^{+}$ e ativam enzimas líticas, perpetuando o dano neuroaxonal. Como consequência, há a formação de edema celular oncolítico, apoptose celular e necrose (FRIESE; SCHATTLING; FUGGER, 2014).

O papel do microbioma intestinal tem sido estudado nas doenças neuroimunes. Em cães com MUO, bactérias do gênero *Prevotellaceae* foram significativamente menos abundantes na microbiota intestinal dos cães acometidos (JEFFERY et al., 2017). Por outro lado, em pacientes com EM que receberam dieta rica em fibras e vegetais e baixa em proteínas apresentaram menores níveis de bactérias do gênero *Lachnospiraceae*, assim como uma pontuação significativamente reduzida na Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS). A hipótese é que devido a menor produção de butirato - em decorrência do menor número de bactérias produtoras - a atividade dos linfócitos T regulatórios (T_{reg}) foi menos estimulada (SARESELLA et al., 2017).

Biomarcadores têm sido pesquisados para a MUO. Anticorpos contra a proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), proteína astrocítica intracelular, foram identificados no LCR e no soro de cães com MEG e MEN (MATSUKI et al., 2004; MIYAKE et al., 2013; SHIBUYA et al., 2007; TODA et al., 2007), porém, os anticorpos

anti-GFAP poderiam uma consequência do processo inflamatório e, portanto, a sua importância ainda não foi elucidada (MATSUKI et al., 2004).

Diversos estudos buscaram detectar de patógenos nas lesões encefálicas *post mortem*, no LCR ou no soro dos cães com MUO, sob a hipótese de que um antígeno estranho poderia desencadear os eventos imunomediados. Até o momento, contudo, não se identificou um patógeno em comum nos cães afetados pela doença (BARBER et al., 2012; BARTNER et al., 2018; SCHATZBERG et al., 2005).

O modelo experimental mais estudado nos estudos de EM é a EAE, induzida ao estimular-se a imunidade mediada por linfócitos T a antígenos da mielina em animais experimentais (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Entretanto, o fenótipo patológico resultante da indução depende da fonte do antígeno, dose de peptídeo/toxina e espécies animais utilizadas (CONSTANTINESCU et al., 2011; MIX et al., 2010), deste modo, trata-se de um modelo heterogêneo e sua utilidade depende do direcionamento da indução para se responder questões específicas (CONSTANTINESCU et al., 2011). Neste âmbito, a MUO canina pode ser utilizada como um modelo experimental natural da EM, em virtude da semelhança dos mecanismos neuroimunes, alterações fisiopatológicas e clínicas, dos métodos de diagnóstico e surgimento espontâneo (HOFFMAN; DOW, 2016; JEFFERY et al., 2017).

2.1.2 Tratamento e Prognóstico

Atualmente, a imunossupressão com doses elevadas de corticosteroides é o principal tratamento para a MUO (CORNELIS et al., 2019). Os corticosteroides inibem a enzima fosfolipase A2 via lipocortina, que converte o ácido araquidônico em prostaglandina e metabólitos do leucotrieno (JEFFERY, 2014). Na EAE/EM, demonstrou-se que os corticosteroides induzem a morte celular dose-dependente principalmente em linfócitos T CD4⁺, previnem a quebra da BHE, diminuem a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, diminuem os níveis de ON e a expressão de MHC-II em micróglia e aumentam o número relativo de T_{reg} (TISCHNER; REICHARDT, 2007).

Com o uso de corticosteroides, efeitos colaterais graves são frequentemente relatados, incluindo ulceração gastrointestinal, hepatopatia, pancreatite e hiperadrenocorticism iatrogênico (COATES; JEFFERY, 2014; JEFFERY, 2014). A combinação com outros fármacos imunossupressores e imunomoduladores, como

citarabina (citosina arabinosídeo, ara-C), azatioprina, lomustina, procarbazina, leflunomida, ciclosporina e micofenolato de mofetila tem sido empregada na tentativa de se atingir melhores taxas de remissão e possibilitar a redução da dose do corticosteroide (GREGORY et al., 1998; ZARFOSS et al., 2006; COATES et al., 2007; SMITH et al., 2009; ADAMO; RYLANDER; ADAMS, 2007; FLEGEL et al., 2011; WOOLCOCK et al., 2016). Entretanto, estes são potenciais causadores de mielossupressão, hepatotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, disfunção hepática, nefrotoxicidade, entre outros (CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016a; SCHATZBERG, 2010).

Dentre os protocolos imunossupressores, o tratamento mais estudado é a combinação de ara-C com prednisona (CROOK et al., 2013; EARLY et al., 2017; LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013; MENAUT et al., 2008; PASTINA et al., 2018; ZARFOSS et al., 2006). A ara-C é um agente anti-metabólito ciclo-celular específico da fase S que penetra a BHE de cães e inibe competitivamente a DNA polimerase em células mitoticamente ativas, inibindo a sua síntese (MOMPARLER, 1982; SCOTT-MONCRIEFF et al., 1991). Segundo a meta-análise de GRANGER et al. (2010), cães com MUO tratados com corticosteroides associados a arac-C apresentaram sobrevida entre 8-464 dias em comparação a 3-63 dias de cães que receberam apenas corticosteroides (GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010).

O prognóstico para remissão a longo prazo da MUO é considerado desfavorável (CORDY; HOLLIDAY, 1989; TIPOLD et al., 1993; STALIS et al., 1995; MUÑANA; LUTTGEN, 1998). Estudos recentes constataram que mesmo com o tratamento imunossupressor, 33% dos cães vieram a óbito em três dias (13/39) e 26% (30/116) em sete dias após o diagnóstico (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013; CORNELIS et al., 2016). Mesmo com a associação de corticosteroides com imunomoduladores, o efeito terapêutico pode ser temporário ou ineficaz a longo prazo (FLEGEL et al., 2011; SCHATZBERG, 2010). De modo semelhante à MUO, e apesar do grande avanço no tratamento com as terapias modificadoras de doença (DMTs), não existe um medicamento capaz de prevenir, reverter ou estabilizar os subtipos progressivos ou malignos da EM (MANCARDI et al., 2005; SORMANI et al., 2017).

2.2 Células-tronco Mesenquimais (MSCs)

As MSCs são células progenitoras que apresentam alta capacidade proliferativa, de auto-renovação, diferenciação e propriedades imunomoduladoras, neuroprotetoras e neurorregenerativas (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; MASTROLIA et al., 2019; NAUTA; FIBBE, 2007; YOUSEFI et al., 2019). A Sociedade Internacional para Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) propôs critérios mínimos para a identificação e caracterização das MSCs humanas *in vitro*: aderência ao plástico; potencial diferenciação nas linhagens mesodermis osteogênica, condrogênica e adipogênica; expressão (CD73, CD90 e CD105) e ausência de expressão de antígenos de superfície (CD45, CD34, CD 106, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ou HLA-II) (DOMINICI et al., 2006). Para as MSCs caninas, um perfil de expressão de antígenos de superfície celular semelhante foi identificado, que incluem: expressão de CD29, CD44, CD90 e ausência de expressão de CD34, CD45, CD146, CD11b, CD71, e de MHC-II (KANG et al., 2012; KISIEL et al., 2012; LONG et al., 2018; LUNA et al., 2014; VIEIRA et al., 2010; ZHAN et al., 2019).

2.2.1 Potencial Terapêutico para Doenças Neuroimunes

O potencial terapêutico das MSCs para as doenças autoimunes pode ser associado a três principais aspectos: (i) produção de fatores parácrinos solúveis (secretoma) cruciais para a sobrevivência e proliferação celular; (ii) modulação da resposta imune; (iii) migração para o local da lesão (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019). A imunomodulação é determinada por mecanismos que são influenciados, principalmente, pela produção e secreção de citocinas (Figura 2) (NAUTA; FIBBE, 2007).

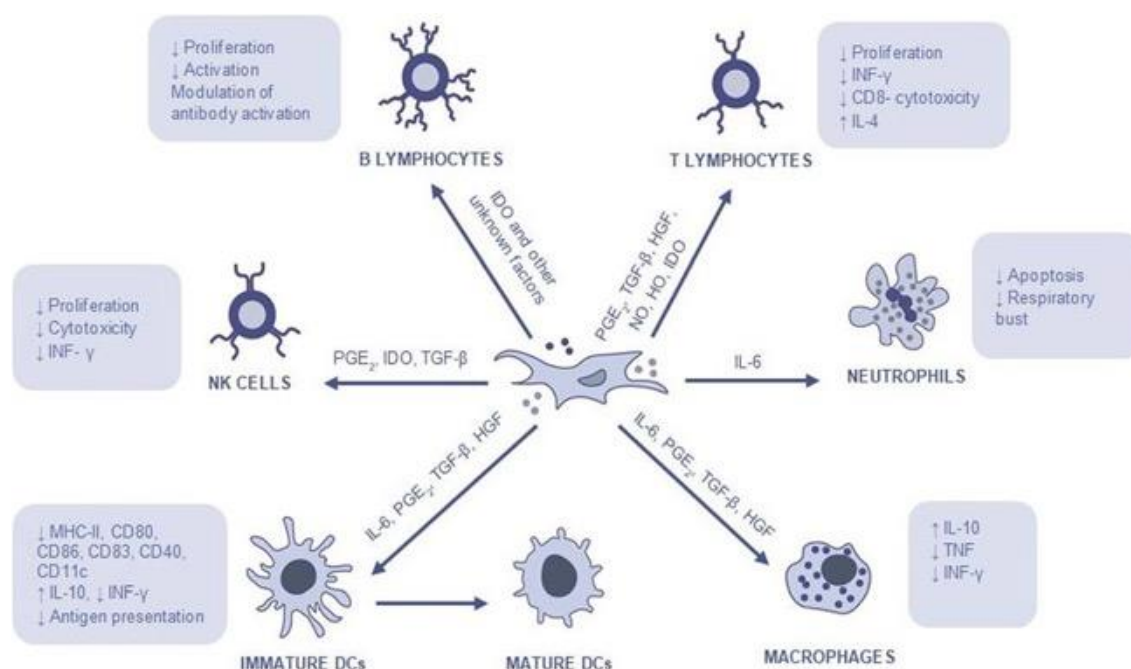


FIGURA 2. Potenciais efeitos imunomoduladores das MSCs.

A imunomodulação ocorre mediante efeitos parácrinos das MSCs com a produção de fatores solúveis ou contato célula-célula. As MSCs inibem a proliferação e ativação dos linfócitos T e as funções citotóxicas das células NK, modulam a função dos linfócitos B, interferem na maturação e capacidade das células dendríticas de ativar os linfócitos T e promovem a polarização dos macrófagos M1 em M2. MSCs, células-tronco mesenquimais; CD, *cluster of differentiation*; CTL, *cytotoxic T cells*, linfócitos T citotóxicos; DCs, *dendritic cells*, células dendríticas (i, imaturas; m, maduras); HGF, *hepatocyte growth factor*, fator de crescimento dos hepatócitos; HO, *hemoxigenase*, hemoxigenase; IDO, indoleamina 2,3 deoxigenase; IL, interleucina (-4,-6,-10); INF- γ , interferon gama; NK cells, células *natural killer*; PGE₂, prostaglandina E₂; T cells, linfócitos T; TGF- β , *transforming grow factor*, fator de crescimento transformante beta; T_{reg}, linfócitos T regulatórios. Fonte: DIAS et al. (2019).

A PGE₂ é uma citocina sintetizada pelas enzimas ciclo-oxigenases 1, 2 (COX-1, 2) e PGE sintases a partir do ácido araquidônico, sendo capaz de modular os linfócitos Th1 e quimiocinas, suprimir as funções efetoras de macrófagos e neutrófilos e aumentar a acumulação local de linfócitos T_{reg} (KALINSKI, 2012). Em virtude da secreção de PGE₂, as MSCs interferem na diferenciação de monócitos em células dendríticas (CD), alterando a sua função e maturação, o que inibe a ativação dos linfócitos T e o início das respostas imunes adaptativas (SPAGGIARI et al., 2009).

As MSCs são capazes de bloquear a proliferação de células *natural killer* (NK) induzidas por IL-2 e IL-15 e podem modular indiretamente a função dos linfócitos T *in*

vitro (MARIA SPAGGIARI; MORETTA, 2013). Previamente, MSCs humanas promoveram a transição fenotípica de linfócitos Th1 para Th2 ao reduzirem os níveis de INF- γ e aumentarem os níveis de IL-4 e IL-10 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Importaneamente, a citocina anti-inflamatória IL-10 inibe a produção das substâncias pró-inflamatórias IL-2, TNF- α , IL-12 e INF- γ e diminui a expressão de MHC-I (SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIAN, 2012).

Estudos sugerem que as MSCs são capazes de regular o processo neuroinflamatório mediado por moléculas oxidativas e pró-inflamatórias secretadas por macrófagos e micróglia (GAO et al., 2014; LANZA et al., 2009). Em virtude da secreção de IL-4 e diminuição da produção de INF- γ , as MSCs estimulam a mudança fenotípica de macrófagos M1 para M2, que inibem a proliferação de linfócitos T (GAO et al., 2014; MARIA SPAGGIARI; MORETTA, 2013). Além disto, demonstrou-se que MSCs humanas e caninas inibem a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naïve* para linfócitos Th17⁺, produtores da citocina inflamatória IL-17 (GHANNAM et al., 2010; KOL et al., 2016) que está implicada na fisiopatogenia da EM e da MUO (PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2013; SOSPEDRA; MARTIN, 2016; UCHIDA et al., 2016).

Outros efeitos das MSCs estão relacionados ao bloqueio da apoptose de neutrófilos, reduzindo a sua mobilização para a área lesionada, e à inibição da proliferação de células mononucleares mediada pelo complemento (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019). Ainda, as MSCs apresentam a capacidade suprimir a proliferação e ativação de linfócitos B, limitando a síntese de imunoglobulinas (Ig)-M, IgG e IgA pela diminuição da produção de células plasmáticas (CORCIONE et al., 2006).

Estudos com EAE evidenciaram que as MSCs tem o potencial de suprimir a resposta neuroimune e induzir neuroregeneração local por progenitores endógenos (ANDERSON et al., 2017; BAI et al., 2009; GERDONI et al., 2007; RAFEI et al., 2009; ZHANG et al., 2005). RAFEI et al (2009) observou que o transplante de MSCs alogênicas derivadas de camundongos Balb/c para camundongos C57Bl/c com EAE promoveu recuperação funcional, correlacionando com a diminuição dos níveis de INF- γ e IL-17 (RAFEI et al., 2009a). ANDERSON et al. (2017) avaliaram o efeito imunossupressor de Ad-MSCs murinas e humanas *in vitro* e *in vivo* em camundongos C57Bl/6 com EAE crônica. Os autores observaram diminuição da gravidade e da progressão da doença em consequência da supressão da atividade de linfócitos T e células dendríticas pela via do ON induzível e da COX-1, 2 (ANDERSON et al., 2017).

Os mecanismos neuro/axonioprotetivos (proteção do tecido neural contra degeneração e apoptose) das MSCs são mediados, sobretudo, pela secreção de fatores neurotróficos que apresentam capacidade de gerar efeitos tróficos no SNC, aumentando a sobrevivência neuronal e a remielinização endógena (KASSIS et al., 2008; SANCHEZ et al., 2017; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2005). Além disto, os fatores neurotróficos apresentam atividades angiogênicas, neurogênicas, sinaptogênicas, de modulação da excitotoxicidade das células da glia e inibição de cicatrizes que impedem a reconstrução do circuito neural após a lesão (CIERVO et al., 2017; PAUL; ANISIMOV, 2013; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2006). A Figura 3 representa os potenciais mecanismos de ação das MSCs na neurodegeneração.

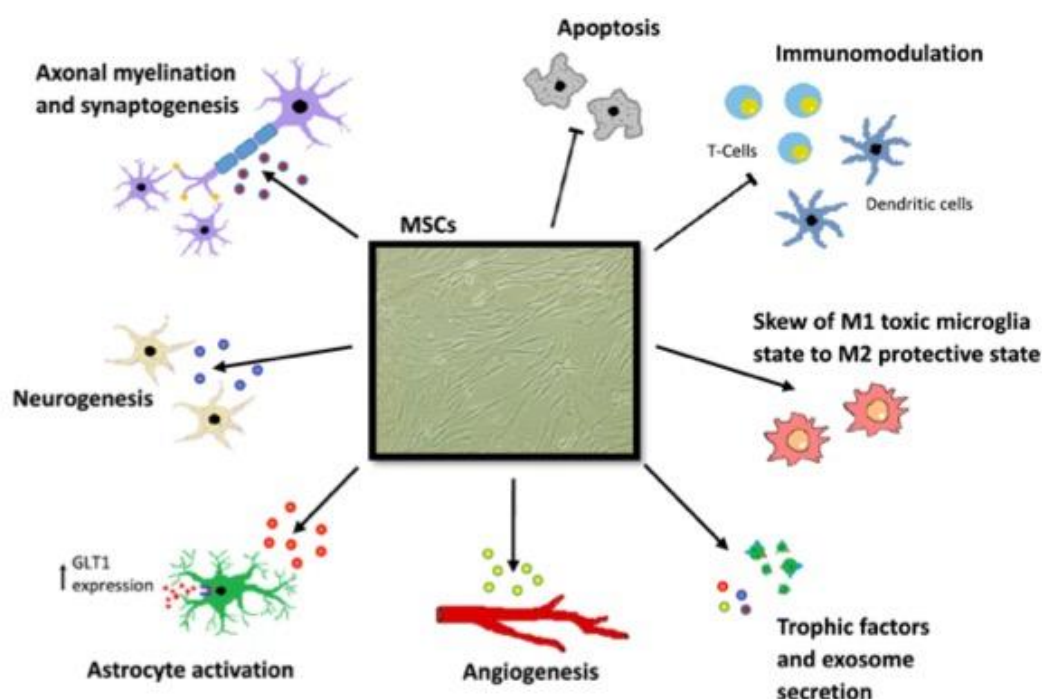


FIGURA 3. Potenciais mecanismos das MSCs na neurodegeneração.

As MSCs podem apresentar respostas terapêuticas por meio de efeitos parácrinos e contato célula-célula com células neurais residentes; induzir e apoiar processos de regeneração (angiogênese, neurogênese, ativação astrocítica, sinaptogênese) pela secreção de fatores solúveis e exossomos; atenuar as respostas inflamatórias no SNC reduzindo a gliose; possuem propriedades anti-apoptóticas; e podem limitar a excitotoxicidade modulando as funções dos astrócitos. Fonte: CIERVO et al. (2017).

ZHANG et al. (2005) observaram que MSCs humanas transplantadas em ratos com EAE pela via intravenosa (IV) apresentaram melhora funcional e diminuição da

desmielinização, provavelmente devido a promoção da oligodendrogênese em consequência da expressão do fator neurotrófico BDNF (ZHANG et al., 2005). Além disto, o BDNF pode modular a excitabilidade neuronal e a permeabilidade microvascular (PAUL; ANISIMOV, 2013). Relatou-se que o fator neurotrófico GDNF, além de promover sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos *in vitro*, é também *in vivo* um promotor robusto da sobrevivência de motoneurônios e neurônios autonômicos e está relacionado com a sobrevivência das células de Purkinje (AIRAKSINEN; SAARMA, 2002; GHITZA et al., 2010; PAUL; ANISIMOV, 2013).

O HGF é uma citocina multifuncional, envolvida no crescimento celular, morfogênese e motilidade celular, que participa do desenvolvimento de células neurais e remielinização, promove angiogênese e dispõe de propriedades anti-apoptóticas (BAI et al., 2012; SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIAN, 2012). Além disto, o HGF é um mediador anti-proliferativo de MSCs humanos em linfócitos T (DRAGO et al., 2013). Identificou-se que a expressão de HGF no SNC de camundongos inibiu a EAE e que o tratamento sistêmico com HGF acelerou marcadamente a remielinização nas lesões induzidas da medula espinhal (BAI et al., 2012).

2.2.2 MSCs: Fontes de obtenção, Imunoevasão e Potencialização dos Efeitos Terapêuticos

As MSCs derivadas do tecido adiposo (*adipose-derived mesenchymal stem cells*, Ad-MSCs) constituem uma fonte abundante e acessível de MSCs maduras, que requerem protocolos pouco invasivos para o isolamento, apresentam fácil manipulação e alta expansão em cultura (NEUPANE et al., 2008; STRIOGA et al., 2012; ZUK P.A., ZHU M., MIZUNO H., HUANG J., 2001). Além disto, as Ad-MSCs apresentam maior expressão de fatores solúveis *in vitro* do que MSCs derivadas da medula óssea (*bone-marrow mesenchymal stem cells*, BM-MSCs) (HSIAO et al., 2012). Recentemente, a placenta tem sido amplamente estudada por dispor de uma fonte de células fetais e maduras que apresentam maior potencial de multiplicação, capacidade imunomoduladora e de produção de fatores solúveis *in vitro* comparado a outras fontes (*placental-derived mesenchymal stem cells*, PMSCs) (FARMER, 2017; LEE et al., 2012; WANG et al., 2015). As PMSCs apresentam acessibilidade simples por meio de isolamento a partir do tecido placentário que seria originalmente descartado, o que permite o uso de protocolos

de obtenção ainda menos invasivos, e apresenta elevada capacidade de auto-renovação (IN 'T ANKER et al., 2004; YOUSEFI et al., 2019).

As MSCs possuem características “imunoevasivas”, permitindo a sua função e sobrevivência em ambientes alogênicos por meio da hip imunogenicidade, imunomodulação da resposta celular e imunossupressão do ambiente local (ANKRUM; ONG; KARP, 2014; FAIELLA; ATOUI, 2016; NAUTA; FIBBE, 2008; VOJNITS; LI, 2014). A identificação da expressão de MHC-I e ausência de expressão MHC-II e de moléculas co-estimuladoras pelas MSCs auxiliam a “imuno evasão” (CHANG et al., 2006; LI et al., 2007), permitindo o uso potencial de MSCs alogênicas em doenças imunomediadas (HONG et al., 2016; LALU et al., 2012).

Por outro lado, relataram-se respostas imunológicas mediadas por células e humorais a MSCs incompatíveis com o MHC do receptor, apesar de as implicações clínicas serem, ainda, desconhecidas (ELIOPOULOS, 2005; ISAKOVA et al., 2014; ZANGI et al., 2009). Sugere-se que a terapia com MSCs autólogas poderia diminuir a possibilidade de uma reação imunológica a receptores incompatíveis (BERGLUND et al., 2017), entretanto, apresenta limitações, pois é passível de ser utilizada apenas nos estágios finais da doença em decorrência do tempo necessário para coleta do tecido e expansão das células (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

A via de administração e a migração das MSCs para o local da lesão ou *homing* está relacionada com o nível de eficácia do transplante (KEAN et al., 2013; ZHANG et al., 2018). A via de transplante é selecionada ao se considerar a biodistribuição celular (desvio da BHE ou aprisionamento das células nos órgãos sistêmicos) e o grau de invasividade (trauma ou inflamação pós-transplante) (CIERVO et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Para as doenças do SNC, diferentes vias de administração têm sido estudadas, incluindo intra-articular (IA), IV, intra-parequimatosa (IP) e intratecal (IT) (CIERVO et al., 2017; KARUSSIS et al., 2010a; MANSOOR; ZABIHI; GHASEMI-KASMAN, 2019; ZHANG et al., 2018).

As vias IA e IP são mais invasivas e apresentam risco significativo de microembolização ou lesão direta no SNC, respectivamente (ARGIBAY et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Por outro lado, a via IV é menos invasiva e fácil de ser realizada, entretanto, pode apresentar limitações em razão de maior parte das MSCs ser retida na microvasculatura dos pulmões e outros órgãos, o que limita o número de células que atinge o SNC (BOLTZE et al., 2015; CHEN et al., 2001; FISCHER et al., 2009; LEIBACHER; HENSCHLER, 2016). A capacidade de sobrevivência e migração de

MSCs transplantadas diretamente no LCR foi anteriormente descrita em modelo de lesão experimental da medula espinhal torácica em ratos (SATAKE; LOU; LENKE, 2004). A via IT apresenta vantagens uma vez que permite que as MSCs administradas circulem adjacentes ao fluxo do LCR ao evitar a permeabilidade da BHE, resultando em um número maior de células que atinge as áreas lesionadas no SNC (BAKSHI et al., 2004; KARUSSIS et al., 2010; SYKOVÁ et al., 2017b).

A estimulação direta de MSCs com moléculas bioativas ou bioquímicas representa um novo método para a otimização da sua função (NORONHA et al., 2019; SEO; SHIN; KIM, 2019). Além disso, permite simular *in vitro* a sobrevivência, o comportamento e os potenciais efeitos terapêuticos em microambientes inflamatórios (NORONHA et al., 2019; SEO; SHIN; KIM, 2019). As citocinas pró-inflamatórias tem demonstrado potencializar os efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios e neuroprotetores das MSCs *in vitro* (NORONHA et al., 2019). Relatou-se que o IFN- γ induz a secreção de IDO e IL-10 (DE WITTE et al., 2016) pelas MSCs e o TNF- α regula positivamente as proteínas IDO, HGF e IL-10 (ENGLISH et al., 2007; PRASANNA et al., 2010). A IDO catalisa a conversão de triptofano a quiurenina, reduzindo a ativação e proliferação de linfócitos T, e induz a produção de linfócitos T_{reg} (MANCUSO et al., 2015; MATYSIAK et al., 2008; SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIAN, 2012). Os linfócitos T_{reg}, por sua vez, promovem a diferenciação de oligodendrócitos e (re)mielinização (DOMBROWSKI et al., 2017; MELIEF et al., 2013).

Em nosso conhecimento, poucos estudos mostraram a expressão e secreção de fatores solúveis nas Ad-MSCs e PMSCs caninas. Observou-se previamente que Ad-MSCs caninas secretam TGF- β , HGF, PGE2, IDO e expressam IL-6, IL-8, VEGF e HGF (KANG et al., 2008), enquanto PMSCs caninas secretam PGE2, IDO, IL-6, IL-8 e proteína quimioatraente de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) (LONG et al., 2017). As citocinas IL-6 e IL-8, além de apresentarem importantes propriedades imunomoduladoras, dispõem de capacidade neuroprotetora (JUNG; KIM; CHAN, 2011) e promoção da angiogênese (LI et al., 2003), respectivamente. A quimiocina MCP-1, por sua vez, está relacionada a regulação da inflamação e tem sido implicada na promoção de neuroproteção e angiogênese (JURA; SKALNIAK; KOJ, 2012; MADRIGAL et al., 2009; NIU et al., 2008).

Neste estudo, se hipotetizou se Ad-MSCs e PMSCs caninas expressam e secretam fatores solúveis *in vitro* após estimulação direta com as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IFN- γ combinado com TNF- α . Se hipotetizou se Ad-MSCs alogênicas transplantadas em cães com MUO promovem a recuperação clínica e diminuem a inflamação nas imagens de ressonância magnética e líquido cefalorraquidiano *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o perfil de expressão gênica e secretório de Ad-MSCs e PMSCs caninas após estimulação direta com IFN- γ e IFN- γ combinado com TNF- α .

Avaliar *in vivo* a resposta clínica ao transplante intratecal/intravenoso de Ad-MSCs alogênicas em cães com MUO refratários ao tratamento imunossupressor.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de expressão gênica das neurotrofinas e citocinas BDNF, GDNF, HGF, IDO, IL-10 e PTGES2 nas AD-MSCs e PMSCs estimuladas com INF- γ e INF- γ associado a TNF- α ;
- Avaliar o perfil de secreção dos fatores solúveis MCP-1, GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10 do meio condicionado dos cultivos celulares das Ad-MSCs e PMSCs estimuladas com INF- γ e INF- γ associado a TNF- α ;
- Avaliar a recuperação funcional dos grupos experimentais PAC e cMSC;
- Avaliar as imagens de ressonância magnética dos grupos experimentais PAC e cMSC;
- Avaliar o líquido cefalorraquidiano nos dos grupos experimentais PAC e cMSC;
- Avaliar a resposta ao tratamento dos grupos experimentais PAC e cMSC;
- Avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas dos grupos experimentais PAC e cMSC;
- Descrever os efeitos adversos e colaterais dos grupos experimentais PAC e cMSC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu (protocolo nº 0056/2018). A coleta do tecido adiposo e da placenta caninos foram realizadas de acordo com consentimento livre e esclarecido dos tutores dos animais.

Todos os animais utilizados no estudo *in vivo* eram cães pertencentes a tutores que autorizaram o tratamento imunossupressor, a realização do transplante intratecal e/ou intravenoso e os exames de acompanhamento por meio do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1 Estudo *in vitro*

4.1.1 Coleta do Tecido Adiposo Canino e Isolamento das Ad-MSCs

Sob condições assépticas, coletou-se o tecido adiposo da região da parede interna abdominal de cadelas híginas (n=4), sem raça definida, com idade de 8-36 meses e peso de 15-25 kg, submetidas a ovariectomia eletiva. O exame clínico e as análises de hemograma e bioquímica sérica das doadoras foram normais.

Após a coleta, lavou-se o tecido adiposo com solução salina a 0,9% e acondicionou-se em frasco cônico, contendo 20 mL de 1x Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), penicilina (100 unidades/mL) com estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (250 µg/mL) (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA). As amostras permaneceram sob refrigeração a 4°C durante 24 horas. Em seguida, seguiu-se protocolo de isolamento de Ad-MSCs previamente descrito (CHUNG et al., 2012; RUSSELL et al., 2016), com modificações.

Pesou-se aproximadamente 1g do tecido adiposo e realizou-se digestão enzimática com collagenase IA (1 mg/mL) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) em banho-maria a 37°C durante 1 hora, homogeneizando a cada 10 minutos. Realizou-se o bloqueio da enzima com meio de cultura padrão contendo 90% de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) 10% (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA). Centrifugou-se a suspensão e o sobrenadante foi filtrado (filtro de 70 µm). Ressuspendeu-se o *pellet* em 15 mL de meio de cultura padrão

com DMEM a 90%, SFB a 10%, penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 unidades/mL) e anfotericina B (250 µg/mL) (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA), se cultivou em frascos de cultura de 75 cm² (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brazil) e incubou-se em estufa a 37 °C e atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% de CO². Trocou-se o meio de cultura a cada 3-4 dias. Submeteu-se as células isoladas (passagem zero, P0) a dissociação enzimática após a confluência atingir 80-90%.

4.1.2 Coleta da Placenta Canina e Isolamento das PMSCs

Sob condições assépticas, coletaram-se as placentas (n=3) a termo (56-61 dias) de cadelas prenhes da raça Bulldog Inglês (n=2), com idade entre 3-8 anos. O exame clínico e as análises de hemograma e bioquímica sérica das doadoras foram normais. Condicionaram-se as placentas em tubos cônicos estéreis, contendo 15 mL de 1x Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA), que permaneceram a 8°C durante 20h.

Seguiu-se protocolo de isolamento descrito previamente por LONG et al. (2017). No fluxo laminar, dissecou-se a banda central do tecido placentário em fragmentos de 0,5-1 cm e pesou-se aproximadamente 1 g. Lavou-se o fragmento com HBSS e penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Realizou-se uma nova dissecação mecânica e adicionou-se 5 mL de tripsina a 0,25% (Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) e incubaram-se os fragmentos a 37°C durante 30 minutos. Realizou-se o bloqueio da enzima com meio de cultura padrão com DMEM a 90%, SFB a 10%, penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 unidades/mL) e anfotericina B (250 µg/mL) (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) e centrifugou-se a 1.500 rpm durante 7 minutos. Em seguida, incubou-se o *pellet* formado com 5 mL de collagenase IA (1 mg/mL) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) a 37°C, durante 45 minutos. Realizou-se o bloqueio da collagenase com meio de cultura padrão e centrifugou-se a suspensão. Ressuspendeu-se o *pellet* em 8 mL de meio de cultura padrão, em frasco de cultura de 182 cm² (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brazil) e incubou-se em estufa a 37 °C e atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% de CO². Trocou-se o meio de cultura a cada 3-4 dias até atingir a confluência de 70-80%.

4.1.3 Formação do Banco de Ad-MSCs e PMSCs caninas

Para a formação do banco de Ad-MSCs e PMSCs em diferentes passagens, submeteram-se as Ad-MSCs e PMSCs em passagem zero (P0) ao protocolo de dissociação enzimática com tripsina. Para a remoção das células aderidas aos frascos de cultura, utilizou-se 7 mL de tripsina (TrypLE™ Express Enzyme, Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) e incubou-se a 37°C durante quatro minutos para ativação enzimática. Realizou-se o bloqueio da enzima com meio de cultura padrão e centrifugou-se a suspensão minutos para a obtenção do *pellet* de células. Realizou-se a contagem do número total de células e a determinação da viabilidade celular utilizando-se solução de azul de 0,4% de trypan (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) e câmara de Neubauer. Após, ressuspenderam-se as células com meio de cultura em frasco de 182 cm² (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brazil) e incubou-se a 37 °C e atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% de CO². O protocolo foi realizado até a obtenção de diferentes passagens (P1-P3).

Para a criopreservação, as PMSCs e Ad-MSCs foram submetidas ao protocolo de tripsina após a confluência atingir 80%, conforme descrito anteriormente. Utilizou-se 1,5 mL de meio de congelamento, constituído de 1,35 µL de SFB (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) e 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil). Acondicionaram-se as suspensões celulares em criotubos estéreis em freezer -80 °C no container de congelamento Nalgene® Mr. Frosty durante 24 horas, seguido do permanente acondicionamento em nitrogênio líquido.

Para a expansão de PMSCs e Ad-MSCs criopreservadas, realizou-se o descongelamento rápido em banho-maria a 37°C. Em seguida, adicionou-se as suspensões em tubos cônicos de 15 mL com 4 mL de 1x HBSS (Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) e centrifugou-se. Ressuspendeu-se o *pellet* obtido em 30 mL de meio de cultura contendo DMEM, 10% de SFB, penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (250 µg/mL) (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) e incubou-se a 37 °C e atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% de CO².

4.1.4 Diferenciação em Linhagens Mesodermas e Análise Imunofenotípica das Ad-MSCs e PMSCs Caninas

As Ad-MSCs e PMSCs foram caracterizadas por meio de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e de análise imunofenotípica por citometria de fluxo, de acordo com métodos previamente descritos (LANKFORD et al., 2015; LUNA et al., 2014; VIEIRA et al., 2010; ZHAN et al., 2019). As diferenciações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (StemPro® Adipogenesis, Osteogenic, Chondrogenic, Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA).

Para a diferenciação nas três linhagens mesodermas, descongelaram-se as quatro amostras de Ad-MSCs e três de PMSCs em passagem P2-P3. Em triplicatas, adicionaram-se 1×10^4 células/cm² em placa de 24 poços com 1 mL de meio de cultura padrão e incubou-se durante três dias. Em seguida, descartou-se o meio de cultura e trocou-se o meio de diferenciação a cada três dias durante 14 dias (adipogênica) ou 21 dias (osteogênica). Após, removeu-se o meio de diferenciação e fixaram-se as Ad-MSCs e PMSCs com paraformaldeído a 4%. Para a confirmação da diferenciação adipogênica, realizou-se a coloração com Oil Red O a 60% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a partir de solução estoque de isopropanol a 0,5%. Para a diferenciação osteogênica, realizou-se a coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 2% em pH 4.5.

Para a diferenciação condrogênica, ressuspenderam-se $1,6 \times 10^7$ céls/mL em tubos cônicos de 15 mL estéreis. Em seguida, centrifugaram-se os tubos e incubaram-se os *pellets* obtidos durante 4 dias. Posteriormente, removeu-se o meio de cultura e adicionou-se o meio diferenciação condrogênica, permanecendo em incubação durante 21 dias. Após, removeu-se o meio de diferenciação e fixou-se o *pellet* em formol tamponado a 10%. As lâminas com os cortes histológicos das micromassas obtidas foram coradas com hematoxilina eosina (HE) e azul de toluidina (AT).

Realizou-se a análise imunofenotípica das linhagens de Ad-MSCs e PMSCs caninas passagem P2-P3, em reações contendo os seguintes anticorpos conjugados: CD 45 (PE Mouse anti-human, 554878), CD 106 (PE Mouse anti-rat, 559229), CD11b (APC Mouse anti-rat, 562102), CD90 (APC Mouse anti-human, 559869), HLA-DR (FITC, Mouse anti-human, 555560), CD44 (FITC Rat anti-mouse, 561859) e isotípicos PE (Mouse IgG1, 550617), APC (Mouse IgG1, 555751), FITC (Mouse IgG2b, 555742) (todos BD, Pharmigen™, San Diego, CA, EUA). Para as Ad-MSCs avaliou-se o anticorpo CD34 (FITC Anti-human, 343604, Biolegend®, San Diego, CA, EUA) e para as PMSC o anticorpo CD34 (PE Mouse anti-dog, 559369, BD, Pharmigen™, San Diego, CA, EUA). Os anticorpos que não apresentavam reatividade cruzada para a espécie

canina descrita pelo fabricante foram validados utilizando células positivas para o marcador de superfície a ser pesquisado. Brevemente, suspendeu-se 1×10^6 células em 100 μL de solução isotônica (*isoton*®) por tubo. Adicionaram-se os anticorpos conjugados aos fluorocromos (tubos-testes) e apenas células (tubos auto-controle). Incubaram-se os anticorpos durante 20 minutos, completou-se o volume da reação com 500 μL de *isoton*® e centrifugaram-se os tubos. Em seguida, realizaram-se as análises no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson Company, San Jose, USA), padronizando o total de 2×10^4 eventos por tubo, e avaliaram-se os dados com os softwares Cell Quest Pro e FlowJo® (Becton Dickinson Company, San Jose, USA).

4.1.5 Estimulação Direta das Ad-MSCs e PMSCs in vitro com IFN- γ e IFN- γ Combinado com TNF- α

Alíquotas de cada amostra de Ad-MSCs e PMSCs foram estimuladas com IFN- γ ou IFN- γ combinado com TNF- α , conforme descrito previamente (AMORIM et al., 2020) para (i) estudo da expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias e (ii) análise quantitativa de citocinas do meio condicionado. Utilizaram-se quatro amostras de Ad-MSCs e três de PMSCs em P3 oriundas do banco de MSCs. Submeteu-se as alíquotas ao descongelamento rápido, plaqueamento e expansão em meio de cultura padrão com 90% de DMEM e 10% de SFB, penicilina (100 unidades/mL) com estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) (todos Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA). Plaqueou-se 1×10^5 células/ cm^2 por poço em placa de 24 poços aderente (área de crescimento 1,9 cm^2) (Corning® Costar®, New York, USA), com 0,75 mL de volume total de meio de cultura em duplicatas.

Dividiram-se as Ad-MSCs e PMSCs em três grupos: (i) células não-estimuladas e cultivadas em meio de cultura padrão (controle); (ii) células estimuladas unicamente com IFN- γ (50 ng/mL; IFN- γ recombinante canino, Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA); (iii) células estimuladas com IFN- γ (50 ng/mL, Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA) em combinação com TNF- α (50 ng/mL, Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA). As células foram estimuladas durante 96 horas. Em seguida, coletou-se o meio condicionado para o estudo do perfil secretório de fatores solúveis e criopreservou-se a -80°C até subsequente análise. Na sequência, adicionou-se 400 μL de trizol (TRIzol™, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brazil), homogeneizou-se para que as

células se soltassem, coletaram-se as MSCs estimuladas e controle, e se criopreservou a -80°C até subsequente análise de expressão gênica de citocinas e fatores neurotróficos.

4.1.6 Expressão Gênica de Citocinas Anti-inflamatórias e Fatores Neurotróficos das Ad-MSCs e PMSCs Estimuladas e Controles

Extraíu-se o RNA total das Ad-MSCs e PMSCs após estimulação direta com IFN- γ , IFN- γ combinado com TNF- α e células não-estimuladas, utilizando-se um método híbrido de trizol (TRIzol™, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brazil) e clorofórmio, seguido do kit para extração de RNA Mini RNAeasy™ (Qiagen, São Paulo, Brazil). Brevemente, homogeneizaram-se as células em 1 mL de trizol e, em seguida, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio. Incubaram-se amostras durante três minutos e centrifugaram-se por 14 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C. Transferiu-se cuidadosamente a fase aquosa contendo o RNA para um novo tubo e adicionou-se igual volume de etanol 100%. Logo após, adicionaram-se as amostras nas colunas do Mini RNAeasy™ kit acopladas em tubos de coleta, e procedeu-se aos procedimentos descritos nas instruções do fabricante.

Determinou-se o rendimento de RNA por espectrofotometria com o equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA). Diluiu-se o RNA obtendo-se um volume de 10 μ L para todas as amostras. Realizou-se a síntese de cDNA com os reagentes do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante e a transcrição reversa para a obtenção do cDNA com o termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific), sob as seguintes condições de termociclagem: 10 minutos a 25°C; 12 minutos a 37 °C; e 5 minutos a 85 °C. Diluiu-se o cDNA obtido com água livre de RNA para um volume total de 110 μ L. Criopreservaram-se as amostras a -80°C até subsequente análise por Reação de Polimerização em Tempo Real Quantitativa (qPCR). Empregou-se 2 μ L do cDNA e a enzima PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania) e o termociclador QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific). As condições de termociclagem constam no Quadro 3.

Os oligonucleotídeos iniciadores caninos foram desenhados de acordo com a base de dados do GeneBank® (NIH, Genetic Sequence Database) (Quadro 2). Estudaram-se

seis genes de referência caninos, correspondentes a: enzima prostaglandina-endoperoxidase sintase 2 (PTGES2); citocinas anti-inflamatórias IDO e IL-10; e fatores neurotróficos BDNF, GDNF e HGF. Utilizaram-se quatro genes caninos endógenos, que corresponderam a: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH); proteína ribossomal S5 (RPS5); e proteína ribossomal S19 (RPS19).

QUADRO 2. Iniciadores utilizados nas reações de qPCR.	
Iniciador	Sequência (5' -> 3')
BDNF	(F) GTGTCGAAAGGCCAACTGAAG (R) CGTGTAACCCATGGGATTGC
GDNF	(F) GGTTTGCTACAGCCAGCAGTT (R) CGCACCATGTTCAAAATCCA
HGF	(F) ATGGTTCTTGGCGTCATTGTT (R) AATGCCAGGACGATTTGGAA
IL-10	(F) CCCAGGATGGCAACTCTTCTC (R) CGGGATGGTATTTTGCAGATC
IDO	(F) TGTGGACCCAAGCACGTTTT (R) AGTTGCCTTTCCAACCAGACA
<i>PTGES2</i>	(F) GCCTGCAGCTGACCCTGTA (R) CACGGACCTTGCTGCAGAA
GAPDH	(F) CATCAACGGGAAGTCCATCT (R) TACTCACCACCAGCATCACC
HPRT	(F) CGGCTTGCTCGAGATGTGAT (R) GCACACAGAGGGCTATGT
RPS5	(F) GAGGCCTCAGGCTGTGAT (R) AGCCAAATGGCCTGATTCAC
RPS19	(F) GGGTCCTCCAAGCCCTAGAG (R) CGGCCCCCATCTTGGT

PTGES2, prostaglandina-endoperoxidase sintase 2. IDO, indoleamina-2,3-dioxigenase. IL-10, interleucina - 10. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro. GDNF, fator neurotrófico derivado da glia. HGF, fator de crescimento de hepatócitos. HPRT, hipoxantina guanina fosforibosiltransferase. GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. RPS5, proteína ribossomal S5. RPS19, proteína ribossomal S19. F, *Forward*. R, *Reverse*.

QUADRO 3. Condições de termociclagem das amplificações por qPCR.		
Ciclos	Condições de termociclagem	
	Temperatura	Tempo
40 ciclos	50 °C	2 minutos
	95 °C	2 minutos

	95 °C	1 segundo
	60 °C	30 segundos
	Curva de fusão	
Contínuo	1,6 °C	1 segundo
	95 °C	15 segundos
	1,6 °C	1 segundo
	60 °C	1 minuto

4.1.7 Perfil de Secreção de Fatores Solúveis do Meio Condicionado das Ad-MSCs e PMSCs Estimuladas e Controles

Quantificaram-se os fatores solúveis GM-CSF, MCP-1, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10 no meio condicionado dos cultivos celulares de Ad-MSCs e PMSCs após estimulação direta com IFN- γ e IFN- γ combinado com TNF- α e controle (células não-estimuladas), pelo painel de ensaio multiplexado MILLIPLEX® (CCYTOMAG-90K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Realizou-se o ensaio de acordo com as instruções do fabricante. Adicionaram-se 25 μ L dos controles e das amostras nos respectivos poços da placa, adicionaram-se *beads* conjugados e incubou-se *overnight* a 8°C, sob agitação. Após, lavaram-se os *beads* para remoção das amostras que não se ligaram, adicionaram-se 25 μ L dos anticorpos de detecção e incubou-se a temperatura ambiente (20-25°C). Em seguida, adicionou-se 25 μ L de estreptavidina conjugada com ficoeritrina e incubou-se a temperatura ambiente durante 30 minutos. Removeu-se o conteúdo dos poços e lavou-se com água destilada. Adicionou-se 150 μ L de *Drive Fluid* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) em cada poço e utilizou-se o analisador MAGPIX® 200™ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para análise. As imagens coletadas foram quantificadas com o software Luminex xPONENT® 4.3 e a posterior plotagem das curvas padrão e análise dos dados com o software MILLIPLEX® Analyst 5.1.

4.2 Estudo *in vivo*

Este foi um estudo prospectivo não-randomizado, realizado em um único centro, no Serviço de Neurologia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Botucatu - SP.

4.2.1 Animais e Momentos Experimentais

Os cães corresponderam a dois grupos experimentais:

1. Grupo PAC (n=12): Cães diagnosticados com MUO e tratados com o protocolo imunossupressor de prednisona e citarabina (ara-C).
2. Grupo cMSC (n=5): Cães do grupo PAC que apresentaram remissão parcial/ausente ao tratamento imunossupressor e tratados com dois transplantes de Ad-MSCs alogênicas.

4.2.1.1 Grupo PAC

Critérios de inclusão: Os cães foram diagnosticados com MUO de acordo com os seguintes critérios de inclusão: (1) cães com mais de 6 meses de idade; (2) com hiperintensidade intra-axial única, difusa/múltipla nas imagens de RM do SNC em tempo ponderado em T2; (3) com líquido cefalorraquidiano inflamatório; e (4) exclusão de doenças infecciosas comuns da região geográfica (GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010).

- **Pré-tratamento:** Realizaram-se exame neurológico (Escala de Déficit Neurológico, EDN), aquisição das imagens de RM, análise do LCR e exames de hemograma e bioquímica sérica.
- **Início do tratamento:** Iniciou-se o tratamento imunossupressor imediatamente após o diagnóstico dos cães.
- **40 dias pós-tratamento:** Realizaram-se o exame neurológico (Escala EDN), e os exames de hemograma e bioquímica sérica.
- **80 dias pós-tratamento:** Realizaram-se o exame neurológico (Escala EDN), aquisição das imagens de RM, análise do LCR e os exames de hemograma e bioquímica sérica. Avaliou-se a resposta ao tratamento por meio da Escala de Resposta de Tratamento para Cães com MUO (MERT) (Figura 4).

A ocorrência de efeitos colaterais foi monitorada durante todo o experimento.

4.2.1.2 Grupo *cMSC*

Crítérios de inclusão: Foram selecionados cães do grupo PAC que apresentaram resposta clínica parcial ou ausente ao tratamento imunossupressor pela Escala MERT. Os cães não poderiam estar recebendo corticosteroides em doses imunossupressoras, assim como outros imunossupressores.

- **Pré-transplante:** Realizaram-se o exame neurológico (Escala EDN), aquisição das imagens de RM, análise do LCR e exames de hemograma e bioquímica sérica.
- **Primeiro transplante:** Realizou-se o primeiro transplante de Ad-MSCs alogênicas pela via intratecal ou intravenosa imediatamente após o resultado da avaliação de 80 dias pós-tratamento para os cães do grupo PAC que foram inseridos no grupo cMSC.
- **40 dias pós-transplante e segundo transplante:** Realizaram-se a o exame neurológico (Escala EDN), análise do LCR e os exames de hemograma e bioquímica sérica. Realizou-se o segundo transplante de AD-MSCS alogênicas pela via intratecal ou intravenosa.
- **80 dias pós-transplante:** Realizaram-se o exame neurológico (Escala EDN), aquisição das imagens de RM, análise do LCR e os exames de hemograma e bioquímica sérica. Avaliou-se a resposta ao tratamento (Escala MERT) (Figura 4).

A ocorrência de efeitos adversos foi monitorada durante todo o experimento.

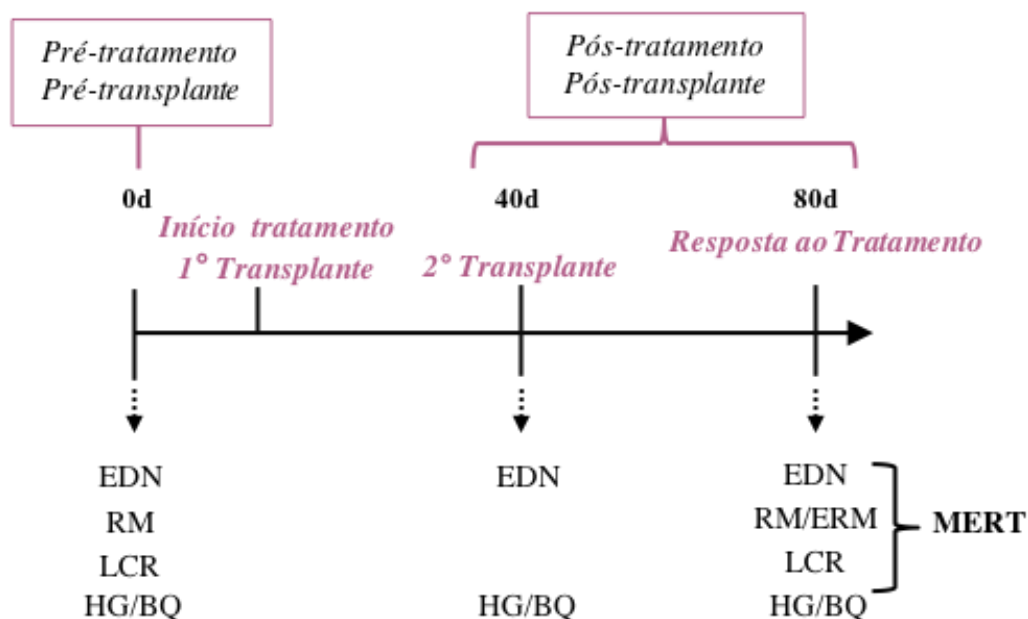


FIGURA 4. Delineamento experimental do estudo *in vivo*.

EDN, escala de déficit neurológico. RM, imagens de ressonância magnética. LCR, líquido cefalorraquidiano. HG/BQ, exames de hemograma e bioquímica sérica. ERM, escala de ressonância magnética. MERT, escala de resposta ao tratamento para cães com MUO.

4.2.2 Tratamento Imunossupressor e Terapia Celular

4.2.2.1 Grupo PAC

Doze cães com MUO foram tratados com o protocolo imunossupressor de prednisona (EMS, Indústria Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brazil) por via oral em comprimidos de 5 ou 20 mg, associados a ara-C (Citarax®, Blau Farmacêutica S/A, São Paulo, Brazil) por via subcutânea (SC) ou intravenosa (IV), em solução injetável de 20 mg/mL, conforme previamente descrito (SCHATZBERG, 2010) (Figura 5).

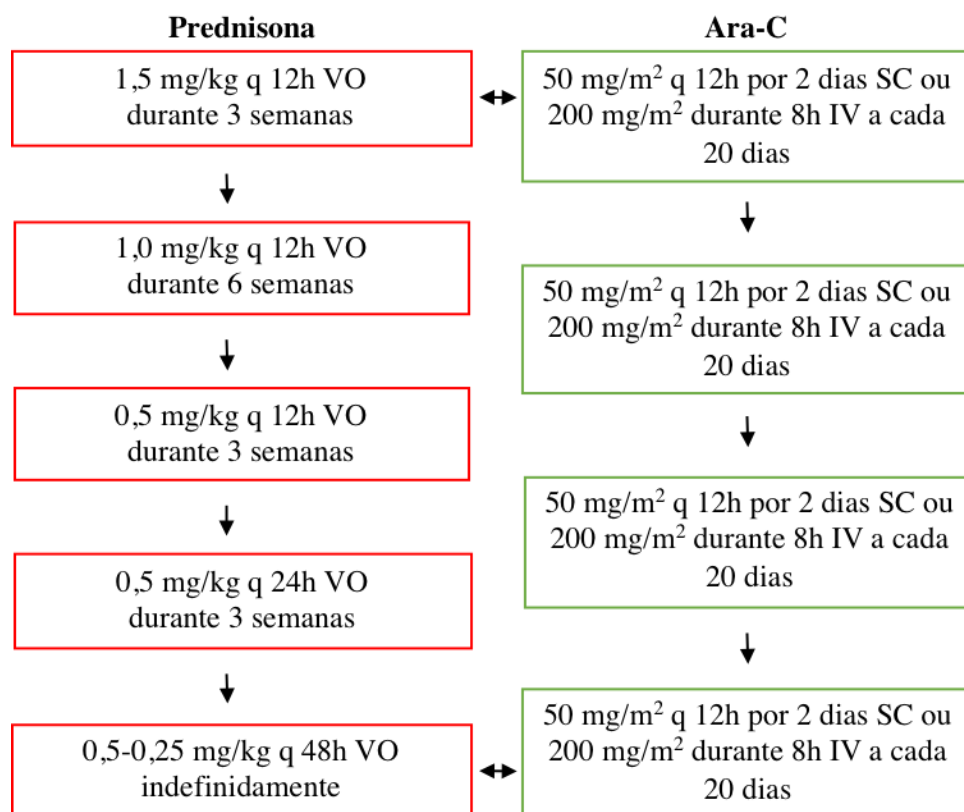


FIGURA 5. Protocolo de imunossupressão utilizado no grupo PAC.

Ara-C, citarabina. VO, via oral. IV, via intravenosa. SC, via subcutânea.

FONTE: Adaptado de LOWRIE, SMITH E GAROSI (2013) e SCHATZBERG (2010).

4.2.2.2 Grupo *cMSC*

Do grupo PAC, devido aos cães 6 e 9 virem a óbito antes do momento final de reavaliação, o cão 11 vir a óbito após o momento final de reavaliação e os cães 3 e 12 abandonaram o estudo, cinco cães (cães 4, 5, 7, 8 e 10) que apresentaram remissão parcial ou ausente ao tratamento imunossupressor pela Escala MERT foram tratados com dois transplantes de Ad-MSCs caninas alogênicas.

Realizaram-se os transplantes de Ad-MSCs caninas na dose de $2,5 \times 10^6$ /peso vivo no momento pré-transplante e aos 40 dias após o primeiro transplante. Apenas os cães em que o transplante pela via intratecal era impossibilitado devido a presença de alterações clínicas que não permitiam que o animal fosse anestesiado (P. ex. hepatopatia) receberam o transplante de Ad-MSCs pela via IV. O restante dos cães recebeu o transplante de Ad-MSCs pela via IT (Quadro 4).

QUADRO 4. Via de transplante de Ad-MSCs utilizada nos cães do grupo cMSC.				
Cão	Primeiro Transplante		Segundo Transplante	
	IT	IV	IT	IV
4	x		x	
5	x		x	
7	x			
8		x		x
10		x	x	

As Ad-MSCs caninas em P2-P3 previamente caracterizadas foram submetidas ao descongelamento rápido e expandidas em 4-5 dias até atingirem >80% de confluência, de acordo com os métodos anteriormente descritos neste estudo. Lavou-se o *pellet* obtido por meio de dissociação enzimática com solução de HBSS (Gibco™, ThermoFischer, São Paulo, Brazil) e centrifugou-se a 1.200 rpm durante 10 minutos. Repetiu-se a lavagem do *pellet* duas vezes. Diluiu-se o *pellet* final com *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS, Gibco™, ThermoFischer, São Paulo, Brazil) para o transplante IT e em solução fisiológica a 0,9% de cloreto de sódio (NaCl 0,9 %, Laboratório Sanobiol Ltda., Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil) para o transplante IV. A suspensão contendo as Ad-MSCs foi aspirada com uma seringa estéril e agulha calibre 30x7cm (BD Insyte™, Becton Dickinson Company, San Jose, USA) e transferida para um frasco de vidro estéril e vedado.

Realizou-se o transplante IT com o animal anestesiado, imediatamente após a coleta do LCR. A suspensão contendo as Ad-MSCs foi aspirada do frasco de vidro com agulha e seringas estéreis de 1 mL minutos antes da administração. Acoplou-se a seringa contendo a suspensão contendo as Ad-MSCs ao catéter utilizado para a coleta do LCR e s injetou-se lenta e continuamente (1 mL/min) (Figura 6B). Em seguida o animal foi acordado da anestesia e mantido em observação durante 12 horas.

Realizou-se o transplante IV com o animal acordado. O cão recebeu fluidoterapia com NaCL 0,9% (Laboratório Sanobiol Ltda., Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil) por pelo menos 1 hora antes do início do transplante, durante o transplante e por 12 horas após o transplante. A suspensão contendo as Ad-MSCs foi aspirada do frasco de vidro

com agulha e seringas estéreis de 3-5 mL minutos antes do transplante. Realizou-se a punção da veia cefálica para colocação do catéter intravenoso periférico 20G (BD Insyte™, Becton Dickinson Company, San Jose, USA) e injetou-se a suspensão com Ad-MSCs diretamente no equipo da fluidoterapia, em torno de 30 minutos por alíquota de 5 mL (ARZI et al., 2016). Após o término do transplante o animal foi mantido em observação durante 12 horas.

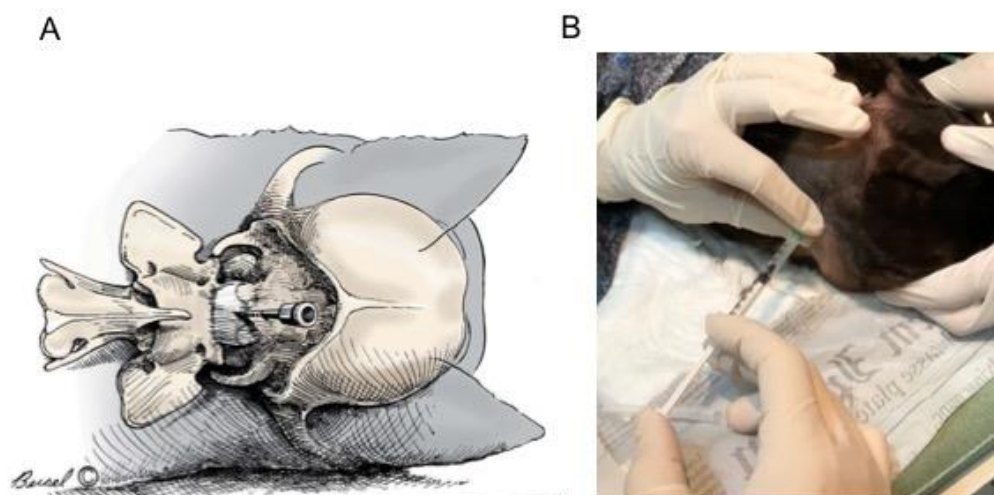


FIGURA 6. Imagem representativa do transplante de Ad-MSCs do grupo cMSC pela via intratecal.

(A) Posicionamento do catéter na cisterna cerebelomedular, com o cão sob anestesia geral (LORENZ, 2011). (B) Após a coleta do LCR, injeção das Ad-MSCs caninas alogênicas pela via IT.

4.2.3 Observações Adicionais

Para ambos grupos PAC e cMSC, nos animais com epilepsia a terapia antiepiléptica foi associada ao tratamento imunossupressor. Para os resultados referentes ao controle das crises epiléticas serem considerados, realizou-se o monitoramento da terapia antiepiléptica com fenobarbital e brometo de potássio (KBr) por meio de dosagem sérica. Para isso, os fármacos deveriam estar dentro do intervalo terapêutico recomendado pelo *International Veterinary Epilepsy Task Force Consensus* (PODELL et al., 2016): fenobarbital, 25-35 µg/mL (duas semanas após o início do tratamento e a cada duas semanas após a mudança de dose); e KBr, 1000-3000 mcg/mL em monoterapia ou 800-

2500 mcg/mL associado ao fenobarbital (40 dias após início do tratamento ou a cada mudança de dose). As crises epiléticas foram consideradas recorrentes quando houve um aumento de 50% ou mais na frequência desde apresentação inicial. As crises epiléticas foram consideradas controladas quando a frequência reduziu em menos 50% da apresentação inicial (PODELL et al., 2016).

Para o grupo PAC, quando o cão já estava fazendo uso de prednisona no momento pré-tratamento, iniciou-se a redução da dose de acordo com o protocolo descrito neste estudo considerando-se o início do uso do medicamento anteriormente ao pré-tratamento.

Para os cães de ambos grupos se administraram fármacos adjuntos para o tratamento de comorbidades. Os fármacos utilizados concomitantemente ao respectivo tratamento estão listados no anexo A.

4.2.3 Acompanhamento: Parâmetros clínicos, Laboratoriais e de Imagem Avançada

4.2.3.1 Exclusão de Doenças Infecciosas

Realizaram-se exames de biologia molecular e sorologia para excluir doenças infecciosas nos cães dos grupos PAC e cMSC. Realizou-se o exame de Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (qPCR) do LCR para os patógenos Vírus da Cinomose, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Cryptococcus sp.* e *Anaplasma platys* e da urina para Vírus da Cinomose. Realizou-se o exame de Imunofluorescência Indireta (RIFI) do soro para *Toxoplasma gondii*. Os animais que apresentaram exames positivos foram excluídos do estudo.

4.2.3.2 Avaliação da Recuperação Funcional

A Escala de Déficit Neurológico (EDN) foi utilizada nos momentos pré-tratamento/transplante e aos 40 e 80 dias pós-tratamento/transplante nos animais dos grupos PAC e cMSC, respectivamente.

Os resultados da avaliação neurológica foram atribuídos a Escala EDN. Esta escala foi desenvolvida para se estimar quantitativamente a recuperação funcional da lesão neurológica, baseando-se na EDSS (KURTZKE, 1983). A EDN consiste na combinação dos seguintes parâmetros e funções: (1) estado mental, (2) equilíbrio, (3)

integridade dos nervos cranianos, (4) funções sensoriais, (5) funções motoras, (6) funções proprioceptivas, e (7) função da vesícula urinária. A graduação varia de 0-5 correspondendo a gravidade do parâmetro avaliado em relação a vida, sendo: ausência de déficit (pontuação 0), presença de déficit que causa comprometimento muito leve (pontuação 1), presença de déficit que causa comprometimento leve (pontuação 2); presença de déficit que causa comprometimento moderado (pontuação 3); presença de déficit que causa comprometimento grave (pontuação 4); e presença de déficit que causa comprometimento muito grave (pontuação 5).

A somatória dos valores atribuídos na escala determina os critérios recuperação funcional, sendo: (i) ótima, sem evidência de deficiência funcional após o tratamento (pontuação final zero); (ii) intermediária, melhora parcial da deficiência funcional seguida de estabilidade ou presença de recidiva precedida de estabilidade/melhora (pontuação pré-tratamento < pontuação pós-tratamento) ou deficiência funcional estável (pontuação pré-tratamento = pontuação pós-tratamento); e (iii) ausente, progressão da deficiência funcional (pontuação pré-tratamento > pontuação pós-tratamento) (Anexo B).

4.2.3.3 Avaliação da Redução das Lesões por Imagem de RM

Realizaram-se os exames de RM nos momentos pré-tratamento e 80 dias pós-tratamento/transplante para os grupos PAC e cMSC. As imagens de RM foram obtidas sob anestesia geral: medicação pré-anestésica com 4 mg/kg de meperidina (União química, São Paulo, Brazil) intramuscular (IM); indução com 0,3 mg/kg de midazolam (Dormonid®, Roche Químicos e Farmacêuticos AS, Rio de Janeiro, Brazil) IM e 5 mg/kg, de propofol (Provive® Claris, São Paulo, Brazil) IV; e manutenção com isoflurano (Isoforine®, São Paulo, Brazil) inalatório.

As imagens de RM foram obtidas nos cortes dorsal, sagital e transversal, em um equipamento aberto de baixo campo (Vet-MR Grande, 0.25 Tesla, Esaote, Itália). Obtiveram-se as sequências em tempo ponderado de T1 (*T1 weighted*, T1) sem e com a administração de contraste IV (gadoversetamida, Optimark®, Mallinckrodt Inc., Raleigh, Carolina do Norte, EUA) na dose de 0,02 mL/kg, tempo ponderado em T2 (*T2 weighted*, T2-W) e sequência de inversão-recuperação atenuante de fluido (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*, FLAIR). Realizaram-se as sequências adicionais inversão-recuperação com tempo curto (*Short TI Inversion-recovery*, STIR) para auxiliar a detectar

sinais intramedulares anormais e gradiente eco (*Gradient echo*, GE) para auxiliar a detecção de hemorragia intracraniana.

As características investigadas consistiram em: (i) número de lesões (focal ou multifocal/difuso); (ii) localização das lesões neurológicas; (iii) padrão de intensidade de sinal em comparação com as substância cinzenta normal (isointensidade/hiperintensidade/hipointensidade); (4) presença de realce de contraste meníngeo; (iv) presença de edema vasogênico perilesional; (v) presença de ventriculomegalia ou hidrocefalia; (vi) presença de efeito de massa; e (vii) presença de herniação (BITTERMANN et al., 2014; CHERUBINI et al., 2006; LAUBNER et al., 2015; LEWIS et al., 2016; LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013; OLIPHANT; BARNES HELLER; WHITE, 2017). Avaliaram-se as imagens com um sistema de imagem digital médica (PACS, Synapse, Fuji Medical System, Tóquio, Japão).

Desenvolveu-se a Escala de Ressonância Magnética para Cães com MUO (ERM) para quantificação da redução das lesões inflamatórias com o tratamento, utilizando-se a sequência de tempo ponderado em T2. Esta escala foi desenvolvida baseando-se nos trabalhos com EM (DAHBOUR et al., 2017; HYUN et al., 2015; LEOCANI; ROCCA; COMI, 2016; SORMANI et al., 2013), devido a necessidade de se associar os achados da RM com a recuperação clínica na MUO (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013).

A ERM foi utilizada aos 80 dias pós-tratamento/transplante para os grupos PAC e cMSC. A redução das lesões foi considerada: (i) ótima (pontuação 0), (ii) intermediária (pontuação 1) e (iii) ausente (pontuação 2) (Quadro 5).

QUADRO 5. Escala de Ressonância Magnética para Cães com MUO (ERM).		
Característica nas imagens de RM	Pontuação	Critério
Redução da lesão inicial em T2-W sem novas lesões	0	Ótima
Redução da lesão inicial e novas lesões ou lesões iniciais maiores em T2-W ou não redução da lesão inicial e ausência de novas lesões	1	Intermediária
Não redução da lesão inicial e novas lesões/lesões iniciais maiores em T2-W	2	Ausente

T2-W, sequência de tempo ponderado em T2.

4.2.3.4 Análise do LCR

Analisou-se o LCR nos momentos pré-tratamento e aos 80 dias pós-tratamento no grupo PAC e grupo cMSC. Realizou-se a coleta do LCR com o cão sob anestesia geral inalatória por meio da punção da cisterna cerebelomedular, subsequente ao exame de RM, e de acordo com a literatura (VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008)

Para o critério de diagnóstico todos parâmetros citológicos e físico-químicos foram considerados (cor, aspecto, coagulação, pH, glicose, pandy, contagem total de células nucleadas, dosagem de proteínas totais e número de eritrócitos) (BOHN et al., 2006; VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008). Para a análise de redução da inflamação no SNC, avaliaram-se a dosagem de proteínas totais e a contagem de células nucleadas. O número de eritrócitos foi considerado devido aos eritrócitos decorrentes de contaminação pela punção interferirem nos resultados da celularidade e concentração de proteínas (VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008). Classificou-se o LCR como não-inflamatório na ausência de pleocitose e/ou hiperproteinorraquia e como inflamatório na presença de pleocitose e/ou hiperproteinorraquia (VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008).

Consideraram-se os seguintes valores de referência:

- Contagem total de células nucleadas (CTCN, células/ μ L): ausência de pleocitose (0-4 células/ μ L); pleocitose leve, 5-20 células/ μ L; pleocitose, moderada, 21-500 células/ μ L; pleocitose acentuada, > 500 células/ μ L; e predomínio celular nas amostras com pleocitose (BOHN et al., 2006; VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008).
- Dosagem de proteínas totais (g/L): Concentração normal, <25 mg/dl; hiperproteinorraquia leve, 25-50 mg/dl; hiperproteinorraquia moderada, 50-200 mg/dl; hiperproteinorraquia acentuada, >200 mg/dl (BOHN et al., 2006; VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008).
- Número de eritrócitos: Em casos de contaminação (> 500 eritrócitos), a celularidade e a concentração de proteínas foram estimadas (E), em que um leucócito ou 1 mg/dL de proteínas foi subtraído da contagem total de 500 eritrócitos (BAILEY; HIGGINS, 1985; VERNAU; VERNAU; SUE BAILEY, 2008).

4.2.3.5 Avaliação da Resposta ao Tratamento

Para avaliação da resposta ao tratamento, desenvolveu-se a Escala de Resposta ao Tratamento para cães com MUO (MERT), que considera conjuntamente os critérios clínicos da Escala EDN, Escala ERM e da análise do LCR. Aplicou-se a escala aos 80 dias pós-tratamento/transplante para os grupos PAC e cMSC, respectivamente. Esta escala foi desenvolvida baseada na “Escala Rio” (SORMANI et al., 2013) para pacientes com EM, incrementando-se a análise do LCR na MERT, devido a relevância da associação desta análise para os cães com MUO (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013).

Na MERT, a soma dos valores atribuídos às variáveis EDN, ERM e LCR indica a resposta ao respectivo tratamento: (i) remissão ótima (pontuação 0-1), (ii) remissão parcial (pontuação 2-3) e (iii) remissão ausente (pontuação 4-5, óbito 6) (Quadro 6).

QUADRO 6. Escala de Resposta ao Tratamento para Cães com MUO (MERT).			
Critério			Remissão
EDN	ERM	LCR	Somatória
Ótima, 0 Intermediária, 1 Ausente, 2	Ótima, 0 Intermediária, 1 Ausente, 2	Não-inflamatório, 0 Inflamatório, 1	Total, 0-1 Parcial, 2-3 Ausente, 4-5 6 (óbito)

EDN, Escala de déficit neurológico. ERM, ressonância magnética. LCR, líquido cefalorraquidiano.

4.2.3.6 Efeitos Adversos e Alterações Hematológicas e Bioquímicas

Registrou-se o desenvolvimento de efeitos adversos durante todo o tratamento para os respectivos grupos PAC e cMSC.

Realizaram-se os exames de hemograma e bioquímica nos momentos pré-tratamento/transplante e aos 40 e 80 dias pós-tratamento/transplante para os grupos PAC e cMSC. Para a obtenção dos exames de hemograma, coletaram-se amostras de sangue total da veia jugular com auxílio de seringa de 3 mL e agulha calibre 30x7 (BD Insyte™, Becton Dickinson Company, San Jose, USA), acondicionadas em tubo com EDTA até o

processamento. As variáveis analisadas corresponderam ao número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, número de plaquetas, e número de leucócitos (JAIN, 1993). Para as análises bioquímicas, o sangue venoso foi acondicionado em tubo com gel até o processamento. As variáveis analisadas corresponderam a mensuração da concentração plasmática de uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, albumina e globulinas (KANEKO; HARVEY; BRUSS 1997).

4.3 Análise Estatística

As variáveis expressão gênica e perfil de secreção de fatores solúveis das Ad-MSCs e PMSCs foi avaliada com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (histogramas e gráficos quantil-quantil). O teste não paramétrico de Friedman seguido por teste de Dunn foi utilizado para comparar a mediana de cada grupo dentro da mesma fonte e o teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar as medianas das fontes dentro de cada grupo. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ (SAS/STAT® Software).

As variáveis do ensaio *in vivo* (EDN, LCR, hemograma e bioquímica) foram avaliadas quanto a normalidade por análises gráficas e testes de normalidade (gráfico quantil-quantil e histograma). Para as variáveis de hemograma, bioquímico, LCR e EDN foi utilizada a Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA) para confrontar as médias dentro de cada momento e grupo (PAC e cMSC). Diferentes estruturas de covariância foram testadas. Para o Escore ERM foi utilizado o teste de Wilcoxon não pareado para confrontar a mediana entre as observações do grupo PAC e cMSC. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ (SAS/STAT® Software).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudo *in vitro*

5.1.1 Isolamento das Ad-MSCs e PMSCs caninas

As linhagens de Ad-MSCs (n = 4) apresentaram 5-10% de confluência após três dias de cultura, sendo homogênea entre as linhagens. Aos sete dias de cultura, apresentaram 60-70% de confluência e aos 10 dias de cultura atingiram 80-90% de confluência. Todas as linhagens apresentaram adesão à superfície do frasco de cultura e morfologia fibroblastóide (Figura 7 A, B, C). Após repique, as Ad-MSCs em passagem P1-P3 atingiram 80% de confluência em 3-4 dias de cultura.

As linhagens de PMSCs (n = 3) apresentaram 5-10% de confluência aos nove dias de cultura, sendo levemente heterogênea entre as linhagens. Aos 13 dias de cultura apresentaram 60-70% de confluência e aos 21-23 dias de cultura apresentaram 80-90% de confluência. Todas as linhagens apresentaram adesão à superfície do frasco de cultura e morfologia fibroblastóide (Figura 7 D, E, F). Após repique, as PMSCs em passagem P1-P3 atingiram 80% de confluência em 2-3 dias de cultura.

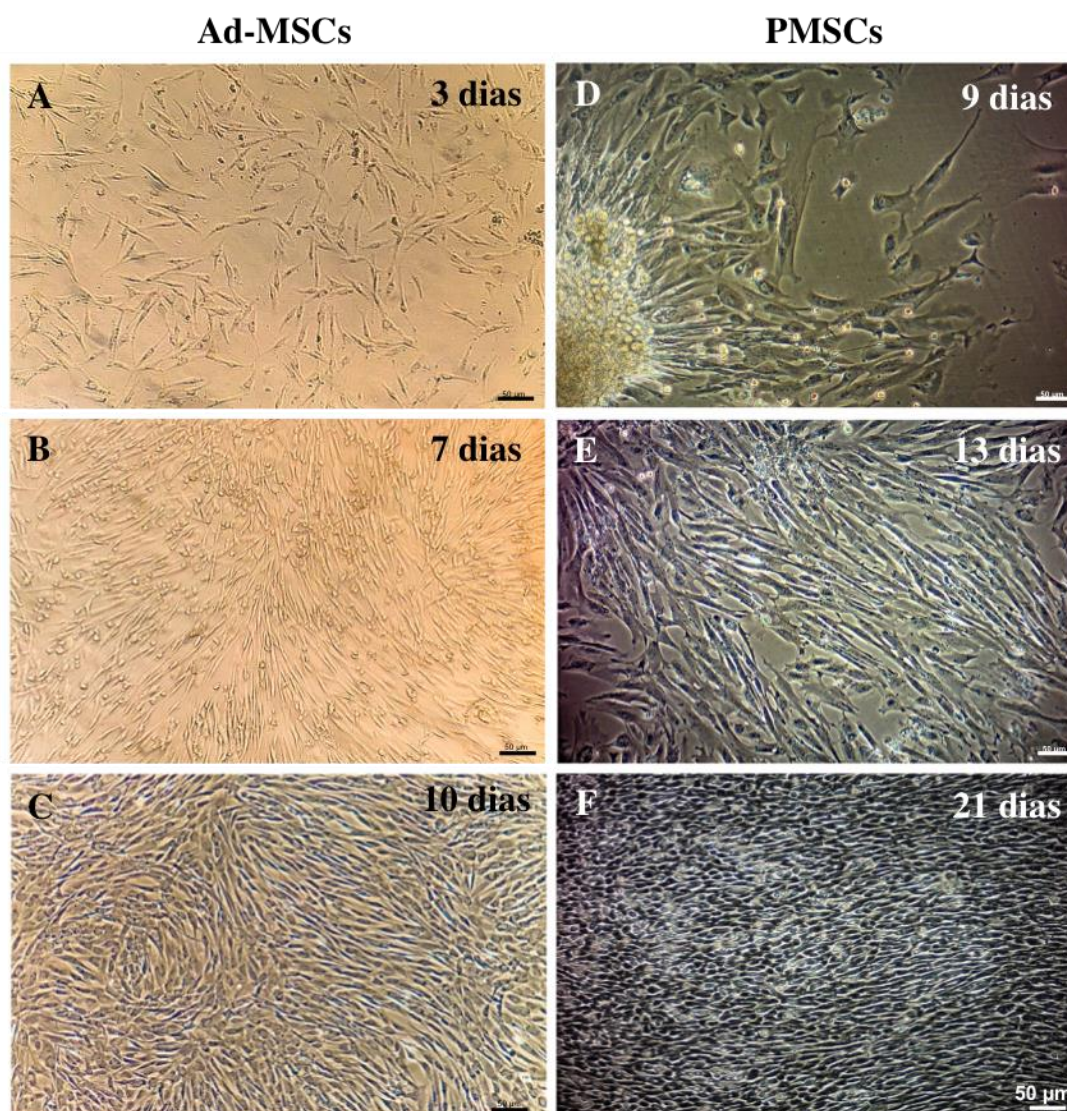


FIGURA 7. Aparência microscópica das Ad-MSCs e PMSCs caninas após isolamento.

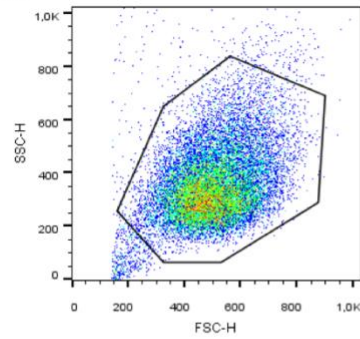
(A-C) Proliferação e morfologia das Ad-MSCs em passagem zero. As Ad-MSCs apresentaram morfologia fibroblásticoide, aderência ao plástico e proliferação aos três dias de cultura após o isolamento, atingindo 80-90% de confluência aos 10 dias de cultura. (D-F) Proliferação e morfologia das PMSCs em passagem zero (explante). As PMSCs evidenciaram multiplicação celular aos nove dias de cultura após o isolamento, com aderência ao plástico e morfologia fibroblásticoide. A proliferação celular incrementou aos 13 dias de cultura e atingiu 80-90% de confluência em 21 dias. Aumento: 10x. Barra de escala: 50 µm.

5.1.2 Diferenciação em Linhagens Mesodermais e Análise Imunofenotípica das Ad-MSCs e PMSCs caninas

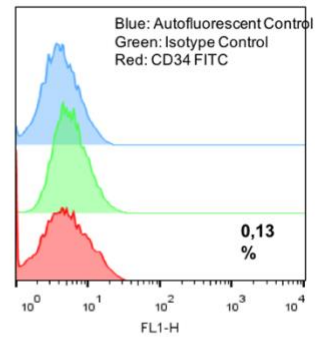
As Ad-MSCs (Figura 8) e PMSCs (Figura 9) apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*. A indução osteogênica revelou a formação de matriz extracelular de cálcio e formação de trabéculas pela coloração *Alizarin red S*. A indução adipogênica demonstrou a presença de depósitos lipídicos intracitoplasmáticos ou gotículas de lipídeos pela coloração *Oil Red O*. Nos poços controle (células não-diferenciadas), não se evidenciou coloração ou formação de depósitos. A indução condrogênica revelou a formação de micromassa e presença de glicosaminoglicanos de matriz extracelular pelas colorações Azul de Toluidina e Hematoxilina Eosina.

A análise imunofenotípica das Ad-MSCs (Figura 8) e PMSCs (Figura 9) demonstrou que as linhagens expressaram os antígenos de superfície CD 90 e CD 44 associados às células de origem mesenquimal e não expressaram os antígenos hematopoiéticos CD34, CD45 e CD 11b, de adesão celular CD106, e o antígeno HLA-DR.

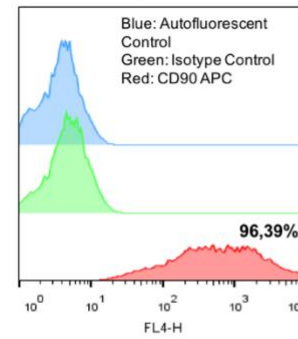
A



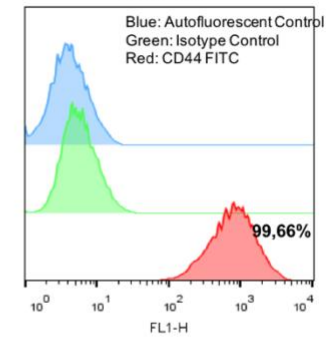
CD 34



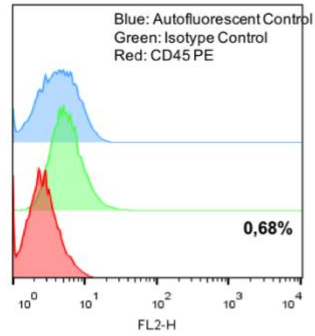
CD 90



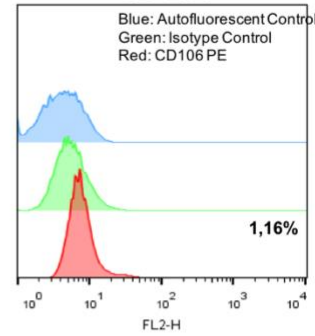
CD 44



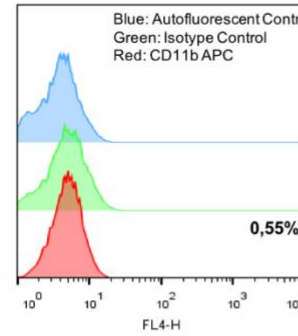
CD 45



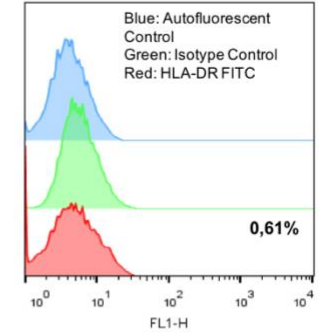
CD 106



CD 11b

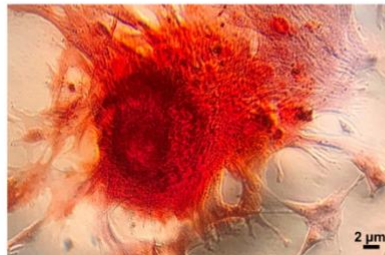


HLA-DR

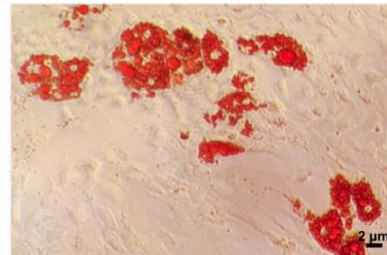


B

OSTEOGÊNICA



ADIPOGÊNICA



CONDROGÊNICA

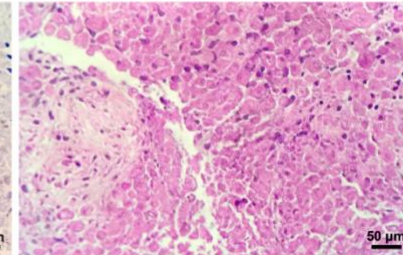
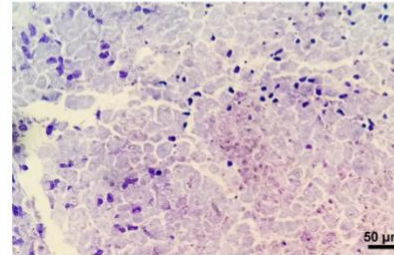
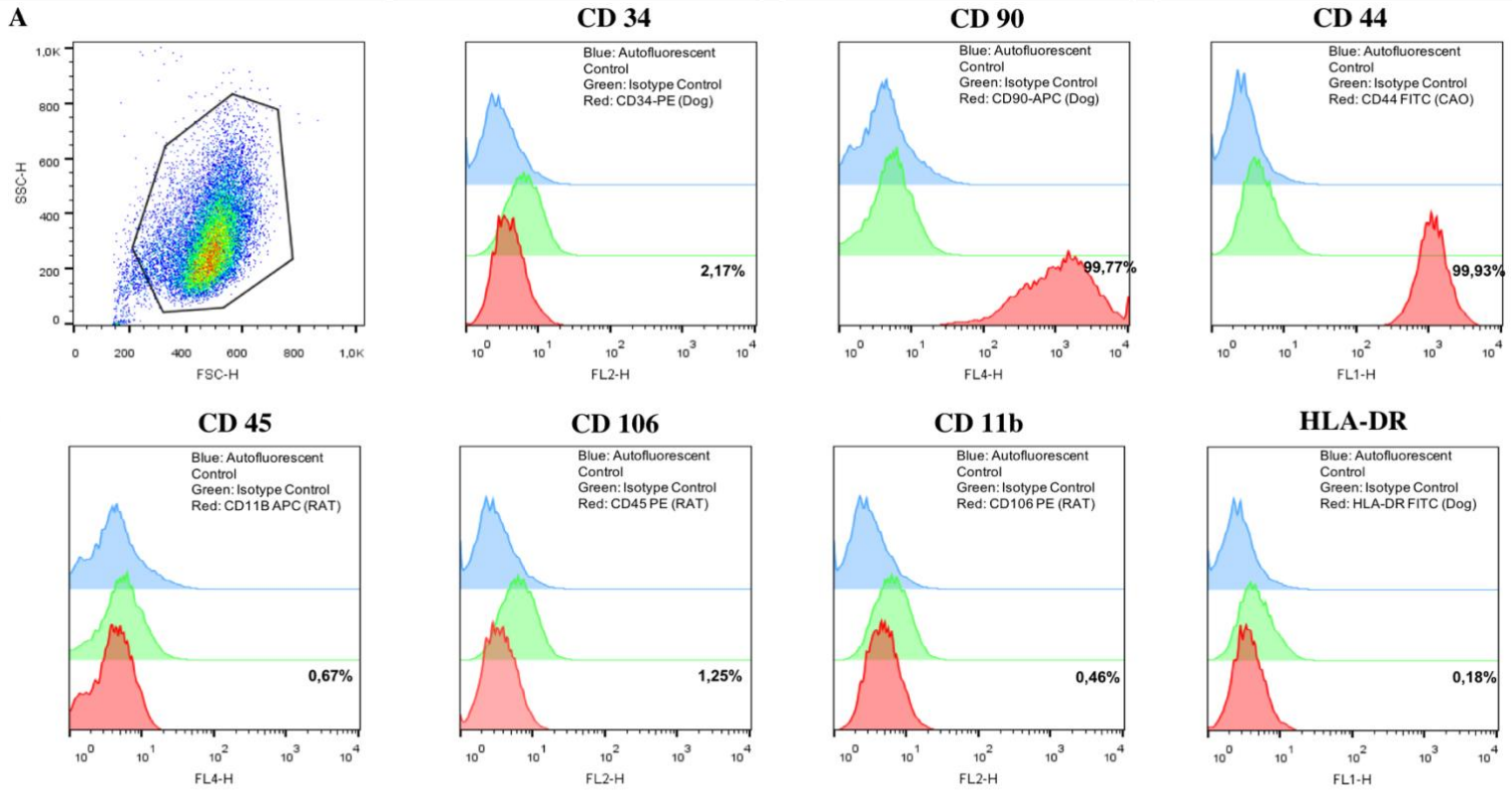


FIGURA 8. Caracterização imunofenotípica (A) e capacidade de diferenciação (B) das Ad-MSCs caninas.

(A) Observa-se o *gate* das Ad-MSCs analisadas (tamanho das células *versus* granularidade) e os histogramas (azul - autocontrole; verde - controle isotípico; vermelho - porcentagem de expressão do marcador): CD 34: 0,13%; CD 90: 96,39 %; CD 44: 99,66; CD 45: 0,68%; CD 106: CD 11b: 0,55%; HLA-DR/MHC-II: 0,61%. (B) Nota-se diferenciação osteogênica pela produção de matriz calcificada (coloração *Alizarin Red S*), adipogênica pela formação lipídica (coloração *Oil Red O*) e condrogênica pela deposição de matriz de extracelular de proteoglicanas (coloração Azul de Toluidina) com presença de células de maior tamanho, arredondadas e binucleadas semelhantes a condrócitos (coloração HE). Aumento: 20x. Barra da escala osteogênica e adipogênica: 2 µm. Barra da escala condrogênica: 50 µm.

A



B

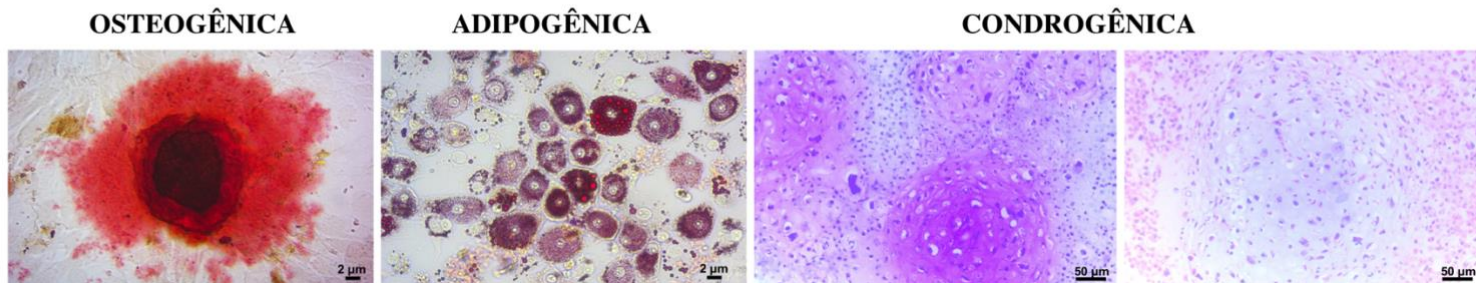


FIGURA 9. Caracterização imunofenotípica (A) e capacidade de diferenciação (B) das PMSCs caninas.

(A) Observa-se o *gate* das Ad-MSCs analisadas (tamanho das células *versus* granularidade) e os histogramas (azul - autocontrole; verde - controle isotípico; vermelho- percentagem de expressão do marcador): CD 34: 2,09%; CD 90: 96,01%; CD 44: 77,79; CD 45: 0,62%; CD 106: 1,17 CD 11b: 0,43%; HLA-DR/MHC-II: 0,17%. (B) Nota-se diferenciação em osteogênica pela produção de matriz calcificada (coloração *Alizarin Red S*), adipogênica pela formação lipídica (coloração *Oil Red O*) e condrogênica pela deposição de matriz de extracelular de proteoglicanas (coloração Azul de Toluidina) e presença de células de maior tamanho, arredondadas e binucleadas semelhantes a condrócitos (coloração HE). Aumento: 20x. Barra de escala osteogênica e adipogênica: 2 μ m. Barra da escala condrogênica: 50 μ m.

5.1.3 Estimulação Direta das Ad-MSCs e PMSCs com IFN- γ e IFN- γ combinado com TNF- α

5.1.3.1 Comportamento das Ad-MSCs e PMSCs após estimulação direta

Após 96 horas de cultura em placas de 24 poços, notou-se 80-90% de confluência nas Ad-MSCs e PMSCs controle. As Ad-MSCs demonstraram a formação de agregados celulares após a estimulação com IFN- γ , sendo mais marcada após a estimulação com IFN- γ combinado com TNF- α (Figura 10 A, B, C). As PMSCs não apresentaram alterações após a estimulação com IFN- γ e IFN- γ +TNF- α (Figura 10 D, E, F).

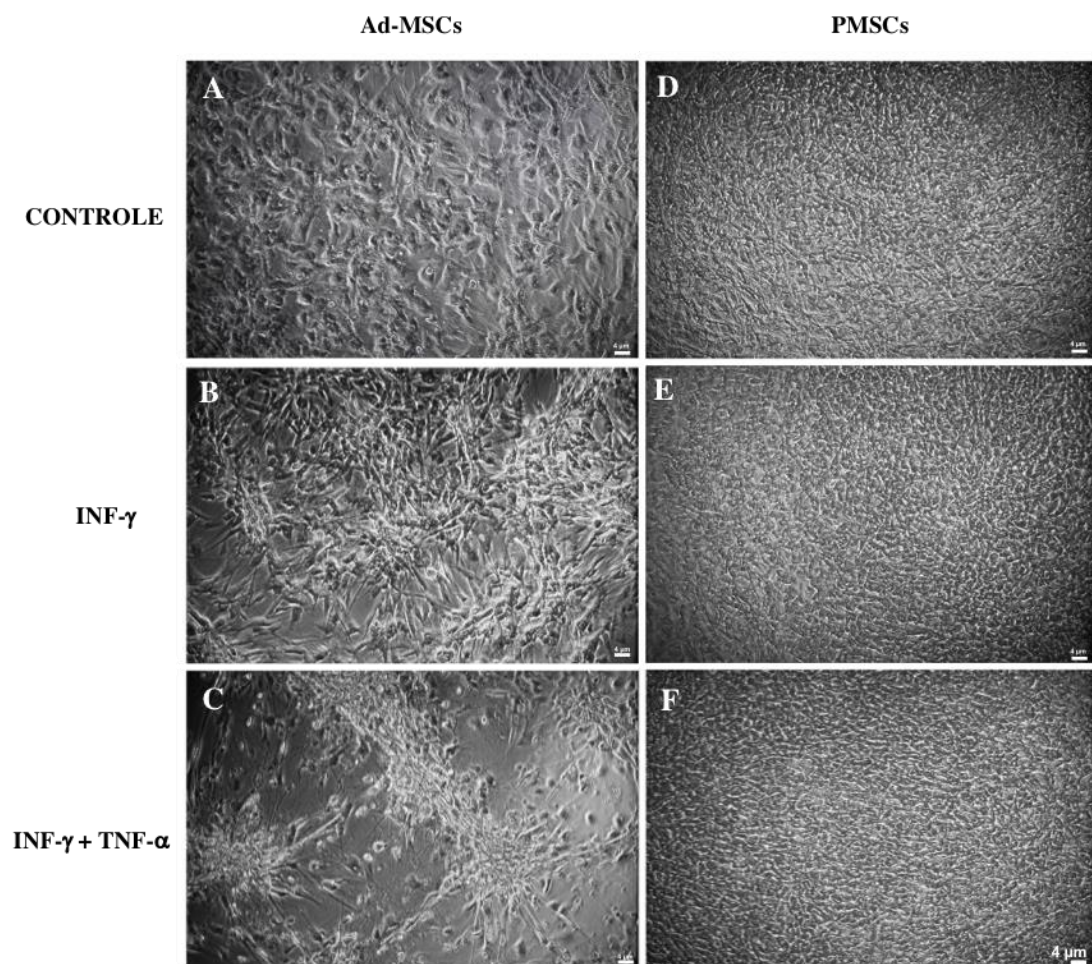


FIGURA 10. Ad-MSCs (A-C) e PMSCs (D-F) caninas após a estimulação in vitro com INF- γ (B, E) e INF- γ combinado com TNF- α (C, F) e controles (A, D).

(A, D). Observa-se proliferação celular com 70-80% de confluência. (B, C) Após a estimulação com IFN- γ e IFN- γ +TNF- α as Ad-MSCs ativadas formaram agregados celulares. (E, F) Após a estimulação com IFN- γ e IFN- γ +TNF- α as PMSCs não sofreram alterações. Aumento: 20x. Barra de escala: 4 μ m.

5.1.3.2 Expressão Gênica de Citocinas e Fatores Neurotróficos pelas Ad-MSCs e PMSCs após estimulação direta

O RNA total apresentou razão de absorbância de 260/280 e 260/230, dentro dos valores esperados. A concentração de RNA total das Ad-MSCs e PMSCs apresentou-se levemente heterogênea entre as amostras da mesma fonte de MSCs (Ad-MSCs, 56-135 ng/μL; PMSCs, 56-160 ng/μL).

Os genes de referência testados revelaram-se adequados para o estudo, apresentando pouca variação entre as amostras analisadas: (i) Ad-MSCs- GAPDH, $16,64 \pm 0,73$ Ct; HPRT $20,679 \pm 0,56$ Ct; RPS5, $18,60 \pm 0,79$ Ct; RPS19, $18,20 \pm 0,61$ Ct; (ii) PMSCs- GAPDH, $16,49 \pm 0,28$ Ct; HPRT, $21,76 \pm 0,24$ Ct; RPS5, Ct $18,34, \pm 0,46$ Ct. RPS19, $16,64 \pm 0,30$ Ct.

Para as Ad-MSCS caninas, houve aumento significativo na expressão gênica de BDNF, GDNF, HGF e IDO estimulados com INF- γ e INF- γ +TNF- α em comparação ao controle e houve aumento significativo da expressão nas células estimuladas com INF- γ +TNF- α em comparação ao INF- γ (BDNF - controle, 0,94 (0,85-1,35); INF- γ , 4,9 (3,27-5,6); INF- γ +TNF- α , 13,56 (4,18-17), $p = 0,0046$; GDNF - controle, 0,99 (0,86-1,29); INF- γ , 7,72 (6,92-8,14); INF- γ +TNF- α , 23,91 (17,86-25,93), $p = 0,0046$; HGF - controle, 1,34 (0,14-4,12); INF- γ , 2,31 (0,56-3,76); INF- γ +TNF- α , 4,39 (1,91-7,97), $p = 0,041$; IDO - controle, 1,1 (0,67-1,58); INF- γ , 56,68 (41,57-185,25); INF- γ +TNF- α , 186,43 (158,34-308,73), $p = 0,0417$) (Figura 11).

Para as Ad-MSCS caninas, não houve diferenças significativas na expressão de IL-10 e PTGES2 na comparação entre os grupos INF- γ , INF- γ +TNF- α e controle (IL-10 - controle, 1,04 (0,6-3,34); INF- γ , 2,75 (2,26-4,66); INF- γ +TNF- α , 3,84 (1,88-7,69), $p = 0,064$; PTGES2 - controle, 1,02 (0,67-1,46), INF- γ , 1,01 (0,83-1,33), INF- γ +TNF- α , 0,86 (0,71-0,99), $P = 0,2791$) (Figura 11).

Para as PMSCS caninas, não houve diferenças estatísticas na expressão de BDNF, GDNF, HGF, IL-10 e PTGES2 na comparação entre os grupos INF- γ , INF- γ +TNF- α e controle (BDNF - controle, 1,01 (1-1,02); INF- γ , 0,7 (0,32-1,27); INF- γ +TNF- α , 0,02 (0,01-8,86), $p = 0,944$; GDNF - controle, 1 (1-1,02); INF- γ , 1,36 (0,92-1,75); INF- γ +TNF- α , 0,6 (0,1-4,51), $p = 0,944$; HGF - controle, 1 (1-1,01); INF- γ , 1,09 (0,93-1,43); INF- γ +TNF- α , 0,57 (1,11-2,23), $p = 0,944$; IL-10 - 1,05 (1,05-1,06); INF- γ , 1 (1,31);

IFN- γ +TNF- α , 0 (0,1-0,01-6,13), $p = 0,944$; PTGES2 - controle, 1,01 (1-1,09); IFN- γ , 0,83 (0,67-0,84); IFN- γ +TNF- α , 1,13 (0,54-1,8), $p = 0,527$) (Figura 11).

Para as PMSCs caninas, não houve diferenças significativas na expressão gênica de IDO estimulada com INF- γ em comparação ao controle ($p > 0,05$), porém, houve aumento significativo da expressão após estimulação com IFN- γ +TNF- α (IDO - controle, 1,02 (1,02-1,13); IFN- γ , 7443,27 (1838,29-15011,06); IFN- γ +TNF- α , 63173 (8098-118248), $p = 0,884$) (Figura 11).

Na comparação entre as fontes, não houve diferenças estatísticas na expressão de BDNF, GDNF, HGF, PTGES2 e IDO na comparação entre os grupos INF- γ , IFN- γ +TNF- α e controle ($p > 0,05$). Entretanto, a expressão de IL-10 nas Ad-MSCs estimuladas com INF- γ foi significativamente maior do que nas PMSCs ($p < 0,028$) (Figura 11).

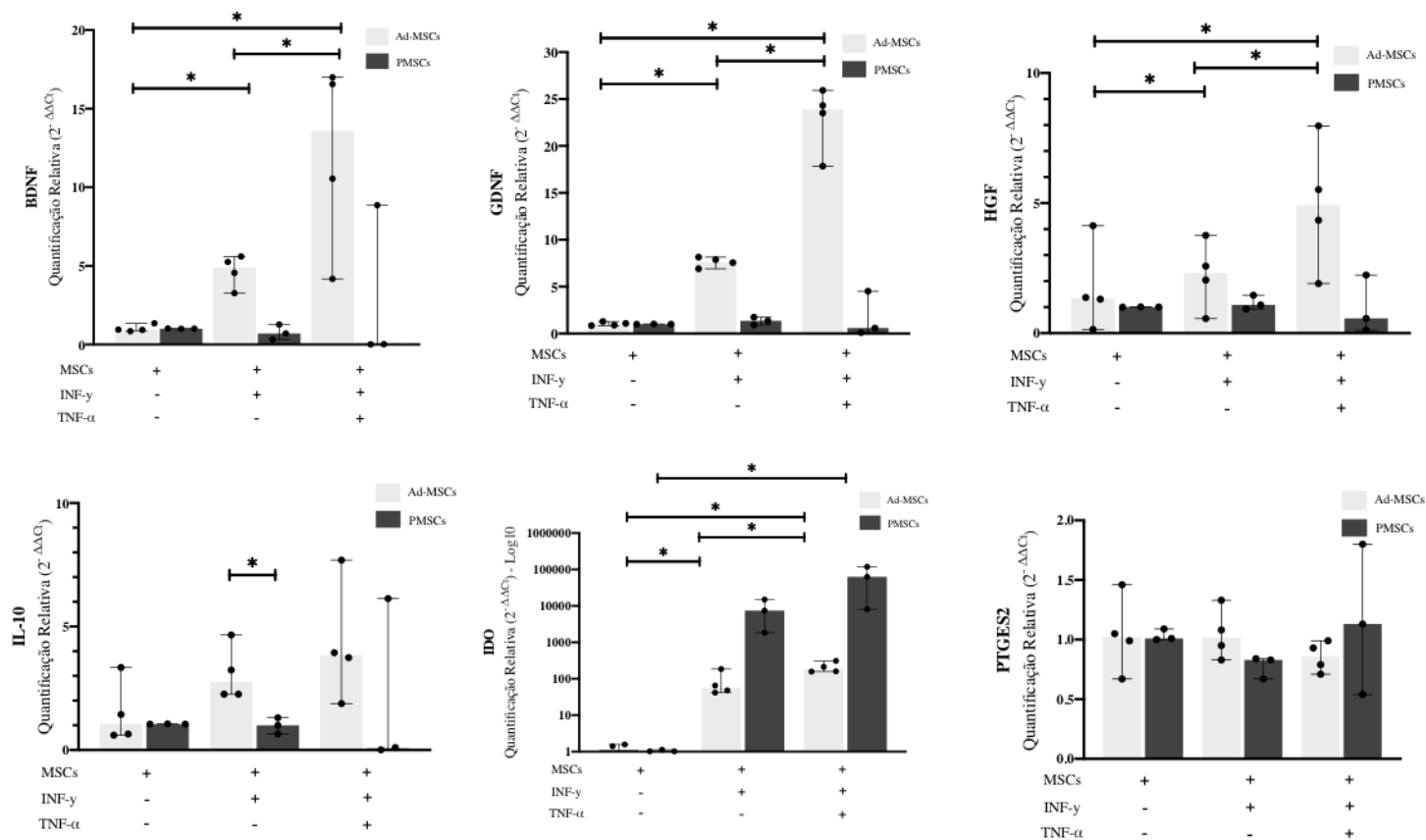


FIGURA 11. Expressão gênica relativa de BDNF, GDNF, HGF, IL-10, IDO, e PTGES2 após a estimulação das Ad-MSCs e PMSCs caninas com INF- γ e INF- γ combinado com TNF- α .

Os valores de BDNF, GDNF, HGF, IL-10, IDO, e PTGES2 foram representados em mediana, mínimo e máximo ($p < 0,05^*$).

5.1.4 Perfil de secreção de fatores solúveis do meio condicionado das Ad-MSCs e PMSCs após estimulação in vitro com IFN- γ ou IFN- γ combinado com TNF- α

Para as Ad-MSCs caninas, houve aumento significativo na secreção da citocina IL-6 nas células estimuladas com INF- γ e IFN- γ +TNF- α em comparação ao controle e a secreção foi superior em IFN- γ +TNF- α em comparação a INF- γ (IL-6 - controle, 12,68 (12,47-12,89); IFN- γ , 18,9 (14,53-139,88); IFN- γ +TNF- α , 717,39 (308,71-1597), $p = 0,027$) (Figura 12).

Para as Ad-MSCs caninas, não houve diferenças estatísticas na secreção de GM-CSF, IL-2, IL-8, IL-10 e MCP-1 na comparação entre os grupos INF- γ , IFN- γ +TNF- α e controle ($p > 0,05$) (GM-CSF - controle, 12,55 (12,47-12,55); IFN- γ , 12,62 (12,61-12,65); IFN- γ +TNF- α 14,77 (13,19-16,75), $p = 0,053$; IL-2 - controle, 12,56 (12,53-12,56); IFN- γ , 12,63 (12,61-12,64); IFN- γ +TNF- α , 12,61 (12,61-12,61), $p = 0,055$; IL-8 - controle, 1779 (1218-2960); IFN- γ , 5985 (4325-7433); IFN- γ +TNF- α , 5371 (5143-7118), $p = 0,194$; IL-10 - controle, 13,11 (12,91-13,26); IFN- γ , 13,36 (13,11-13,47); IFN- γ +TNF- α , 13,14 (13,06-13,39), $p = 0,944$; MCP-1 - controle, 2628 (2516-2628); IFN- γ , 4820 (339,68-6250); IFN- γ +TNF- α , 0 (0-0), $p = 0,194$) (Figura 12).

Para as PMSCs caninas, houve aumento significativo na secreção de IL-8 no grupo IFN- γ +TNF- α em comparação ao controle (IL-8 - controle, 183,64 (73,51-193,58); IFN- γ , 57,04 (14,69-117,88); IFN- γ +TNF- α , 8839 (5033-20196), $p = 0,0278$) (Figura 12).

Para as PMSCs caninas, não houve diferenças estatísticas na secreção de GM-CSF, IL-2, IL-10, MCP-1 e IL-6 na comparação entre os grupos INF- γ , IFN- γ + TNF- α e controle ($p > 0,05$) (GM-CSF - controle, 12,55 (12,53-12,68); IFN- γ , 12,55 (11,81-12,59), IFN- γ +TNF- α 12,69 (12,68-12,74), $p = 0,222$; IL-2 - controle, 12,56 (12,49-12,59); IFN- γ , 12,56 (12,04-12,59); IFN- γ +TNF- α , 12,76 (12,66-12,77), $p = 0,111$; IL-10 - 13,64 (13,22-13,84); IFN- γ , 13,22 (11,5-13,51); IFN- γ +TNF- α , 13,74 (13,64-14,39), $p > 0,05$; MCP-1 - controle, 3058 (2628-11043); IFN- γ , 20,82 (0-1267); IFN- γ +TNF- α , 0 (0-0), $p = 0,0556$; IL-6 - Controle, 12,45 (12,37-13,74); IFN- γ , 14,46 (10,4-15,03); IFN- γ +TNF- α , 1496 (1402-1779), $P = 0,1944$).

Na comparação entre as fontes, não houve diferenças estatísticas na secreção de GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e MCP-1 na comparação entre os grupos INF- γ , IFN- γ +TNF- α e controle (Figura 12).

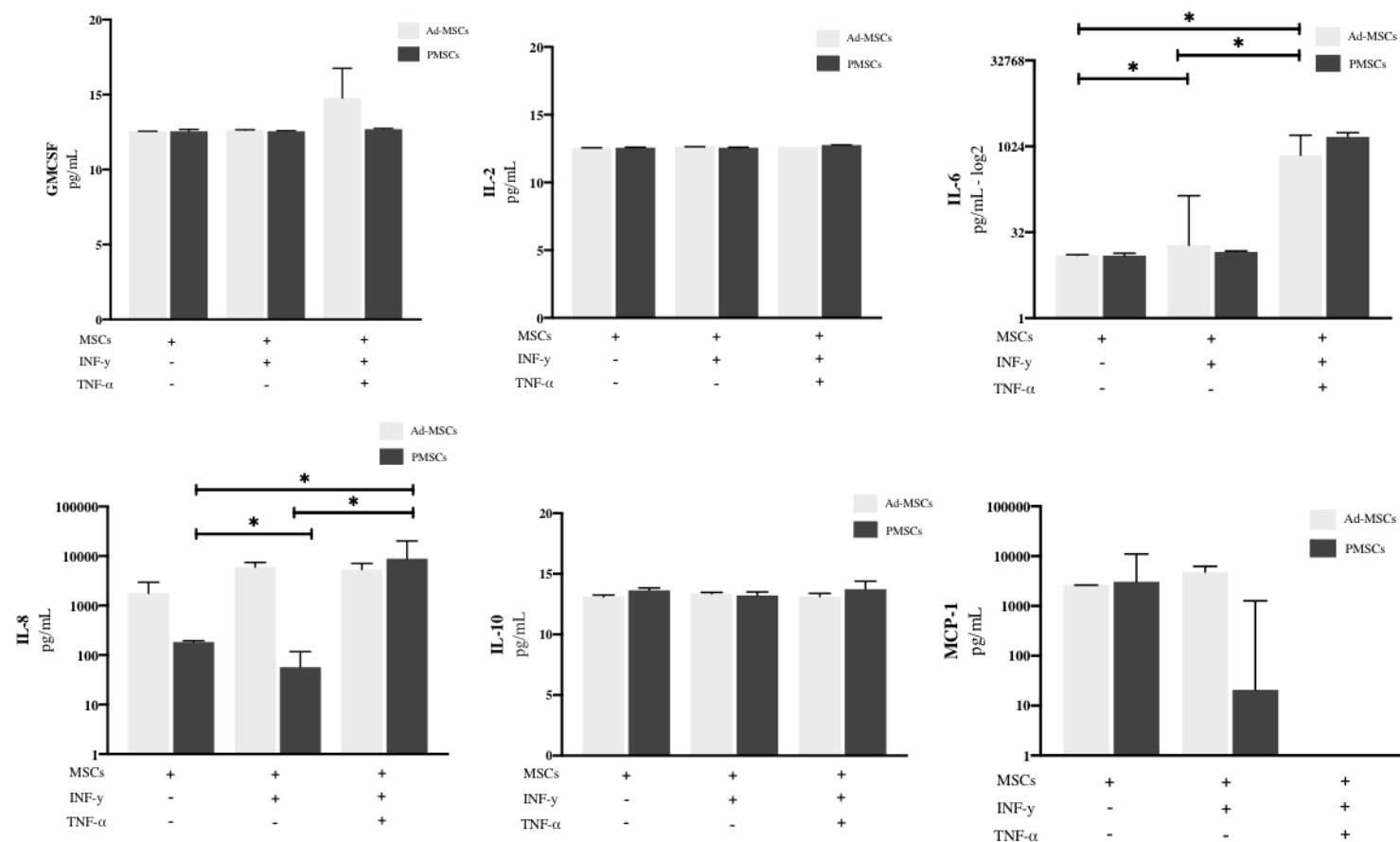


FIGURA 12. Perfil de secreção de GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e MCP-1 após a estimulação das Ad-MSCs e PMSCs caninas com INF-γ e INF-γ combinado com TNF-α.

Os dados de GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e MCP-1 foram representados em mediana, mínimo e máximo ($p < 0,05^*$).

5.2 Estudo *in vivo*

5.2.1 Características Gerais dos Grupos Estudados

Doze cães que apresentaram os critérios de inclusão deste estudo foram inseridos no grupo PAC. A frequência de raça no grupo correspondeu a 33,33% (4/12) da raça Yorkshire Terrier, 25% (3/12) da raça Shih Tzu, 8,33% (1/12) sem raça definida (SRD) e 8,33% (1/12) de cada uma das seguintes raças: Maltês, Pug, Buldogue Francês, Chihuahua, sendo 91,67% (11/12) de porte pequeno (< 10kg) e 8,33% (1/12) de porte médio (10-20 Kg). A distribuição de idade variou de um ano e sete meses a sete anos, e a idade média foi de três anos e dez meses. Com respeito ao sexo, 66,67% (8/12) eram machos e 33,33% (4/12) fêmeas. O tempo transcorrido desde os inícios dos sinais clínicos até a obtenção do diagnóstico (pré-tratamento) variou de sete a 330 dias. O início dos sinais clínicos foi agudo (< sete dias) e a evolução progressiva em 100% (12/12) dos cães. A duração dos sinais clínicos até o diagnóstico (pré-tratamento) foi aguda em 8,22% (1/12) e crônica em 91,67% (11/12) dos cães (Anexo C).

Cinco cães do grupo PAC que apresentaram os critérios de inclusão foram inseridos no grupo cMSC (cães 4, 5, 7, 8, 10). A frequência de raça no grupo correspondeu a 40% (2/5) da raça Yorkshire Terrier, 40% (2/12) da raça Shih Tzu e 20% (1/12) da raça Buldogue Francês, dos quais 80% (4/5) foram de porte pequeno (< 10kg) e 20% (1/5) de porte médio (10-20 Kg). A distribuição de idade variou de um ano e sete meses a sete anos, e a idade média foi de quatro anos, sendo 60% (3/5) de machos e 40% (2/5) fêmeas. Todos os cães tiveram apresentação crônica (duração dos sinais clínicos até o transplante) (100%, 5/5) (Anexo C).

5.2.2 Localização Neuroanatômica e Sinais Clínicos

Para o grupo PAC, no momento pré-tratamento, os sinais clínicos foram multifocais em 50% (6/12) e focais em 50% (6/12) dos cães. A localização neuroanatômica da lesão correspondeu a sinais clínicos do encéfalo em 83,3% (10/12) dos cães e sinais clínicos da medula espinhal em 25% (3/12). Para os cães com lesões encefálicas, 80% (8/10) apresentaram sinais clínicos correspondentes a lesões tálamo-corticais, 50% (5/10) do tronco encefálico e 20% (2/10) do cerebelo. Para os cães com

lesões medulares, 66,7% (2/3) apresentaram sinais clínicos correspondentes a lesões nos segmentos medulares C1 a C5 e 33,3% (1/3) aos segmentos medulares T3 a L3 e C6 a T2.

Os sinais clínicos foram ataxia e paresia em 66,7% (8/12), alterações comportamentais em 41,7% (5/12), alterações em pares de nervos cranianos em 41,7% (5/12), reflexos espinhais alterados em 33,3% (4/12), hiperestesia a palpação epaxial não dolorosa da coluna em 33,3% (3/12), reflexos espinhais alterados em 33,3% (3/12), crises epiléticas em 33,3% (3/12), desvio de cabeça em 33,3% (3/12), hipalgesia a estimulação dolorosa superficial em 16,7% (2/12), ampla base, tremor de intenção e dismetria em 16,7% (2/12), e movimentos involuntários, pleurotótono e cegueira central em 8,3% (1/12) dos cães.

Para o grupo cMSC, a localização foi multifocal em 20% (1/5) dos cães e focal em 80% (4/5) dos cães no momento pré-transplante. A localização neuroanatômica da lesão correspondeu a sinais clínicos do encéfalo em 80% (4/5) dos cães e sinais clínicos da medula espinhal em 20% (1/5). Para os cães com sinais clínicos encefálicos, 100% apresentou sinais clínicos correspondentes a lesões tálamo-corticais, 20% (1/4) do tronco encefálico e 20% (1/4) do cerebelo. Cem por cento dos cães com sinais clínicos medulares apresentou sinais de lesão nos segmentos medulares C1 a C5 (Anexo C).

Os sinais clínicos foram ataxia e paresia em 80% (4/5), alterações comportamentais em 60% (3/5), alterações em pares de nervos cranianos em 20% (1/5), reflexos espinhais alterados em 20% (1/5), hiperestesia a palpação epaxial não dolorosa da coluna e reflexos espinhais alterados em 20% (1/5), crises epiléticas em 20% (1/5), desvio de cabeça em 40% (2/5), e ampla base, tremor de intenção e dismetria em 40% (2/5) dos cães (Anexo C).

5.2.3 Avaliação da Recuperação Funcional

Utilizou-se a Escala EDN nos momentos pré-tratamento e aos 40 e 80 dias pós-tratamento para ambos grupos.

No grupo PAC (cães 1-12), houve recuperação funcional intermediária em 50% (6/12), ausente em 33,3% (4/12) e ótima em 16,7% (2/12) dos cães (Quadro 7). 83% (10/12) dos cães sobreviveram até o momento 80 dias pós-tratamento (cães 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 e 12). O cão 6 veio a óbito em decorrência da progressão da doença e o cão 9 foi eutanasiado por decisão do tutor.

No grupo cMSC (cães 5, 7, 8 e 10), houve ótima recuperação funcional em 25% (1/4), intermediária em 50% (2/4), e ausente em 25% (1/4) dos cães (Quadro 7). Dada a desistência do cão 4 após o segundo transplante, os parâmetros de avaliação de resposta ao tratamento aos 80 dias pós-transplante não foram realizados. Setenta e cinco por cento (3/4) dos cães sobreviveram até o momento 80 dias pós-tratamento (cães 5, 8, 10). O cão 7 veio a óbito em decorrência da progressão da doença em 10 dias após o transplante.

Na comparação da Escala EDN entre os momentos pré-tratamento, 40 e 80 dias pós-tratamento não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0.05$) para o grupo PAC e grupo cMSC, quando analisados individualmente (Figura 15). Na comparação entre os grupos PAC e cMSC não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0.05$) (Figura 13). Contudo, em ambos grupos se observou tendência a diminuição da pontuação da Escala EDN aos 40 e, principalmente, 80 dias pós-tratamento, indicando efeitos positivos em ambos tratamentos com a melhora da recuperação funcional do grupo (Figura 13).

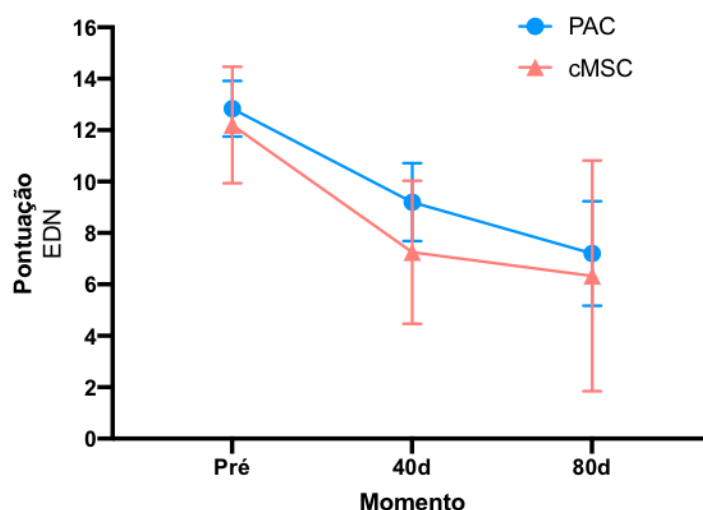


FIGURA 13. Avaliação da recuperação funcional cães dos grupos PAC e cMSC pela Escala EDN.

O gráfico de linhas indicou tendência a diminuição da EDN no decorrer do tempo nos cães com MUO dos grupos PAC e cMSC. Os valores obtidos foram representados como mediana, mínimo e máximo ($p > 0.05$).

A Figura 14 apresenta imagens representativas da apresentação clínica dos cães 4, 7 e 12 do grupo PAC. A Figura 15 apresenta imagens representativas da apresentação clínica dos cães 5, 8 e 10 do grupo cMSC.

QUADRO 7. Resultados da Escala EDN dos grupos PAC e cMSC.								
Cão	Grupo PAC				Grupo cMSC			
	Pré	Pontuação 40 dias	80 dias	Recuperação	Pré	Pontuação 40 dias	80 dias	Recuperação
1	6	3	0	Ótima				
2	10	6	0	Ótima				
3	15	8	3	Parcial				
4	16	6	5	Parcial	5	2	Não realizado (retirado do estudo)	n/a
5	13	13	16	Ausente	16	15	15	Parcial
6	20	óbito		Ausente				
7	17	18	18	Ausente	18	óbito		Ausente
8	11	11	11	Parcial	11	11	5	0
9	13	óbito		Ausente				
10	11	11	11	Parcial	11	7	4	Parcial
11	12	7	5	Parcial				
12	10	6	3	Parcial				

(EDN=0) Recuperação funcional ótima, sem evidência clínica de deficiência funcional pós-tratamento; (EDN pré-tratamento<EDN pós-tratamento) recuperação intermediária, melhora parcial da deficiência funcional seguida de estabilidade ou recidiva precedida de estabilidade ou de melhora clínica ou estabilidade; (EDN pré-tratamento>pontuação EDN pós-tratamento) recuperação funcional ausente, progressão da deficiência funcional e/ou óbito. Pré, pré-tratamento. 40 dias, 40 dias pós-tratamento. 80 dias, 80 dias pós-tratamento. N/a, não se aplica. Os quadros cinzas sinalizam os cães incluídos no grupo cMSC.

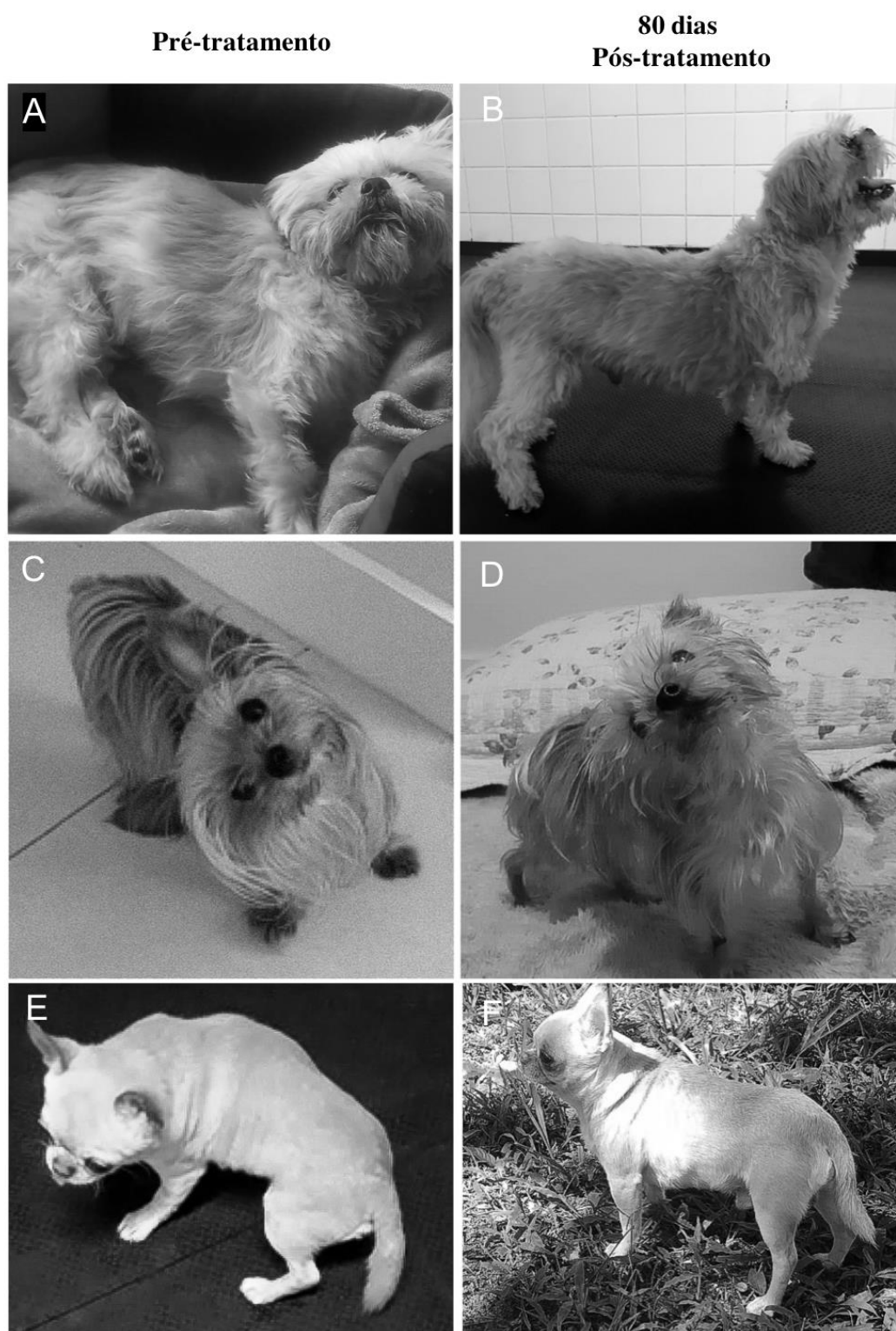


FIGURA 14. Avaliação neurológica dos cães 4 (A, B), 7 (C, D) e 12 (E, F) do grupo PAC, no pré-tratamento (A, C, E) e 80 dias pós-tratamento (B, D, F).

(A) No cão 4 nota-se tetraparesia não-ambulatoria. O cão apresentava dor intensa nas regiões cervical e cervico-torácica, déficits proprioceptivos, reflexos miotáticos alterados

e picos de hipertermia. Após o tratamento, (B) apresenta-se em estação, devido melhora da paresia. (C) No cão 7 observa-se desvio de cabeça para a direita e base ampla. Outros sinais apresentados eram déficits proprioceptivos, andar em círculos, nistagmo, cegueira central, tremor de intenção e dismetria. Após o tratamento, (D) nota-se piora dos sinais neurológicos, ainda com desvio de cabeça, opistótono, estado mental alterado e déficits proprioceptivos graves. (E) No cão 12 observa-se paresia, depressão e andar em círculos. O cão apresentava estrabismo, nistagmo, ataxia e paresia ambulatória. Após o tratamento, (F) observa-se melhora do nível de consciência, marcha e postura.

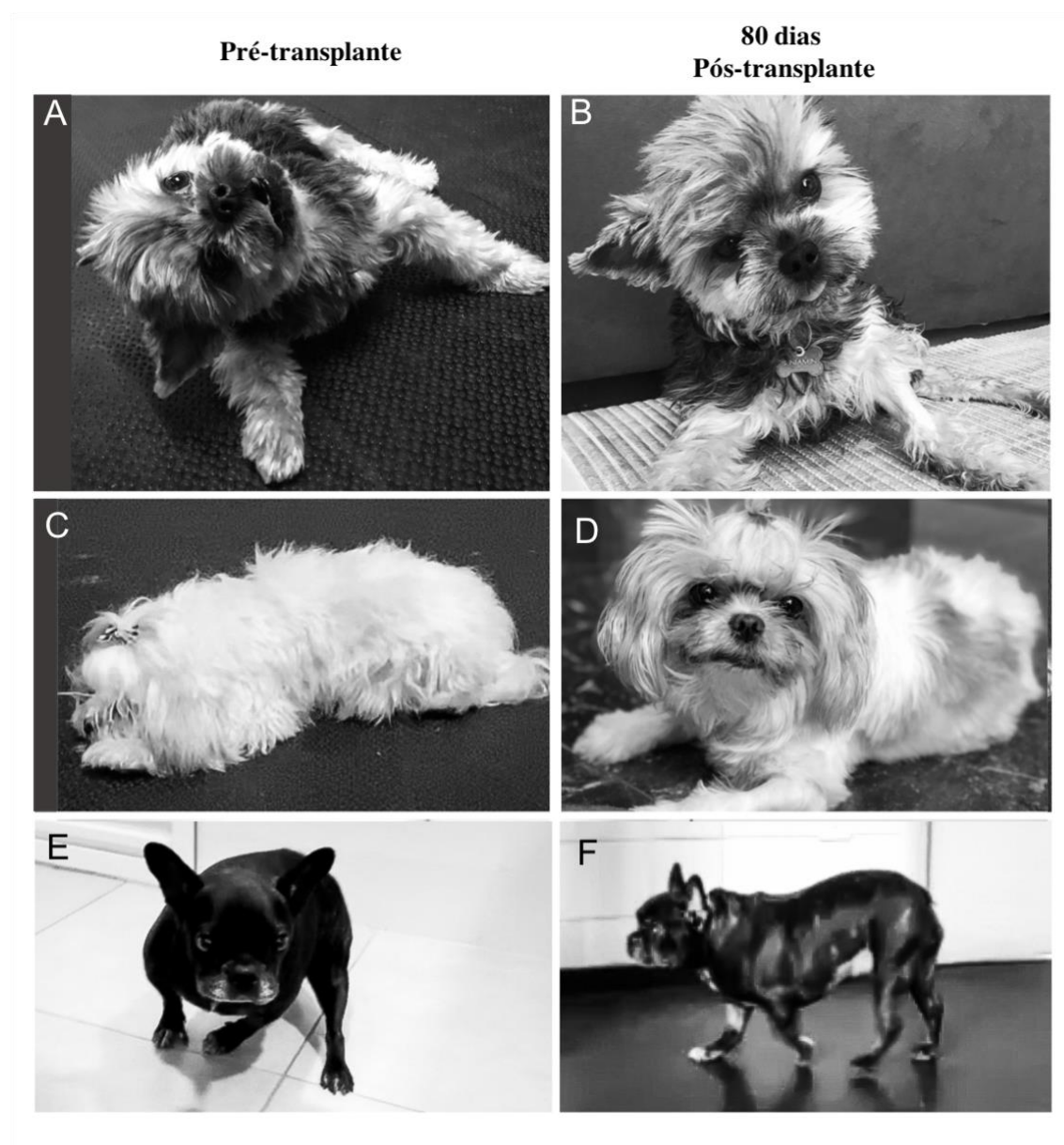


FIGURA 15. Avaliação neurológica dos cães 5 (A, B) e 8 (C, D) e 10 (E, F) do grupo cMSC, no pré-tratamento (A, C, E) e 80 dias pós-tratamento (B, D, F).

(A) No cão 5 observa-se desvio de cabeça e tetraparesia não-ambulatoria. O cão apresentava nistagmo, estrabismo, déficits proprioceptivos e aumento do tônus extensor dos membros pélvicos e torácico esquerdos. Após os transplantes de Ad-MSCs, (B) observa-se melhora do desvio de cabeça e do tônus extensor. (C) No cão 8 observa-se estado mental deprimido. O cão apresentava prostração, crises epiléticas seriadas, focais com generalização secundária, de difícil controle e *status epilepticus*. Após o transplante de Ad-MSCs, (D) nota-se animal em decúbito esternal, alerta e interativo, devido a melhora da alteração no estado mental. Ainda, houve aumento (>25%) do espaço interictal. (E) No cão 10 observa-se estado mental deprimido, tetraparesia e tetrataxia. O cão apresentava múltiplas alterações comportamentais. Após o transplante de Ad-MSCs, (F) notam-se melhora no estado mental, diminuição da ataxia, paresia. Ainda houve diminuição do número de alterações comportamentais.

5.2.4 Avaliação da Redução das Lesões por Imagem de RM

No momento pré-tratamento realizaram-se as imagens de RM para todos cães do grupo PAC (cães 1-12) e cMSC (cães 4, 5, 7, 8, 10). No momento 80 dias pós-tratamento, realizaram-se as imagens de RM nos cães sobreviventes (cães 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 e 12) do grupo PAC e cMSC (cães 5, 8, e 10).

A Escala ERM foi utilizada para quantificar a resposta de redução da lesão neurológica para ambos grupos. No momento 80 dias pós-tratamento para o grupo PAC, 50% (5/10) apresentaram redução intermediária das lesões, 30% (3/10) não apresentaram redução das lesões e 20% (2/10) apresentaram ótima redução das lesões nas imagens de RM (Quadro 7). Para o grupo cMSC, 100% (3/3) dos cães apresentaram redução intermediária das lesões (Quadro 7).

A Escala ERM foi comparada entre os grupos PAC e cMSC. Para o grupo PAC foram utilizadas 12 observações, com mediana um e variando de zero a dois. No grupo cMSC foram utilizadas cinco observações, todas com pontuação um. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,8491$).

As figuras 16-18 ilustram representativamente as lesões neurológicas dos cães 4, 7 e 12 do grupo PAC por imagem de RM. As figuras 19-21 ilustram representativamente as lesões neurológicas dos cães 5, 8 e 10 do grupo cMSC por imagem de RM.

As características gerais das imagens de RM dos grupos PAC e cMSC encontram-se descritas em Anexos D e E, respectivamente.

QUADRO 8. Resultados da Escala ERM dos grupos PAC e cMSC.				
Cão	Grupo PAC		Grupo cMSC	
	Pontuação 80 dias pós	Redução das lesões	Pontuação 80 dias pós	Redução das lesões
1	0	Ótima		
2	0	Ótima		
3	1	Intermediária		
4	1	Intermediária	Não realizado (retirado do estudo)	n/a
5	2	Ausente	1	Intermediária
6	Não realizado (óbito)	n/a		
7	2	Ausente	Não realizado (óbito)	N/a
8	1	Intermediária	1	Intermediária
9	Não realizado (óbito)	n/a		
10	2	Ausente	1	Intermediária
11	1	Intermediária		
12	1	Intermediária		

(Pontuação 0, ótima) Redução das lesões iniciais em tempo ponderado em T2 sem novas lesões. (Pontuação 1, intermediária) Redução das lesões iniciais e novas lesões em tempos ponderados em T2 ou não redução das lesões iniciais e ausência de novas lesões. (Pontuação 2, ausente). Ausência de redução da lesão inicial e novas lesões em tempo ponderado em T2. N/a, não se aplica. Os quadros cinzas sinalizam os cães incluídos no grupo cMSC.

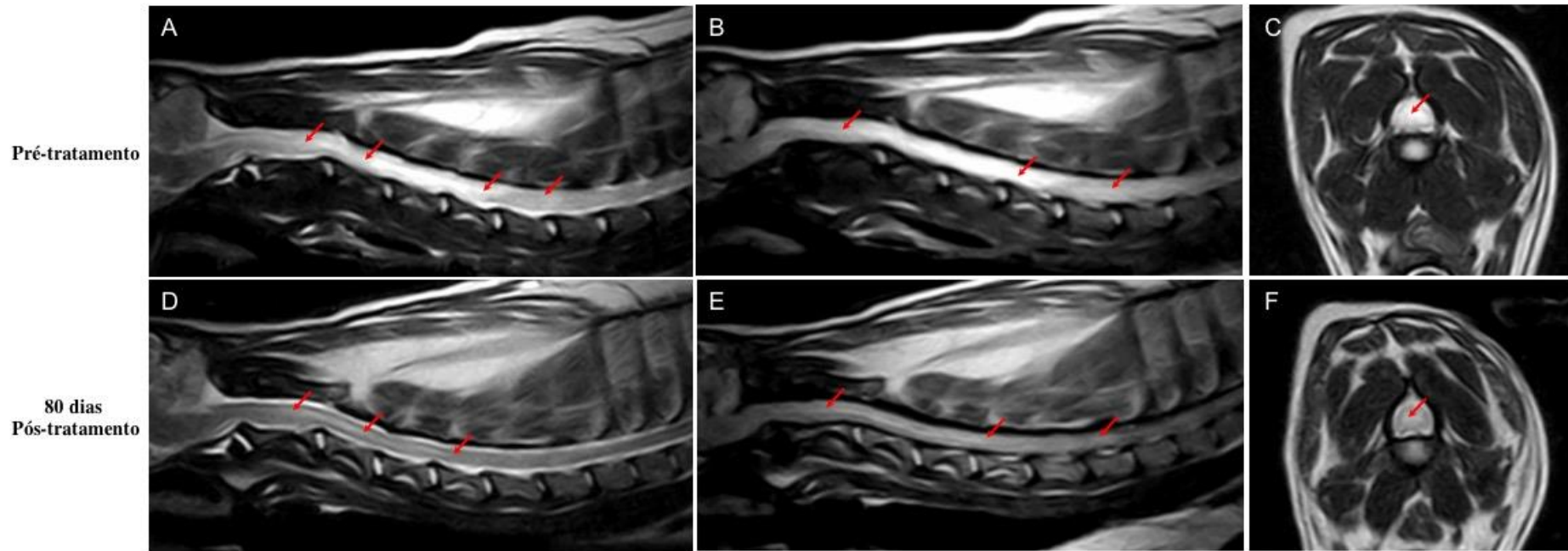


FIGURA 16. Imagens de RM da região cervical do cão 4 do grupo PAC no momento pré-tratamento (A-C) e 80 dias pós-tratamento (D-F), nos planos sagital (A, B, D, E) e transversal (C, F).

(A) Observa-se hipersinal difuso a nível de C1-T1 em tempo ponderado em T2 e (B) FLAIR (setas). (C) Nota-se hipersinal intramedular e edema perilesional e a nível de C2-C3 (seta). Aos 80 dias após o tratamento imunossupressor, (D-E) observa-se redução da intensidade do sinal intra/perimedular a nível de C1-T1 (setas). (F) Nota-se diminuição do edema perilesional com persistência do hipersinal intramedular nível de C2-C3 em tempo ponderado em T2 (seta).

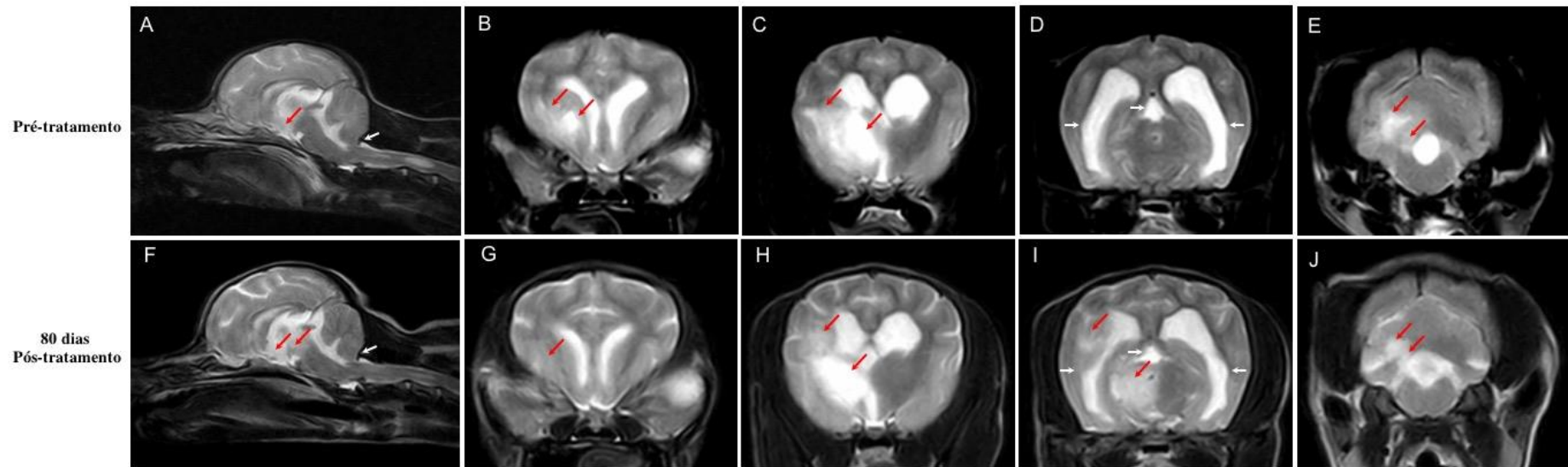


FIGURA 17. Imagens de RM do encéfalo do cão 7 do grupo PAC nos momentos pré-tratamento (A-E) e 80 dias pós-tratamento (F-J) nos planos sagital (A, F) e transversal (B, C, D, E, G, H, I, J), na sequência de tempo ponderado em T2.

(A) Observa-se hipersinal na região cortico-talâmica em corte sagital (seta vermelha) e herniação cerebelar pelo forame magno (seta branca). (B, C) Observam-se hipersinais em lobo frontal direito, tálamo, cápsula interna e lobo temporal direito com presença de edema perilesional (setas vermelhas). (D) Nota-se hidrocefalia dos ventrículos laterais e terceiro ventrículo (setas brancas). (E) Nota-se hipersinal no vermis cerebelar e hemisfério cerebelar direito (setas). Aos 80 dias após o tratamento imunossupressor, (F) as regiões de hipersinal se mantêm (setas vermelhas), assim como a herniação cerebelar (seta branca). (G, H, I) Observa-se diminuição do hipersinal em lobo frontal (setas vermelhas) com persistência das lesões hipertintensas no tálamo. (J) Novas lesões hipertensas surgem em mesencéfalo e lobo temporal direito (setas vermelhas) e a hidrocefalia se mantém (setas brancas).

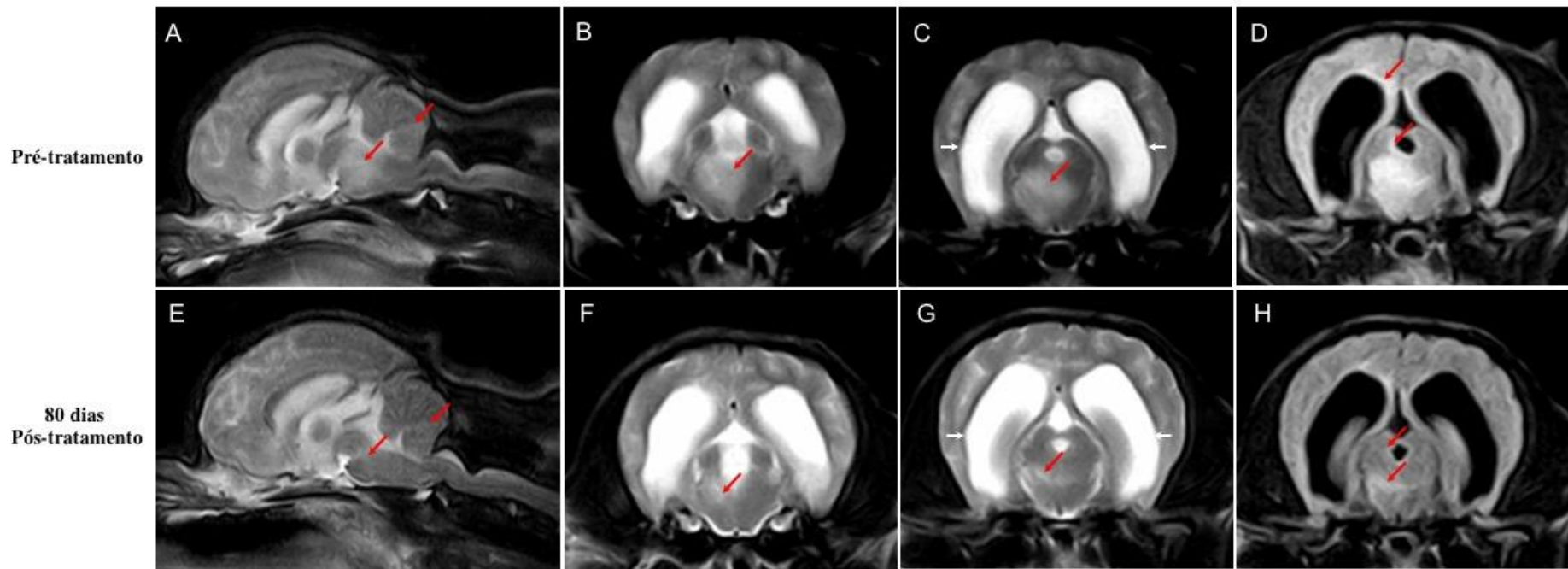


FIGURA 18. Imagens de RM do encéfalo do cão 12 do grupo PAC nos momentos pré-tratamento (A-E) e 80 dias pós-tratamento (F-J), nos planos sagital (A, E) e transversal (B, C, D, F, G, H).

(A, B, C) Observa-se hipersinal em mesencéfalo e cerebelo (setas vermelhas) na sequência tempo ponderado em T2. (D) Notam-se lesões hiperintensas na região periaquedutal e periventricular (setas vermelhas) na sequência FLAIR, e hidrocefalia (seta). Aos 80 dias após o tratamento imunossupressor (E, F, G) observa-se redução do hipersinal em mesencéfalo e cerebelo (setas vermelhas) em tempo ponderado em T2. (H) Embora persista o hipersinal na região periaquedutal nota-se redução das lesões inflamatórias na sequência FLAIR.

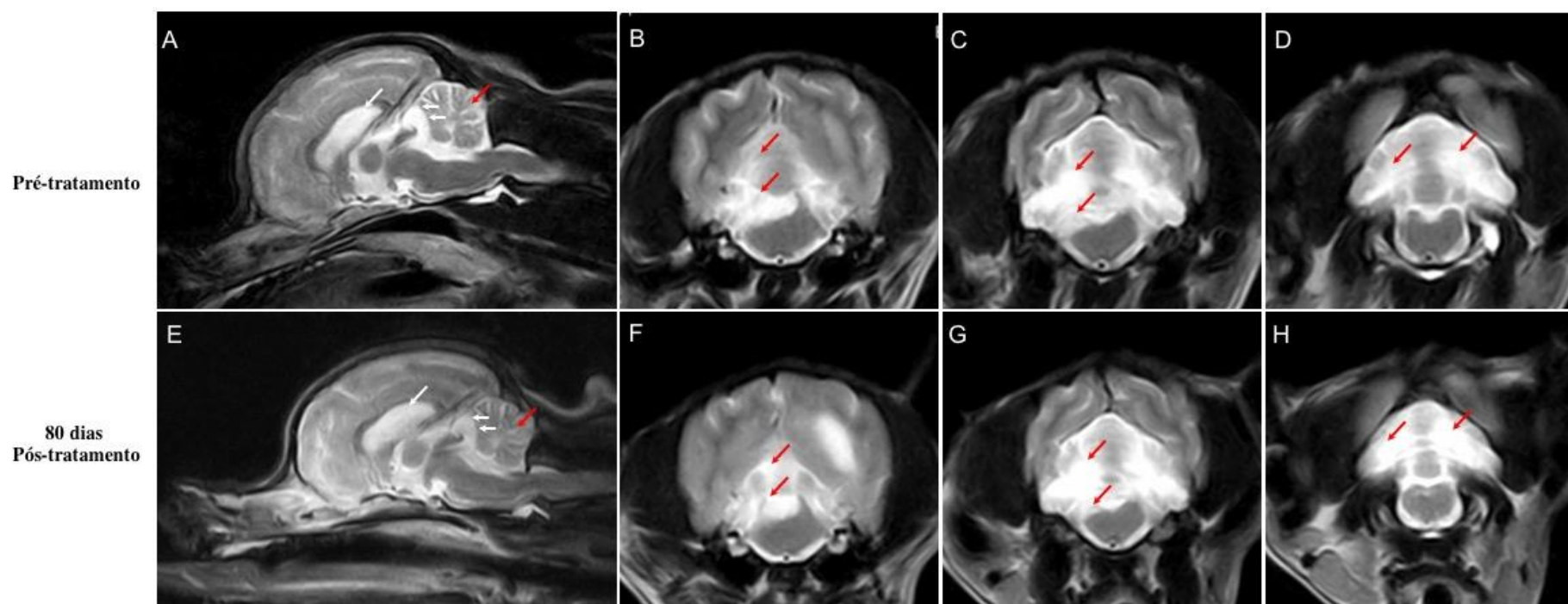


FIGURA 19. Imagens de RM do encéfalo do cão 5 do grupo cMSC nos momentos pré-transplante (A-D) e 80 dias pós-transplante (E-H), nos cortes sagital (A, E) e transversal (B, C, D, F, G, H).

(A) Hipersinal em cerebelo (seta vermelha), aumento dos ventrículos laterais e divertículo quadrigeminal (setas brancas) na sequência tempo ponderado em T2. (B-D) Observam-se hipersinais na região pontino-cerebelar envolvendo a substância branca do cerebelo, pedúnculos cerebelares e lado direito do tronco-encefálico (setas vermelhas). Aos 80 dias após o transplante de Ad-MSCs, (E-H) nota-se a persistência do hipersinal nas mesmas regiões (setas vermelhas) e persistência da ventriculomegalia (setas brancas).

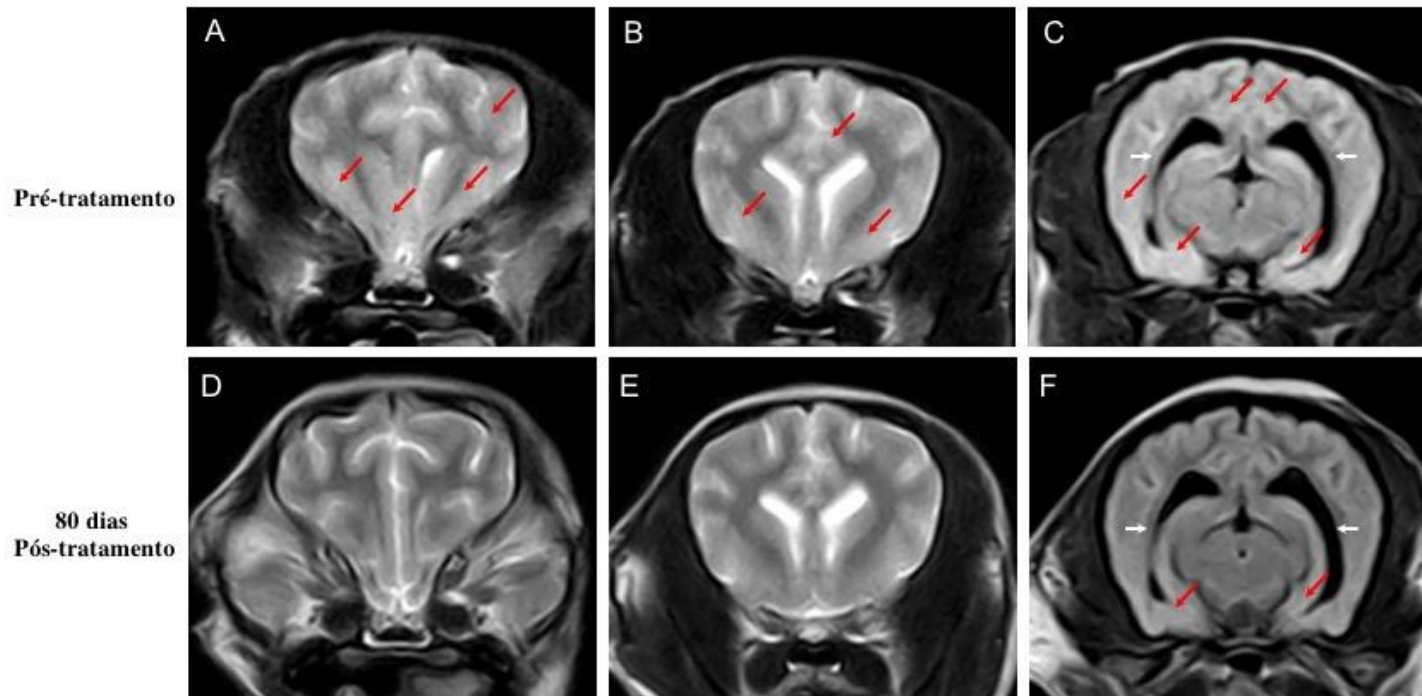


FIGURA 20. Imagens de RM do encéfalo do cão 8 do grupo cMSC nos momentos pré-transplante (A-C) e 80 dias pós-transplante (D-F), no corte transversal.

(A, B) Notam-se hipersinais em substância cinzenta do lobo frontal bilateralmente (setas vermelhas) com perda da definição entre as substâncias branca e cinzenta (indicando edema cerebral) na sequência tempo ponderado em T2. (C) Observa-se hipersinal nos lobos piriforme e temporal bilateralmente e lobo parietal (setas vermelhas) sequência FLAIR. Também se observa ventriculomegalia dos ventrículos laterais (setas brancas). Aos 80 dias após o transplante de Ad-MSCs, (D,E) observa-se redução dos hipersinais nos lobos frontal e parietal e melhor definição entre as substâncias branca e cinzenta na sequência tempo ponderado em T2. (G) Nota-se diminuição das áreas hiperintensas (setas vermelhas) na sequência FLAIR e a ventriculomegalia persiste (setas brancas).

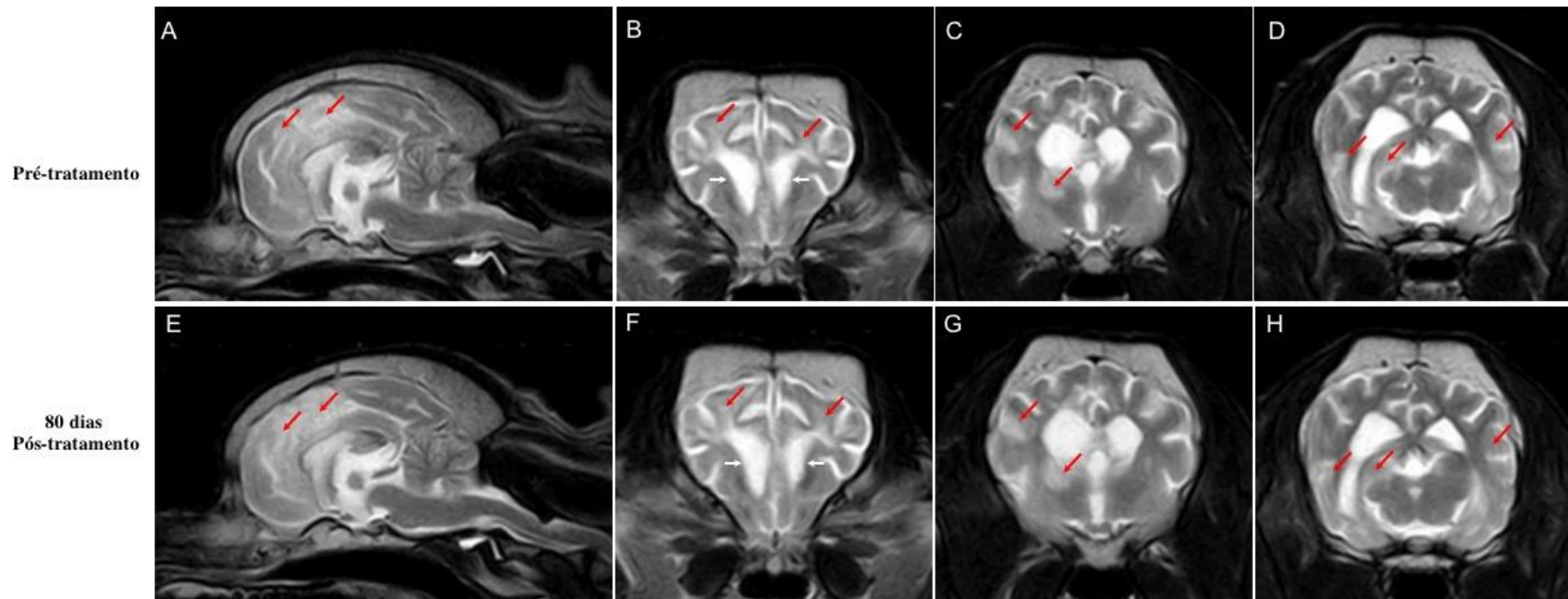


FIGURA 21. Imagens de RM do encéfalo do cão 10 do grupo cMSC nos momentos pré-transplante (A-C) e 80 dias pós-transplante (D-F), nos cortes sagital (A, B) e transversal (B, C, D, F, G, H), na sequência tempo ponderado em T2.

(A) Observa-se hipersinal difuso em região cortical do encéfalo (setas vermelhas). (B, C) Notam-se áreas de hipersinal difuso em lobo frontal, temporal bilateralmente e região direita de tálamo e lobo parietal (setas vermelhas). Nota-se a presença de hidrocefalia e assimetria dos ventrículos laterais (setas brancas). (D) Nota-s hipersinal em lobo temporal bilateral e colículo rostral direito (setas vermelhas). Aos 80 dias após o transplante de Ad-MSCs, (E-H) os hipersinais persistiram.

5.2.6 Análise do LCR

No momento pré-tratamento realizou-se a análise do LCR para todos cães do grupo PAC (cães 1-12) e cMSC (cães 4, 5, 7, 8, 10). No momento 80 dias pós-tratamento, realizou-se a análise do LCR para os cães sobreviventes (cães 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 e 12) do grupo PAC e cMSC (cães 5, 8, e 10).

Para o grupo PAC, no pré-tratamento, 83,3% (10/12) dos cães apresentaram LCR inflamatório e 16,7% (2/12) não-inflamatório. Aos 80 dias pós-tratamento, 70% (7/10) dos cães apresentaram LCR inflamatório e 30% (3/10) não-inflamatório. Para o grupo cMSC, no pré-transplante 100% (5/5) dos cães apresentaram LCR inflamatório. Aos 80 dias pós-transplante, 100% (4/4) dos cães apresentaram LCR inflamatório. O Anexo F apresenta a análise do LCR (eritrócitos, celularidade e concentração de proteínas) para os cães dos grupos PAC e cMSC.

Não foram encontradas diferenças significativas na comparação do LCR entre os momentos pré-tratamento e 80 dias pós-tratamento ($p > 0.05$) para os grupos PAC e cMSC individualmente e na comparação entre os grupos ($p > 0.05$) (Figura 22). Entretanto, para ambos grupos observou-se tendência a melhora da inflamação no SNC pela redução no número de células nucleadas (grupo cMSC) e concentração de proteínas (grupo PAC) (Figura 22).

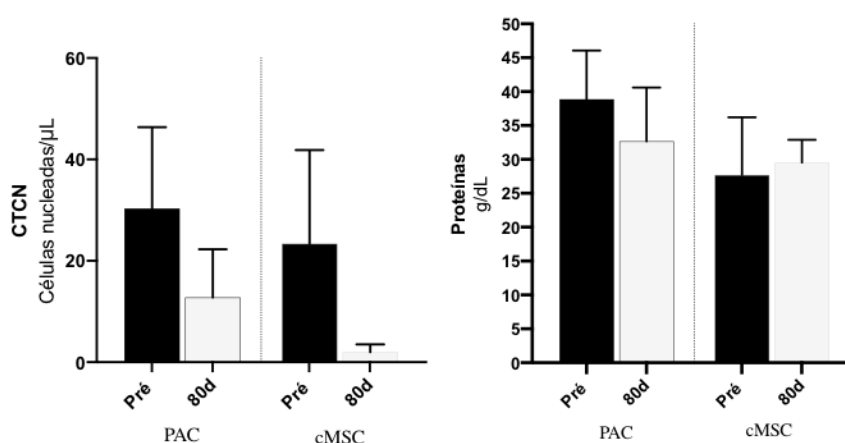


FIGURA 22. Análise do LCR nos momentos pré-tratamento e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.

Os valores foram representados como mediana, mínimo e máximo ($p > 0,05$). CTCN, Número de células nucleadas no LCR. Proteínas, concentração de proteínas totais.

5.2.7 Avaliação da Resposta ao Tratamento

Utilizou-se a Escala MERT para avaliação da resposta pós-tratamento no momento 80 dias pós-tratamento para todos os cães do grupo PAC (1-12) e quatro cães do grupo cMSC (5, 7, 8, e 10) (Figura 22).

Para o grupo PAC, 41,7% (5/12) dos cães apresentaram remissão parcial da doença (intermediária), 41,7% (5/12) não apresentaram remissão (ausente) e 16,7% (2/12) apresentaram remissão total (ótima) (Quadro 9).

Para o grupo cMSC, 75% (3/4) dos cães apresentaram remissão parcial da doença (intermediária) e 25% (1/4) não apresentaram remissão (ausente) (Quadro 9).

5.2.8 Efeitos Adversos

Registrou-se a ocorrência de efeitos adversos durante o tratamento do grupo PAC e grupo cMSC.

Para os cães do grupo PAC, todos os cães (100%, 12/12) desenvolveram efeitos adversos, que corresponderam a: Leves - polidipsia em 58,3% (7/12), poliúria em 58,3% (7/12), gastroenterite em 41,7% (5/12), letargia em 33,3% (4/12), polifagia em 33,3% (4/12), letargia em 33,3% (4/12), respiração ofegante em 25% (3/12), ganho de peso em 16,7% (2/12), dermatopatia/infecções da pele em 16,7% (2/12), hiporexia em 16,7% (2/12), infecção urinária em 16,7% (2/12), otite média em 8,3% (1/12); Moderados - melena ou hematoquezia em 25% (3/12); Graves - hepatopatia em 8,3% (1/12) e pneumonia em 8,3% (1/12) (Quadro 10).

Para os cães do grupo cMSC, no total dos transplantes realizados pela via IT (após o primeiro e segundo transplantes, n = 6), 66,7% (4/6) apresentaram efeitos adversos, que corresponderam a: Leves - apatia em 66,7% (4/6), hiporexia em 50% (3/6); e 33,3% (2/6) Graves: bradicardia em 33,3% (2/6) e hipotensão em 33,3% (2/6). Os sinais clínicos leves foram auto-limitantes (duração de 24-48 h). Os transplantes de Ad-MSCs pela via IV não geraram efeitos adversos (100%, 3/3) (Quadro 10).

QUADRO 9. Avaliação da resposta ao tratamento dos grupos PAC e cMSC pela escala MERT.										
Cão	Grupo PAC					Grupo cMSC				
	EDN	ERM	LCR	Soma	Remissão	EDN	ERM	LCR	Soma	Remissão
1	0	0	1	1	Ótima					
2	0	0	0	0	Total					
3	1	1	0	2	Intermediária					
4	1	1	1	3	Intermediária					
5	2	2	1	5	Ausente	1	1	1	3	Intermediária
6	6	6			Ausente					
7	2	2	1	5	Ausente	6	6			Ausente
8	1	1	1	3	Intermediária	1	1	1	3	Intermediária
9	6	6			Ausente					
10	1	2	1	4	Ausente	1	2	0	3	Intermediária
11	1	1	0	2	Intermediária					
12	1	1	1	3	Intermediária					

EDN, Escala de Déficit Neurológico (0, ótima; 1, intermediária; 2, ausente). ERM, Escala de Ressonância Magnética (0, ótima; 1, intermediária; 2, ausente). LCR, análise do líquido cefalorraquidiano (0, não-inflamatório; 1, inflamatório). MERT, Escala de Resposta ao Tratamento para Cães com MUO (0-1, total, 2-3, intermediária; 4-5 e 6 (óbito), ausente).

QUADRO 10. Efeitos adversos manifestados após os transplantes de Ad-MSCs no grupo cMSC.										
	Primeiro Transplante				Segundo Transplante					
Cão	Via de Transplante		Apatia*	Hiporexia*	Via de Transplante		Apatia*	Hiporexia*	Bradicardia	Hipotensão
4	IT	x			IT	x	x		x	x
	IV	n/a	n/a	n/a	IV	x				
5	IT	x	x	x	IT	x	x	x	x	x
	IV	n/a	n/a	n/a	IV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
7	IT	x			IT	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	IT	n/a	n/a	n/a	IV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
8	IT	n/a	n/a	n/a	IT	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	IV	x			IV	x				
10	IT	n/a	n/a	n/a	IT	x	x			
	IV	x			IV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

*Autolimitantes (24-48h). IT, transplante realizado pela via intratecal. IV, transplante realizado pela via intravenosa. N/a, não se aplica.

5.2.9 Alterações Hematológicas e Bioquímicas

As alterações hematológicas e bioquímicas foram comparadas nos momentos pré-tratamento, 40 e 80 dias pós-tratamento. Não houve diferenças estatísticas na comparação das variáveis número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, contagem de plaquetas e de leucócitos, concentração sérica de proteínas plasmáticas totais, albumina, globulina, ALT, FA, ureia e creatinina ($p > 0.05$) (Figuras 23 e 24).

Não houve diferenças estatísticas na comparação das variáveis hematológicas e bioquímicas entre os grupos PAC e cMSC ($p > 0,05$) (Figuras 23 e 24).

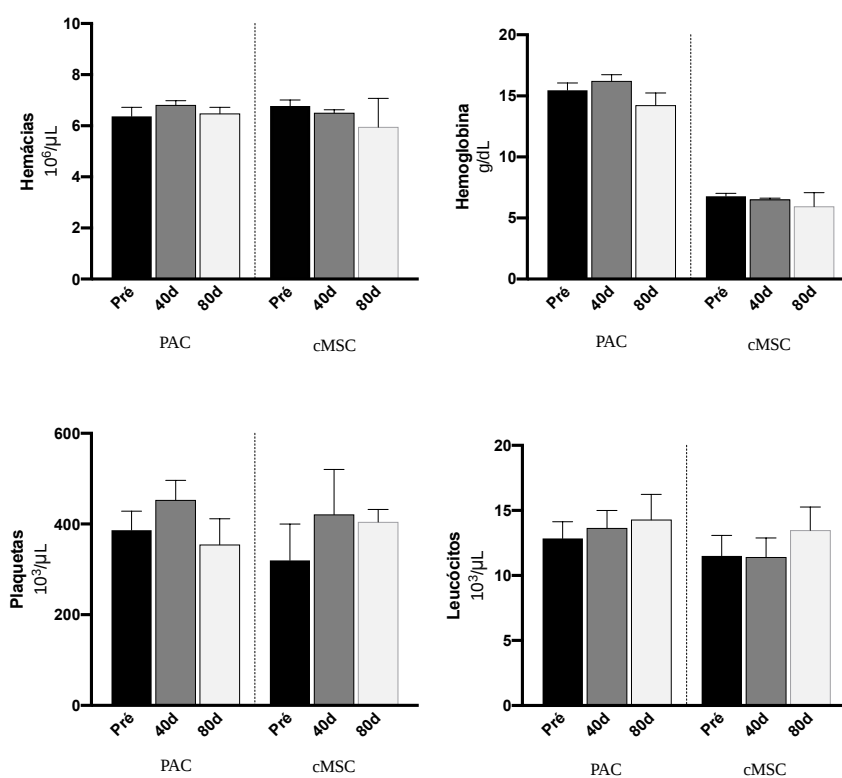


FIGURA 23. Parâmetros hematológicos nos momentos pré-tratamento e aos 40 dias e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.

Os valores foram representados como média $\pm$ erro padrão ($p > 0.05$).

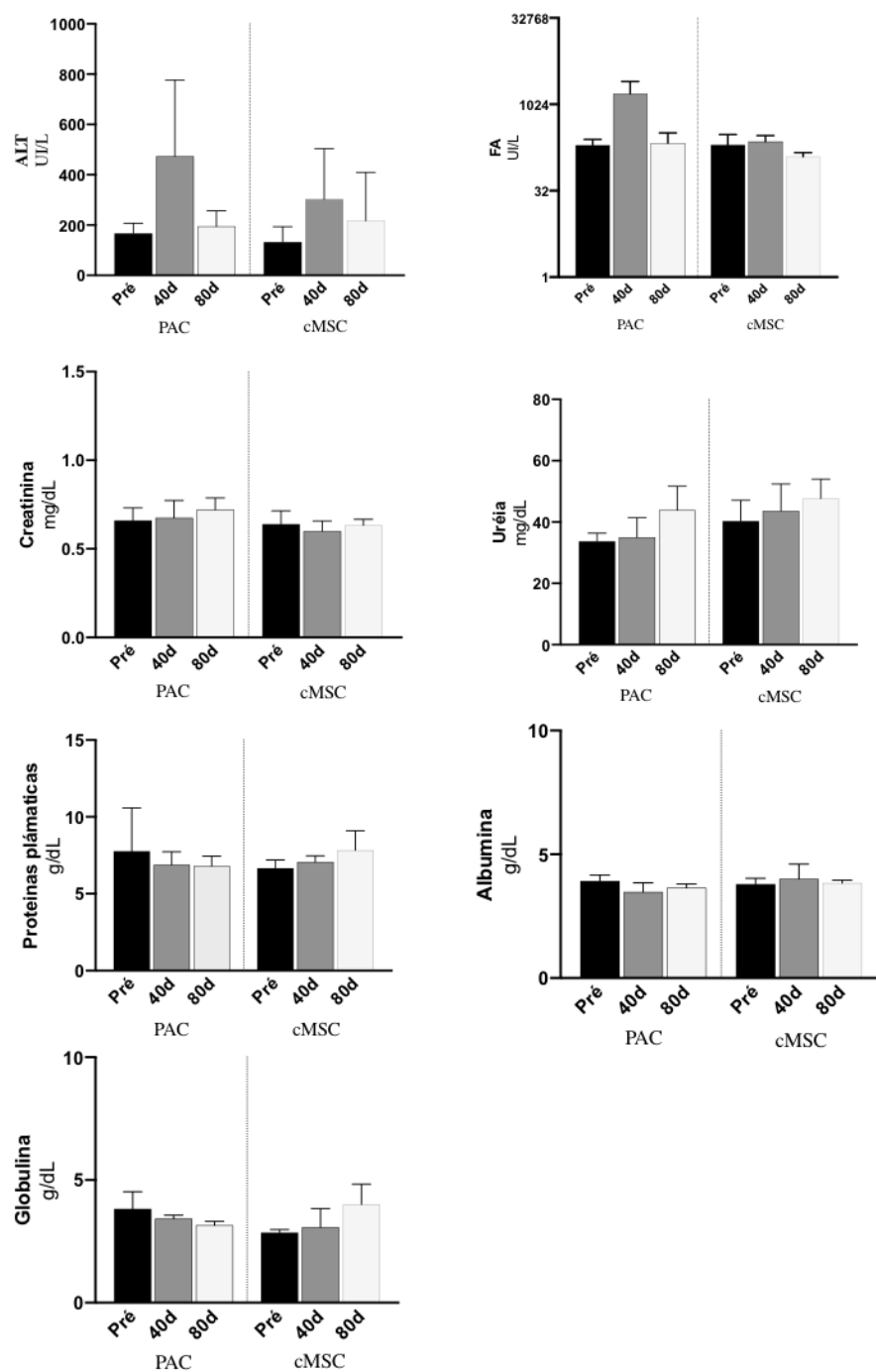


FIGURA 24. Parâmetros bioquímicos nos momentos pré-tratamento e aos 40 dias e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.

Os valores foram representados como média $\pm$ erro padrão ($p > 0.05$). FA, fosfatase alcalina. ALT, alanina aminotransferase

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As propriedades terapêuticas das MSCs residem na capacidade de secretarem moléculas bioativas e interagirem com o microambiente do tecido lesionado. MSCs humanas e de roedores ativadas com citocinas pró-inflamatórias intensificaram suas propriedades imunomoduladoras e imunossupressoras, revelando o potencial terapêutico das MSCs em ambientes inflamados (ENGLISH et al., 2007; HEMEDA et al., 2010; LIN et al., 2017; SAPAROV et al., 2016; VIGO et al., 2019; YANG et al., 2018). Entretanto, são escassos os trabalhos que revelam as propriedades terapêuticas de MSCs caninas (AMORIM et al., 2020; YANG et al., 2018), sendo este um tópico relevante na pesquisa translacional. Além disto, observações preliminares com MSCs humanas indicam que as propriedades imunomoduladoras diferem entre as fontes celulares (MELIEF et al., 2013).

Utilizando-se a metodologia descrita, as linhagens de Ad-MSCs e PMSCs caninas foram isoladas e expandidas uniformemente e evidenciaram as características de auto-renovação e multiplicação *in vitro*. As Ad-MSCs demonstraram multiplicação precoce em passagem zero em comparação às PMSCs que, após o repique, atingiram a confluência em tempo menor (dois a três dias) em comparação às Ad-MSCs (3-4 dias), o que era esperado uma vez que a capacidade proliferativa das PMSCs é considerada superior (BARLOW et al., 2008).

As amostras de Ad-MSCs e PMSCs evidenciaram os critérios mínimos associados à identificação de MSCs, incluindo morfologia fibroblastóide, aderência ao plástico, capacidade de se diferenciar nas três linhagens mesodermis osteogênica, adipogênica e condrogênica, e de expressar antígenos de superfície específicos (DOMINICI et al., 2006; KANG et al., 2012; LONG et al., 2018; LUNA et al., 2014; VIEIRA et al., 2010; ZHAN et al., 2019). Embora os critérios sejam extrapolados de MSCs humanas, nossos achados imunofenotípicos foram comparáveis a estudos de prévios com MSCs caninas (KANG et al., 2012; KISIEL et al., 2012; LONG et al., 2018; LUNA et al., 2014; VIEIRA et al., 2010; ZHAN et al., 2019). Ainda, as Ad-MSCs e PMSCs não expressaram HLA-DR/MHC-II, caracterizando um fenótipo não-imunogênico (LE BLANC et al., 2003).

Para se avaliar a resposta imunomoduladora/anti-inflamatória e neuroprotetora/neurorregenerativa das MSCs *in vitro*, as células foram estimuladas com as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IFN- γ combinado TNF- α , que são frequentemente associadas a processos neuroimunes do SNC (AMORIM et al., 2020;

KERSCHENSTEINER; MEINL; HOHLFELD, 2010; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2013; SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

A citocina anti-inflamatória PGE₂ é capaz de induzir a secreção de IL-10 por macrófagos que, por sua vez, suprimem a proliferação de células NK. Além disto, a PGE₂ promove a diferenciação de macrófagos ao alterar seu estado metabólico (ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019). As enzimas PTGES2 e COX-1,2 participam mutuamente na síntese da PGE₂ (KALINSKI, 2012). Nós observamos que os meios inflamatórios único e combinado não estimularam a expressão de PTGES2 pelas Ad-MSCs e PMSCs caninas. Por outro lado, previamente observou-se que os níveis de PGE₂ em Ad-MSCs e PMSCs aumentaram após a estimulação com TNF- α e IFN- γ (AMORIM et al., 2020) e, ao contrário de nossos achados, observou-se aumento da expressão de COX-2 em Ad-MSCs caninas estimuladas (KANG et al., 2008; YANG et al., 2018). Deste modo, nós acreditamos que a PTGES2 poderia ser menos importante do que a COX-2 para a produção de PGE₂ pelas MSCs quando ativadas com IFN- γ e TNF- α .

Apesar da presença de desmielinização crônica na EM/MUO, o tecido neural permanece responsivo a sinais neurotróficos e neurorestorativos para se iniciar a regeneração do tecido lesionado (WILLIS et al., 2020). Os fatores neurotróficos BDNF e GDNF são importantes reguladores da sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular no SNC (WEISHAUP; BLESCH; FOUAD, 2012) e o HGF é um potente fator angiogênico com efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e de restauração tecidual (NAKAMURA; MIZUNO, 2010; WANG et al., 2015). Nós observamos resultados distintos na ativação dos fatores neurotróficos/anti-inflamatórios pelas fontes de MSCs. As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IFN- γ com TNF- α potencializaram a expressão de BDNF, HGF e GDNF pelas Ad-MSCs, mas não pelas PMSCs. Deste modo, as Ad-MSCs apresentaram maior potencial neuroprotetor e neurorregenerador quando ativadas em comparação às PMSCs.

Nós observamos que a IDO não foi expressa constitutivamente pelas Ad-MSCs e PMSCs caninas, mas que requereu ativação por IFN- γ e TNF- α para ser expressa, conforme previamente identificado (ROBINSON; HALE; CARLIN, 2005). Nossas observações indicam que a IDO poderia participar dos mecanismos imunomoduladores das Ad-MSCs e PMSCs caninas de modo semelhante às MSCs humanas (DE WITTE et al., 2016; SU et al., 2014).

Em relação ao perfil secretor, as MSCs de ambas fontes compartilharam os seis fatores solúveis, porém, com diferenças nas concentrações de IL-6 e IL-8. Assim como

nas PMSCs observou-se aumento significativo da secreção de IL-8 após as estimulações única e combinada, as Ad-MSCs secretaram maiores concentrações de IL-6 após as estimulações.

Até recentemente, a citocina IL-6 era classificada como exclusivamente pró-inflamatória, produzida após destruição tecidual e infecções por patógenos, entretanto, a IL-6 está envolvida na regulação de processos metabólicos, regenerativos e neurais (SCHELLER et al., 2011). Além disto, identificou-se que é capaz de promover neuroproteção (JUNG; KIM; CHAN, 2011; LAHIANI et al., 2015), supressão de apoptose de astrócitos (GU et al., 2016), e que pode estar relacionada a imunorregulação de CDs quando secretada por MSCs (DJOUAD et al., 2007). A IL-8, por outro lado, é uma citocina quimiotática que regula a resposta inflamatória aguda, sendo capaz de aumentar a sobrevivência de células endoteliais e a proliferação celular, e de regular a angiogênese (BAGGIOLINI; CLARK-LEWIS, 1992; HOU et al., 2014; LEGLER; THELEN, 2016; LI et al., 2003). Nossos resultados sugerem que as Ad-MSCs e PMSCs caninas apresentam propriedades imunomoduladoras por diferentes mecanismos.

Diferentemente de estudos anteriores, a IL-10 foi expressa nas MSCs caninas de ambas fontes (ENGLISH et al., 2007; KANG et al., 2008), entretanto, a secreção desta citocina não foi potencializada após a estimulação. Por outro lado, os níveis de expressão gênica e de secreção proteica não necessariamente precisam estar proporcionalmente correlacionados, uma vez que o controle dos processos regulatórios ocorre em diferentes estágios (SHEBL et al., 2010; VOGEL; MARCOTTE, 2012). Além disto, a meia-vida da IL-10 é extremamente curta (LE et al., 1997), podendo ter sido parcialmente degradada antes da obtenção do meio condicionado para a respectiva análise quantitativa.

Interessantemente, pesquisas preliminares identificaram que Ad-MSCs caninas não secretaram IL-10, citocina que foi produzida por monócitos após exposição a IL-6 (KREŠIĆ et al., 2017; MELIEF et al., 2013). A produção de IL-10 também não aumentou quando Ad-MSCs caninas foram co-cultivadas com leucócitos, indicando que esta citocina pode não desempenhar um papel importante na imunomodulação das MSCs caninas (KANG et al., 2008).

Ademais, nós observamos que os níveis da quimiocina MCP-1, da citocina anti-inflamatória GM-CSF e da citocina pró-inflamatória IL-2 foram semelhantes entre as duas fontes de MSCs e não sofreram aumento/diminuição significativa dos níveis após as estimulações.

Baseado em nossos resultados, ambas fontes de MSCs caninas secretaram fatores solúveis imunomoduladores/imunossupressivos, com diferenças na ativação com o meio inflamatório, sugerindo que as Ad-MSCs e PMSCs caninas apresentam atividades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e neuroprotetoras/neurorregenerativas por mecanismos distintos. Nossos achados suportam a possível aplicação destas células no âmbito clínico para o tratamento de doenças neuroimunes, no qual o ambiente inflamatório causado pelos desequilíbrios imunológicos promoveria um incremento na atividade terapêutica das MSCs.

O tratamento das doenças neuroimunes, como a EM, tem sido alvo de estudos com a terapia baseada em MSCs em função dos atuais tratamentos aprovados serem parcialmente eficazes na resolução e prevenção de danos ao tecido inflamado do SNC (FREEDMAN et al., 2010). A MUO canina surge como um modelo natural em potencial para a EM em virtude das semelhanças imunopatológicas, clínicas e radiológicas e, ainda, por apresentar desenvolvimento espontâneo (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; GREER et al., 2010; PARK; UCHIDA; NAKAYAMA, 2012, 2013). De modo semelhante, o tratamento para a MUO reduz em parte os sinais clínicos e a frequência das recidivas, entretanto, não afeta a progressão da doença (CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016b; FLEGEL et al., 2011; JUNG et al., 2013; LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013; WONG et al., 2010; ZARFOSS et al., 2006).

No presente estudo, 12 cães com MUO foram tratados prospectivamente com ara-C associado a prednisona (grupo PAC). Cinco cães apresentaram remissão parcial/ausente ao tratamento imunossupressor e receberam dois transplantes de Ad-MSCs pela via IT ou IV com 40 dias de intervalo entre si (grupo cMSC). Nós observamos que a maioria dos cães de ambos os grupos apresentaram porte, distribuição de idade, início e progressão dos sinais neurológicos similar aos achados da literatura (COOPER et al., 2014; GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010; TIMMANN et al., 2007; TIPOLD et al., 1993). Quanto ao sexo, nós identificamos que machos foram predominantemente mais diagnosticados, o que difere da maioria das pesquisas (COOPER et al., 2014; MUÑANA; LUTTGEN, 1998).

A resposta ao tratamento foi realizada com base nos achados clínicos, de imagens de RM e análise do LCR (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013). Devido a grande heterogeneidade clínica da MUO e a carência de métodos de quantificação de resposta ao tratamento, foram desenvolvidas as escalas de recuperação funcional (EDN), de redução das lesões neurológicas por imagem de RM (ERM) e de resposta ao tratamento para cães

com MUO (MERT), com base nas escalas de EM (DAHBOUR et al., 2017; HYUN et al., 2015; KURTZKE, 1983; SORMANI et al., 2013).

Aos 80 dias após o tratamento, nós observamos que a maioria dos cães do grupo PAC apresentou recuperação parcial (50%, 6/12) das funções neurológicas, seguido de ausência (33,3%, 4/12) e ótima recuperação funcional (16,7%, 2/12), respectivamente. Apesar de não haver diferenças estatísticas entre os momentos, notamos tendência a recuperação clínica após o tratamento. A sobrevida foi de 83,3% (10/12) no pós-tratamento. Utilizando-se protocolo semelhante de imunossupressão, a sobrevida a curto prazo varia consideravelmente de acordo com a literatura (GRANGER; SMITH; JEFFERY, 2010; LOWRIE et al., 2016).

Com exceção do cão 10, os cães apresentaram resultados da Escala EDN compatíveis com a Escala ERM. Na análise do LCR não houve diferenças significativas na celularidade ou concentração de proteínas após o tratamento, entretanto, houve tendência a melhora dos parâmetros, sugerindo redução da inflamação no SNC. Utilizando-se a Escala MERT, observamos que 41,7% (5/12) dos cães apresentou remissão parcial, frequência semelhante àqueles que não apresentaram remissão (41,7%, 5/12). A frequência de cães que apresentou remissão total foi inferior (16,7% 2/12). Nossas observações concordam com a literatura, em que a o tratamento de ara-C e prednisona pode promover uma resposta heterogênea nos cães com MUO (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013; MENAUT et al., 2008; ZARFOSS et al., 2006).

No grupo cMSC foram realizados dois transplantes sucessivos com o intuito de se obter resposta terapêutica superior, baseando-se em trabalhos anteriores (HARRIS et al., 2012; OH et al., 2018; ZHANG et al., 2009). Além disto, nosso grupo de pesquisa observou resposta terapêutica limitada após o transplante de MSCs pela via IT em dose única em cães com cinomose (*Dados não publicados*). As Ad-MSCs foram eleitas para o estudo clínico com base nos resultados *in vitro* que mostraram vantagens devido a fácil obtenção, isolamento rápido, e elevado potencial neuroprotetor/neurorregenerativo e imunomodulador.

Para o grupo cMSC, aos 80 dias pós-transplante houve tendência a melhora funcional, com recuperação funcional intermediária em 50% (2/4), ótima em 25% (1/4) e ausente em 25% (1/4) dos cães. Três cães do grupo cMSC realizaram a RM no pós-tratamento (cães 5, 8, e 10), devido a desistência do cão 4 do estudo. Apenas para o cão 8 as imagens de RM foram compatíveis com os achados clínicos. Previamente observou-se que embora alguns cães com MUO tenham apresentado remissão clínica após o

tratamento, os achados na RM foram anormais (LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013). Por outro lado, é possível que observar-se sinais neurológicos e/ou LCR anormal e lesões não identificáveis na RM (BOHN et al., 2006; LOWRIE; SMITH; GAROSI, 2013). Deste modo, a correlação clínica e radiológica na MUO ainda deve ser mais estudada.

Os cães do grupo cMSC não apresentaram diferenças significativas após o transplante pela análise do LCR, contudo, observou-se uma tendência a diminuição das células nucleadas, indicando redução do nível de inflamação.

No presente estudo, a maior parte dos cães (75%, 3/4) apresentou remissão parcial da doença e em apenas um cão (25%, 1/4) não houve remissão. A sobrevida para o grupo cMSC foi de 75% (3/4) aos 80 dias pós-tratamento. O cão 7 que veio a óbito apresentava lesões neurológicas multifocais extensas em região tálamo-cortical, tronco-encefálico e cerebelo. Importaneamente, lesões multifocais e no tronco encefálico são associadas a um tempo de sobrevida menor (MUÑANA; LUTTGEM, 1998). Neste cão, o transplante de Ad-MSCs não foi capaz de conter a rápida progressão das lesões multifocais.

O impacto da terapia baseada em MSCs na EAE, que apresenta semelhanças com a MUO (JEFFERY et al., 2017), tem sido amplamente estudado, com a maioria dos estudos relatando um potente efeito imunossupressor e imunomodulador (ANDERSON et al., 2017; GERDONI et al., 2007; RAFEI et al., 2009b; ZAPPIA et al., 2008). Na EAE progressiva, o transplante de MSCs gerou resultados positivos no início da doença ou no pico de gravidade da doença, mas não quando realizado tardiamente (ZAPPIA et al., 2008).

No presente experimento, embora o transplante de AT-MSCs tenha sido realizado na etapa crônica da doença, encontramos resposta positiva na maioria dos cães. Em estudo antecedente, cães com MUO refratários foram tratados com transplante de BM-MSCs autólogas, utilizando diferentes vias de administração (IA, IV e IT) (ZEIRA et al., 2015). Após os transplantes, os autores relataram melhora nas imagens de RM e sinais neurológicos na maioria dos cães (ZEIRA et al., 2015). Apesar disto, nós hipotetizamos que o transplante de Ad-MSCs no início do desenvolvimento da MUO poderia resultar em resposta terapêutica superior.

Ao analisarmos os resultados de ambos grupos experimentais no critério de resposta ao tratamento, observamos que o grupo cMSC apresentou melhores resultados, entretanto, além de estarem em diferentes etapas dos processos neuroinflamatório e neurodegenerativo, o número de cães deste grupo foi consideravelmente menor.

Todos os cães do grupo PAC (100%, 12/12) desenvolveram efeitos adversos durante o tratamento, enquanto em uma menor dos transplantes de Ad-MSCs e apenas pela via IT (66,7%, 4/6) produziu efeitos adversos, sendo a maioria leve e auto-limitante. Com o uso de imunomoduladores e imunossupressores, como a ara-C e corticosteroides, cães com MUO desenvolvem rotineiramente efeitos adversos dose-dependentes (CORNELIS; VOLK; DE DECKER, 2016a; JEFFERY, 2014; MENAUT et al., 2008; ZARFOSS et al., 2006). Por outro lado, raramente se relatam efeitos adversos após o transplante pelas vias IT e IV em humanos, sendo manifestados principalmente dor, cefaleia, hipertermia e distúrbios gastrointestinais leves (BOLTZE et al., 2015; HUR et al., 2016; KARUSSIS et al., 2010a; OH et al., 2018).

Por outro lado, nós observamos previamente que o transplante de MSCs alogênicas no LCR de cães saudáveis (n=5) pela cisterna cerebelomedular é segura. Não identificamos déficits no exame neurológico e alterações inflamatórias no LCR dos cães cinco dias pós-transplante e anormalidades nas imagens de RM após 12 meses (*Dados não publicados*).

Menos comumente, foi descrito microembolismo e tromboembolismo pulmonar pela via IV (BOLTZE et al., 2015). Anteriormente, em cães que receberam o transplante de MSCs alogênicas pela via IV (n = 3), apenas um apresentou efeitos adversos e não foram observadas alterações hematológicas (KANG; PARK, 2014).

As vias de transplante IT e IV podem ser consideradas para o tratamento em doenças neuroimunes. O principal mecanismo potencialmente envolvido com o transplante IT é a migração celular para a área lesionada, por meio do fornecimento das MSCs diretamente no LCR (KARUSSIS et al., 2010a). Por outro lado, a imunomodulação periférica é o mecanismo preponderante pela via IV (GERDONI et al., 2007; HARRIS et al., 2012; ZAPPAL et al., 2008), embora tenha sido relatado que MSCs fornecidas pela via IV migraram para o local da lesão na medula espinhal de cães, provavelmente devido a quebra da BHE (KIM et al., 2015).

No presente trabalho, ambas vias de transplante evidenciaram resposta terapêutica semelhante. Além disto, os transplantes de Ad-MSCs alogênicas demonstraram-se factíveis e tolerados pelas vias IT e IV. Dentro das limitações da via IT, se encontram a necessidade de anestesia geral e maior invasividade em comparação a via IV. Por outro lado, para o transplante IV é recomendável a administração de fluidoterapia devido ao risco de microembolização (ARZI et al., 2016; BOLTZE et al., 2015; CIERVO et al., 2017; DARSALIA et al., 2011; KIM et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

Em nosso conhecimento, o presente estudo foi o único a realizar dois transplantes de Ad-MSCs alogênicas em cães com MUO. Embora este não tenha sido um estudo controlado, expôs os potenciais benefícios da terapia com Ad-MSCs para a fase crônica da doença, com base na melhora dos déficits funcionais, imagens de ressonância magnética e parâmetros do líquido cefalorraquidiano.

Nós incluímos casos de MUO com base em critérios clínicos, sem a confirmação histopatológica do subtipo da doença, sendo impossível definir a natureza precisa da condição inflamatória que afetou cada cão. Entretanto, atualmente se reconhece que a biópsia do SNC é um exame invasivo que pode ser inviável em pacientes caninos críticos (COATES; JEFFERY, 2014). As limitações deste estudo são o pequeno número de cães transplantados com Ad-MSCs e a ausência de um estudo randomizado e duplo-cego.

Este é um estudo que demonstra resultados preliminares dos efeitos terapêuticos e limitações do transplante de Ad-MSCs alogênicas em cães com MUO e que poderia contribuir de modo translacional para os estudos de terapia celular na EM.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O ambiente inflamatório incrementa a expressão gênica de IDO, BDNF, GDNF e HGF e aumenta a secreção de IL-6 pelas Ad-MSCs caninas e a expressão de IDO e secreção de IL-8 pelas PMSCs caninas.

O transplante de Ad-MSCs alogênicas pelas vias IT e IV em cães com MUO demonstrou efeitos benéficos e demonstrou ser tolerável.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- ADAMO, P. F.; RYLANDER, H.; ADAMS, W. M. Ciclosporin use in multi-drug therapy for meningoencephalomyelitis of unknown aetiology in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 9, p. 486–496, 2007.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2005.
- AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. **The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value** *Nature Reviews Neuroscience*, 2002.
- 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 & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 304, 22 dez. 2020.
- ANDERSON, P. et al. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Self-Reactive T Cell Responses and Dendritic Cell Function. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1–15, 2017.
- ANDRZEJEWSKA, A.; LUKOMSKA, B.; JANOWSKI, M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. **STEM CELLS**, v. 37, n. 7, p. 855–864, jul. 2019.
- ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 252–60, 2014.
- ARGIBAY, B. et al. Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–17, 2017.
- ARZI, B. et al. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 75–86, 2016.
- BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS letters**, v. 307, n. 1, p. 97–101, 27 jul. 1992.
- BAI, L. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. **Glia**, v. 57, n. 11, p. 1192–1203, 2009.
- BAI, L. et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. **Nature Neuroscience**, 2012.
- BAILEY, C. S.; HIGGINS, R. J. Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 5, p. 1162–5, maio 1985.
- BARBER, R. M. et al. Identification of Risk Loci for Necrotizing Meningoencephalitis in Pug Dogs. **Journal of Heredity**, v. 102, n. 1, p. S40–S46, 2011.
- BARBER, R. M. et al. Broadly reactive polymerase chain reaction for pathogen detection in canine granulomatous meningoencephalomyelitis and necrotizing meningoencephalitis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 26, n. 4, p. 962–8, 2012.
- BARLOW, S. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, 2008.
- BARTNER, L. R. et al. Testing for Bartonella ssp. DNA in cerebrospinal fluid of dogs with inflammatory central nervous system disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1983–1988, 2018.
- 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, p. 4, 2015.
- BEN-AMI, E.; BERRIH-AKNIN, S.; MILLER, A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 7, p. 410–415, 2011.
- BERGLUND, A. K. et al. Immunoprivileged no more: Measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2017.
- BIBER, K.; OWENS, T.; BODDEKE, E. What is microglia neurotoxicity (Not)? **Glia**, v. 62, n. 6, p. 841–854, 2014.
- BITTERMANN, S. et al. Magnetic resonance imaging signs of presumed elevated intracranial pressure in dogs. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 1, p. 101–108, 2014.
- BOHN, A. A. et al. Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: a retrospective study. **Veterinary clinical pathology**, v. 35, n. 3, p. 315–20, 2006.
- BOLTZE, J. et al. The dark side of the force - constraints and complications of cell therapies for stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 6, 2015.
- CHANG, C.-J. et al. Placenta-Derived Multipotent Cells Exhibit Immunosuppressive Properties That Are Enhanced in the Presence of Interferon- γ . **Stem Cells**, v. 24, n. 11, p. 2466–2477, 2006.
- CHEN, J. et al. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1005–1011, 2001.
- CHERUBINI, G. B. et al. Characteristics of magnetic resonance images of granulomatous meningoencephalomyelitis in 11 dogs. **The Veterinary record**, v. 159, n. 4, p. 110–5, 2006.
- CHOW, L. et al. Mechanisms of Immune Suppression Utilized by Canine Adipose and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 26, n. 5, p. 374–389, 2017.
- CHUNG, D. J. et al. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 1, p. 66–75, 2012.
- CIERVO, Y. et al. Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, 2017.
- COATES, J. R. et al. Procarbazine as Adjunctive Therapy for Treatment of Dogs with Presumptive Antemortem Diagnosis of Granulomatous Meningoencephalomyelitis: 21 Cases (1998-2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 100–106, 2007.
- COATES, J. R.; JEFFERY, N. D. Perspectives on meningoencephalomyelitis of unknown origin. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 44, n. 6, p. 1157–85, nov. 2014.
- CONNICK, P. et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: An open-label phase 2a proof-of-concept study. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 2, p. 150–156, 2012.
- 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.

- CORCIONE, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367–372, 2006.
- CORDY, D. R. Canine granulomatous meningoencephalomyelitis. **Veterinary pathology**, v. 16, n. 3, p. 325–33, 1979.
- CORDY, D. R.; HOLLIDAY, T. A. A Necrotizing Meningoencephalitis of Pug Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 3, p. 191–194, 1989.
- CORNELIS, I. et al. Clinical presentation, diagnostic findings and outcome in dogs diagnosed with presumptive spinal-only meningoencephalomyelitis of unknown origin. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 3, p. 174–182, mar. 2017.
- CORNELIS, I. et al. Clinical presentation, diagnostic findings, prognostic factors, treatment and outcome in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin: A review. **The Veterinary Journal**, v. 244, p. 37–44, fev. 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, p. 147–147, 2016a.
- 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, p. 147–147, 6 ago. 2016b.
- CROOK, K. I. et al. The pharmacokinetics of cytarabine in dogs when administered via subcutaneous and continuous intravenous infusion routes. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 36, n. 4, p. 408–11, 2013.
- DAHBOUR, S. et al. Mesenchymal stem cells and conditioned media in the treatment of multiple sclerosis patients: Clinical, ophthalmological and radiological assessments of safety and efficacy. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 23, n. 11, p. 866–874, nov. 2017.
- DARSALIA, V. et al. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 235–242, 2011.
- DE WITTE, S. F. H. et al. Toward development of mesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, 2016.
- DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.
- DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 3, p. 422–431, 2006.
- DIAS, I. E. et al. Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2019.
- DJOUAD, F. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 8, p. 2025–32, ago. 2007.
- DOMBROWSKI, Y. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. **Nature Neuroscience**, v. 20, p. 674, 13 mar. 2017.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.
- DRAGO, D. et al. The stem cell secretome and its role in brain repair. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2271–2285, 2013.
- EARLY, P. J. et al. Plasma and serum concentrations of cytarabine administered via continuous intravenous infusion to dogs with meningoencephalomyelitis of unknown etiology. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 411–

414, ago. 2017.

ELEUTERI, S.; FIERABRACCI, A. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

ELIOPOULOS, N. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4057–4065, dez. 2005.

ELLWARDT, E.; ZIPP, F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. **Experimental Neurology**, v. 262, n. Part A, p. 8–17, 2014.

ENGLISH, K. et al. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, v. 110, n. 2, p. 91–100, jun. 2007.

FAIELLA, W.; ATOUI, R. Immunotolerant Properties of Mesenchymal Stem Cells: Updated Review. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

FARMER, D. Placental stem cells: The promise of curing diseases before birth. **Placenta**, p. 10–12, abr. 2017.

FISCHER, U. M. et al. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 5, p. 683–692, 2009.

FLEGEL, T. et al. Comparison of oral administration of lomustine and prednisolone or prednisolone alone as treatment for granulomatous meningoencephalomyelitis or necrotizing encephalitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 3, p. 337–345, 2011.

FREEDMAN, M. S. et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 16, n. 4, p. 503–510, 19 abr. 2010.

FRIESE, M. A.; SCHATTLING, B.; FUGGER, L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 4, p. 225–238, 2014.

GAO, S. et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 3, p. 366–375, 5 mar. 2014.

GERDONI, E. et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 3, p. 219–227, 2007.

GHANNAM, S. et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 302–312, 1 jul. 2010.

GHITZA, U. E. et al. **Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: A review** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 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. **The 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. 110–8, 2010.

GREGORY, C. R. et al. Leflunomide effectively treats naturally occurring immune-mediated and inflammatory diseases of dogs that are unresponsive to conventional therapy. **Transplantation proceedings**, v. 30, n. 8, p. 4143–8, 1998.

GU, Y. et al. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte.

Scientific Reports, v. 6, p. 1–16, 2016.

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.

HARRIS, V. K. et al. Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. **EBioMedicine**, v. 29, p. 23–30, 2018.

HEMEDA, H. et al. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Differentially Affect Cytokine Expression and Migration Properties of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 5, p. 693–706, maio 2010.

HIGGINS, R. J. et al. Necrotizing meningoencephalitis in five Chihuahua dogs. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 3, p. 336–346, 2008.

HOFSTETTER, H. H. et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, 2005.

HONG, J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8⁺ T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 5, p. 621–629, maio 2016.

HOU, Y. et al. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. **Cell Biology International**, v. 38, n. 9, p. 1050–9, maio 2014.

HSIAO, S. T.-F. et al. Comparative Analysis of Paracrine Factor Expression in Human Adult Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose, and Dermal Tissue. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 12, p. 2189–2203, 10 ago. 2012.

HUR, J. W. et al. Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 39, n. 6, p. 655–664, 2016.

HYUN, J.-W. et al. Utility of the Rio Score and Modified Rio Score in Korean Patients with Multiple Sclerosis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0129243, 26 maio 2015.

IN 'T ANKER, P. S. et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1338–1345, dez. 2004.

ISAKOVA, I. A. et al. Allo-Reactivity of Mesenchymal Stem Cells in Rhesus Macaques Is Dose and Haplotype Dependent and Limits Durable Cell Engraftment In Vivo. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87238, 29 jan. 2014.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. In: [s.l.] Philadelphia (Pa.) : Lea and Febiger, 1993.

JEFFERY, N. D. Corticosteroid Use in Small Animal Neurology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 44, n. 6, p. 1059–1074, 2014.

JEFFERY, N. D. et al. The Association of Specific Constituents of the Fecal Microbiota with Immune-Mediated Brain Disease in Dogs. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170589, 2017.

JUNG, D.-I. et al. Unsuccessful Cyclosporine plus Prednisolone Therapy for Autoimmune Meningoencephalitis in Three Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 12, p. 1661–1665, 2013.

JUNG, J. E.; KIM, G. S.; CHAN, P. H. Neuroprotection by Interleukin-6 Is Mediated by Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Antioxidative Signaling in Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 42, n. 12, p. 3574–3579, dez. 2011.

JURA, J.; SKALNIAK, L.; KOJ, A. Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCP1) is a novel multifunctional modulator of inflammatory reactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 10, p. 1905–1913, out. 2012.

KALINSKI, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E 2. **The Journal of**

Immunology, v. 188, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2012.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, p. 661, 890–894, 1997.

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

KANG, J. W. et al. Soluble Factors–Mediated Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 4, p. 681–694, ago. 2008.

KANG, M. H.; PARK, H. M. Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 16, 2014.

KARUSSIS, D. et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. **Archives of neurology**, v. 67, n. 10, p. 1187–94, 2010a.

KARUSSIS, D. et al. Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 10, p. 1187–1194, 1 out. 2010b.

KASSIS, I. et al. Neuroprotection and Immunomodulation With Mesenchymal Stem Cells in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 6, p. 753–761, 1 jun. 2008.

KEAN, T. J. et al. MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. **Stem Cells International**, v. 2013, 2013.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173–1175, 9 nov. 2007.

KERSCHENSTEINER, M.; MEINL, E.; HOHLFELD, R. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 51, n. 3, p. 197–216, 2010.

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

KIM, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 229, 2015.

KIPAR, A. et al. Immunohistochemical Characterization of Inflammatory Cells in Brains of Dogs with Granulomatous Meningoencephalitis. **Vet Pathol**, v. 35, p. 43–52, 1998.

KISIEL, A. H. et al. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305–1317, 2012.

KOL, A. et al. Th17 pathway as a target for Multipotent stromal cell therapy in dogs: Implications for translational research. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2016.

KREŠIĆ, N. et al. Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Transcriptome Composition Alterations: A Step towards Standardizing Therapeutic. **Stem Cells International**, 2017.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v. 33, n. 11, p. 1444–1452, 1983.

LAHIANI, A. et al. Human PLacental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF. **Biochimica et Biophysica**

Acta - Molecular Cell Research, v. 1853, n. 2, p. 422–430, 2015.

LALU, M. M. et al. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47559, 25 out. 2012.

LANKFORD, L. et al. Early gestation chorionic villi-derived stromal cells for fetal tissue engineering. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 1, p. 195–207, 2015.

LANKFORD, L. et al. Manufacture and preparation of human placenta-derived mesenchymal stromal cells for local tissue delivery. **Cytotherapy**, v. 19, n. 6, p. 680–688, 2017.

LANZA, C. et al. Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 5, p. 1674–1684, set. 2009.

LASSMANN, H.; BRADL, M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 223–244, 2017.

LAUBNER, S. et al. Magnetic resonance imaging signs of high intraventricular pressure - comparison of findings in dogs with clinically relevant internal hydrocephalus and asymptomatic dogs with ventriculomegaly. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 181, dez. 2015.

LE BLANC, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 10, p. 890–896, 2003.

LE, T. et al. Regulation of interleukin-10 gene expression: Possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. **Blood**, v. 89, n. 11, p. 4112–4119, 1997.

LEE, J. M. et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 219–224, 2012.

LEGLER, D. F.; THELEN, M. Chemokines: Chemistry, biochemistry and biological function. **Chimia**, v. 70, n. 12, p. 856–859, 2016.

LEIBACHER, J.; HENSCHLER, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 7, 11 dez. 2016.

LEOCANI, L.; ROCCA, M. A.; COMI, G. MRI and neurophysiological measures to predict course, disability and treatment response in multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 29, n. 3, p. 243–253, 2016.

LEWIS, M. J. et al. Clinical and Diagnostic Imaging Features of Brain Herniation in Dogs and Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1672–1680, 2016.

LI, A. et al. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3369–3376, 2003.

LI, C. et al. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. **Cell and Tissue Research**, v. 330, n. 3, p. 437–446, 8 nov. 2007.

LIN, T. et al. Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 277, 2017.

LONG, C. et al. Isolation and characterization of canine placenta-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of neurological disorders in dogs. **Cytometry Part A**, n. 3, p. 7–9, 2017.

LONG, C. et al. Isolation and characterization of canine placenta-derived mesenchymal

- stromal cells for the treatment of neurological disorders in dogs. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 82–92, 2018.
- LORENZ, M. D. **Handbook of Veterinary Neurology**. 5th. ed. [s.l.] Elsevier Saunders, 2011.
- LOWRIE, M. et al. Effect of a constant rate infusion of cytosine arabinoside on mortality in dogs with meningoencephalitis of unknown origin. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 213, p. 1–5, 2016.
- LOWRIE, M.; SMITH, P. M.; GAROSI, L. Meningoencephalitis of unknown origin: investigation of prognostic factors and outcome using a standard treatment protocol. **Veterinary Record**, v. 172, n. 20, p. 527–527, 2013.
- LUNA, A. C. L. et al. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 552, 2014.
- LYCK, R.; ENGELHARDT, B. Going Against the Tide – How Encephalitogenic T Cells Breach the Blood-Brain Barrier. **Journal of Vascular Research**, v. 49, n. 6, p. 497–509, 2012.
- MADRIGAL, J. L. M. et al. Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. **Journal of Neuroscience**, 2009.
- MANCARDI, G. L. et al. Autologous stem cell transplantation as rescue therapy in malignant forms of multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 11, n. 3, p. 367–371, 2005.
- MANCUSO, R. et al. Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression and activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. **PLoS ONE**, 2015.
- MANSOOR, S. R.; ZABIHI, E.; GHASEMI-KASMAN, M. The potential use of mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis. **Life Sciences**, v. 235, n. September, 2019.
- MARIA SPAGGIARI, G.; MORETTA, L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 27–31, 2013.
- MARTINEZ, F. O. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 13, p. 453, 2008.
- MARTINO, G. et al. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 5, p. 247–255, 2010.
- MASTROLIA, I. et al. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1135–1148, 16 nov. 2019.
- MATSUKI, N. et al. Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. **The Journal of veterinary medical science**, v. 66, n. 3, p. 295–7, 2004.
- MATYSIAK, M. et al. Stem cells ameliorate EAE via an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mechanism. **Journal of Neuroimmunology**, v. 193, n. 1–2, p. 12–23, 2008.
- MELIEF, S. M. et al. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 2, n. 6, p. 455–463, 2013.
- MENAUT, P. et al. Treatment of 11 dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin with a combination of prednisolone and cytosine arabinoside. **Veterinary Record**, v. 162, p. 241–245, 2008.
- MEYER-MOOCK, S. et al. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. **BMC Neurology**, 2014.
- MICHELUCCI, A. et al. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar

- amyloid-beta. **Journal of neuroimmunology**, v. 210, n. 1–2, p. 3–12, 29 maio 2009.
- MIX, E. et al. Animal models of multiple sclerosis-Potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 3, p. 386–404, 2010.
- MIYAKE, H. et al. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein as a Specific Marker for Necrotizing Meningoencephalitis in Pug Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 11, p. 1543–1545, 2013.
- MOMPARLER, R. L. Biochemical pharmacology of cytosine arabinoside. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 10, n. 1 S, p. 45–48, 1982.
- MOON, J. H. et al. A study of experimental autoimmune encephalomyelitis in dogs as a disease model for canine necrotizing encephalitis. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 2, p. 203–211, 2015.
- MUNANA, K. R.; LUTTGEN, P. J. Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 12, p. 1902–6, 1998.
- NAKAMURA, T.; MIZUNO, S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 6, p. 588–610, 2010.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499–3506, 2007.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Review in translational hematology Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Library**, v. 110, n. 10, p. 3499–3506, 2008.
- NEUPANE, M. et al. Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 6, p. 1007–1015, 2008.
- NIU, J. et al. Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14542–14551, 2008.
- NORONHA, N. D. C. et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 132, 2019.
- OH, K. W. et al. Repeated Intrathecal Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 84, n. 3, p. 361–373, 2018.
- OLIPHANT, B. J.; BARNES HELLER, H. L.; WHITE, J. M. Retrospective study evaluating associations between midline brain shift on magnetic resonance imaging and survival in dogs diagnosed with meningoencephalitis of unknown etiology. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 58, n. 1, p. 38–43, 2017.
- PAKOZDY, A. et al. Improved survival time in dogs with suspected GME treated with ciclosporin. **The Veterinary record**, v. 164, n. 3, p. 89–90, 2009.
- PARK, E. S.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Comprehensive immunohistochemical studies on canine necrotizing meningoencephalitis (NME), necrotizing leukoencephalitis (NLE), and granulomatous meningoencephalomyelitis (GME). **Vet Pathol**, 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.
- PARK, S. B. et al. Isolation and Characterization of Canine Amniotic Membrane-Derived Multipotent Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.
- PASTINA, B. et al. The pharmacokinetics of cytarabine administered subcutaneously, combined with prednisone, in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown etiology. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 5, p. 638–643, 2018.

- PAUL, G.; ANISIMOV, S. V. The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2246–2256, 2013.
- PEGORETTI, V. et al. Selective modulation of TNF-TNFRs signaling: Insights for multiple sclerosis treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–8, 2018.
- PODELL, M. et al. 2015 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Seizure Management in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 477–490, 2016.
- PRASANNA, S. J. et al. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9016, 2 fev. 2010.
- RAFEI, M. et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1799–1803, 2009a.
- RAFEI, M. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1799–1803, 2009b.
- ROBINSON, C. M.; HALE, P. T.; CARLIN, J. M. The Role of IFN- γ and TNF- α -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 25, n. 1, p. 20–30, jan. 2005.
- RUSSELL, K. A. et al. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, 2016.
- SANCHEZ, D. N. R. et al. Effects of Canine and Murine Mesenchymal Stromal Cell Transplantation on Peripheral Nerve Regeneration. **International Journal of Stem Cells**, p. 1–10, 2017.
- SAPAROV, A. et al. Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- SARESELLA, M. et al. Immunological and clinical effect of diet modulation of the gut microbiome in multiple sclerosis patients: A pilot study. **Frontiers in Immunology**, 2017.
- SATAKE, K.; LOU, J.; LENKE, L. G. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. **Spine**, v. 29, n. 18, p. 1971–1979, 2004.
- SCHATZBERG, S. J. et al. Polymerase chain reaction screening for DNA viruses in paraffin-embedded brains from dogs with necrotizing meningoencephalitis, necrotizing leukoencephalitis, and granulomatous meningoencephalitis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 4, p. 553–9, 2005.
- SCHATZBERG, S. J. Idiopathic Granulomatous and Necrotizing Inflammatory Disorders of the Canine Central Nervous System. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 40, n. 1, p. 101–120, 2010.
- SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.
- 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.
- SCOLDING, N. J. et al. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. **Brain**, v. 140, n. 11, p. 2776–2796, 2017.
- SCOTT-MONCRIEFF, J. C. R. et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of cytosine arabinoside in dogs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 1991.
- SEO, Y.; SHIN, T. H.; KIM, H. S. Current strategies to enhance adipose stem cell

- function: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, 2019.
- SHEBL, F. M. et al. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 19, n. 4, p. 978–981, 2010.
- SHIBUYA, M. et al. Autoantibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluids from Pug dogs with necrotizing meningoencephalitis. **The Journal of veterinary medical science**, v. 69, n. 3, p. 241–5, 2007.
- SMITH, P. M. et al. Comparison of two regimens for the treatment of meningoencephalomyelitis of unknown etiology. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 3, p. 520–6, 2009.
- SOLEYMANINEJADIAN, E.; PRAMANIK, K.; SAMADIAN, E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: Cytokines and factors. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 1, p. 1–8, 2012.
- SORMANI, M. P. et al. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, 2013.
- SORMANI, M. P. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis: A meta-analysis. **Neurology**, v. 88, n. 22, p. 2115–2122, 2017.
- SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annual review of immunology**, v. 23, n. 02, p. 683–747, 2005.
- SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Seminars in Neurology**, v. 36, n. 2, p. 115–127, 2016.
- SPAGGIARI, G. M. et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6576–6583, 2009.
- SPITZBARTH, I. et al. Immunohistochemical characterization of inflammatory and glial responses in a case of necrotizing leucoencephalitis in a french bulldog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2–3, p. 235–241, 2010.
- SPITZBARTH, I.; BAUMGÄRTNER, W.; BEINEKE, A. The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 147, n. 1–2, p. 6–24, 2012.
- STALIS, I. H. et al. Necrotizing Meningoencephalitis of Maltese Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 32, n. 3, p. 230–235, 1995.
- STRIOGA, M. et al. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 14, p. 2724–2752, 2012.
- SU, J. et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 3, p. 388–396, 25 mar. 2014.
- SUZUKI, M. et al. A Comparative Pathological Study on Canine Necrotizing Meningoencephalitis and Granulomatous Meningoencephalomyelitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 11, p. 1233–1239, 2003.
- 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.
- TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 87–113, 2008.
- THOMAS, J. B.; EGER, C. Granulomatous meningoence-phalomyelitis in 21 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 287–293, 1989.
- TIMMANN, D. et al. Necrotising encephalitis in a French bulldog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 339–342, 2007.

- TIPOLD, A. et al. Necrotizing encephalitis in Yorkshire terriers. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 12, p. 623–628, 1993.
- TISCHNER, D.; REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, n. 1–2, p. 62–70, 2007.
- TODA, Y. et al. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. **Veterinary Record**, v. 161, n. 8, p. 261–264, 25 ago. 2007.
- TORRENTE, Y.; POLLI, E. Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. **Cell Transplant**, v. 17, n. 10–11, p. 1103–1113, 2008.
- TZARTOS, J. S. et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 146–155, 2008.
- UCCELLI, A.; LARONI, A.; FREEDMAN, M. S. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 7, p. 649–656, 2011.
- UCCELLI, A.; MANCARDI, G. Stem cell transplantation in multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 23, n. 3, p. 218–225, 2010.
- UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European journal of immunology**, v. 36, n. 10, p. 2566–73, 2006.
- UCHIDA, K. et al. Pathological and immunological features of canine necrotising meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalitis. **Veterinary Journal**, v. 213, p. 72–77, 2016.
- VERNAU, W.; VERNAU, K. A.; SUE BAILEY, C. Cerebrospinal Fluid. In: ELSEVIER (Ed.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th. ed. San Diego, California: Elsevier Inc., 2008. p. 769–819.
- VIEIRA, N. M. et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, 2010.
- VIGO, T. et al. IFN β enhances mesenchymal stromal (Stem) cells immunomodulatory function through STAT1-3 activation and mTOR-associated promotion of glucose metabolism. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, 2019.
- VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.
- VOJNITS, K.; LI, Y. The current knowledge of immune privilege in stem cells. **Journal of Transplantation & Stem Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2014.
- WANG, A. et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 4, n. 6, p. 659–669, 2015.
- WEISHAUPT, N.; BLESCH, A.; FOUAD, K. **BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury** *Experimental Neurology*, 2012.
- WILLIS, C. M. et al. The neural stem cell secretome and its role in brain repair. **Brain Research**, v. 1729, n. September 2019, p. 146615, 2020.
- WINGERCHUK, D. M.; CARTER, J. L. Multiple sclerosis: Current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 2, p. 225–240, 2014.
- WONG, M. A et al. Evaluation of treatment with a combination of azathioprine and prednisone in dogs with meningoencephalomyelitis of undetermined etiology: 40 cases (2000-2007). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 237, n. 8,

p. 929–935, 2010.

WOOLCOCK, A. D. et al. Treatment of canine meningoencephalomyelitis of unknown aetiology with mycophenolate mofetil and corticosteroids: 25 cases (2007-2012). **Veterinary Medicine and Science**, v. 2, n. 2, p. 125–135, 2016.

YAMOUT, B. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: A pilot study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 227, n. 1–2, p. 185–189, 2010.

YANG, H.-M. et al. Canine mesenchymal stem cells treated with TNF- α and IFN- γ enhance anti-inflammatory effects through the COX-2/PGE2 pathway. **Research in Veterinary Science**, v. 119, n. October 2017, p. 19–26, 2018.

YOUSEFI, F. et al. Various strategies to improve efficacy of stem cell transplantation in multiple sclerosis: Focus on mesenchymal stem cells and neuroprotection. **Journal of Neuroimmunology**, v. 328, n. October 2018, p. 20–34, 2019.

ZANGI, L. et al. Direct Imaging of Immune Rejection and Memory Induction by Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2865–2874, 2009.

ZAPPIA, E. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. v. 106, n. 5, p. 1755–1761, 2008.

ZARFOSS, M. et al. Combined cytosine arabinoside and prednisone therapy for meningoencephalitis of unknown aetiology in 10 dogs. **The Journal of small animal practice**, v. 47, n. 10, p. 588–95, 2006.

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. 181, 2015.

ZETTL, U. K.; STÜVE, O.; PATEJDL, R. Immune-mediated CNS diseases: A review on nosological classification and clinical features. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 3, p. 167–173, 2012.

ZHAN, X. S. et al. A comparative study of biological characteristics and transcriptome profiles of mesenchymal stem cells from different canine tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, 2019.

ZHANG, C. et al. Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Cytotherapy**, v. 11, n. 3, p. 299–306, jan. 2009.

ZHANG, H. LIAN et al. Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats. **Brain Research**, v. 1680, p. 143–154, 2018.

ZHANG, J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 1, p. 16–26, 2005.

ZUK P.A., ZHU M., MIZUNO H., HUANG J., ET AL. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

ANEXOS

(A) Fármacos administrados nos cães dos grupos PAC e cMSC em associação com o respectivo tratamento

Cão	Fármacos administrados a longo-prazo (> 14 dias)		
	Pré-tratamento	Grupo PAC	Grupo cMSC
1	PB	LEV; OME; PB; RAN	
2	Arac-C; KBr, PB	KBr; LEV; PB	
3	Sem tratamento concomitante	PRAZ	
4	PRED (1 mg/kg q. 12h V.O.); TRD	GABAP; OME; TRD	GABAP; PRED (0,25 mg/kg q. 72h V.O.)
5	AZA; PRED (1,5 mg/kg q. 12h V.O.)	ACZ; GABAP; RAN	ACZ; GABAP; PRED (0,25 mg/kg q. 12h V.O.)
6	LEV; PB; PRED (2 mg/kg q. 12h V.O.)	LEV; PB	
7		OME	FURO; OME; PRED (0,5 mg/kg q. 12 horas V.O.)
8	PRED (1,5 mg/kg q. 12h V.O.)	KBr; LEV; OME; RAN; SCF	KBr; LEV
9	PRED (1,5 mg/kg q. 12h V.O.)	OME	
10	PRED (1,5 mg/kg q. 12h V.O.)	n/a	PRED (0,7 mg/kg q. 12h V.O.)
11	Sem tratamento concomitante	OME; SCF; TRD	
12	PRED (2 mg/kg q. 12h V.O.)	OME	

Fármacos administrados no pré-tratamento/transplante e a longo prazo (> 14 dias), com exceção de antibióticos, para os cães dos grupos PAC e cMSC. Os medicamentos foram administrados concomitantemente ao tratamento recebido (grupo PAC, citarabina e prednisona; grupo cMSC, transplante de Ad-MSCs). ACZ, acetazolamida; Ara-C, citarabina; AZA, azatioprina; FURO, furosemida; GABAP, gabapentina; KBr, brometo de potássio; LEV, levetiracetam; OME, omeprazol; PB, fenobarbital; PRAZ, prazosina; PRED, prednisona; RAN, ranitidina; SCF, sucralfato; TRD, tramadol. n/a, não se aplica (não pertencente ao grupo). A dose de prednisona foi exibida para demonstrar se utilizada como anti-inflamatório ou imunossupressor (>1mg/kg imunossupressor; <1mg/kg anti-inflamatório). Os quadros cinzas sinalizam os cães incluídos no grupo cMSC.

(B) Escala de Déficit Neurológico (EDN)

FUNÇÃO OU SINAL CLÍNICO	PONTUAÇÃO	TOTAL
1. ESTADO MENTAL		
Sem alterações	0	
Deprimido	2	
Semicomatoso	3	
Comatoso	4	
2. FUNÇÕES CEREBRAIS		
Sem alterações	0	
Pleurotótono	1	
Cegueira central	2	
Comportamento anormal	3	
Delírio/desorientação	4	
Crises Epilépticas		
Ausente	0	
Focais	1	
Generalizadas ou focais com generalização secundária	2	
Seriadas	3	
Estado epiléptico	4	
3. FUNÇÕES DO TRONCO CEREBRAL		
Sem alterações	0	
Lesão em NC II ou III	Unil. 1 Bil. 2	
Lesão em NC IV-V	Unil. 2 Bil. 3	
Lesão em NC VI-XII	Unil. 3 Bil. 4	
4. FUNÇÕES CEREBELARES		
Sem alterações	0	
Ampla base	1	
Dismetria	2	
Tremor de intenção	3	
5. FUNÇÕES MOTORAS		
Sem paresia	0	
Hemi/paraparesia ambulatória; monoparesia	1	
Hemi/paraparesia não-ambulatória, tetraparesia ambulatória ou monoplegia	2	
Hemi/paraplegia ou tetraparesia não-ambulatória	3	
Tetraplegia	4	
Sem ataxia	0	
Ataxia/déficits proprioceptivos leve (hemi/para/mono)	1	
Ataxia/déficits proprioceptivos moderada (hemi/para/mono) e tetrataxia leve	2	
Ataxia/déficits proprioceptivos grave (hemi/para/mono) e tetrataxia moderada	3	
Tetrataxia grave	4	
6. FUNÇÕES SENSITIVAS		
Sem alterações	0	
Hipalgesia a estimulação dolorosa superficial (tetra/hemi/para/mono)	1	
Analgesia a estimulação dolorosa superficial (tetra/hemi/para/mono)	2	
Hipalgesia a estimulação dolorosa profunda (tetra/hemi/para/mono)	3	
Analgesia a estimulação dolorosa profunda (tetra/hemi/para/mono)	4	
Hiperestesia a palpação epaxial não dolorosa	1	
Alodínia	2	
7. FUNÇÕES URINÁRIAS		
Sem alterações	0	
Incontinência/retenção urinária intermitente	1	
Incontinência/retenção urinária constante (urina com massagem da bexiga)	2	
Incontinência/retenção urinária com necessidade de cateterização permanente	3	
8. DISTÚRBIOS DO MOVIMENTO		
Sem alterações	0	
Movimentos involuntários leves	1	
Movimentos involuntários moderados	2	
Movimentos involuntários graves	3	
SOMATÓRIA:		

NC, nervos cranianos.

(C) Idade, sexo, raça, tempo até o diagnóstico e sinais neurológicos dos cães do grupo PAC e cMSC.

Cão	Idade	Sexo	Raça	TD (dias)	Sinais neurológicos	
					Grupo PAC	Grupo cMSC
1	5	M	SRD	210	Crises epilépticas focais, generalizadas tônico-clônicas e seriadas	
2	1,7	M	Maltês	91	Crises epilépticas focais, generalizadas tônico-clônicas e seriadas, status epilepticus	
3	2,6	M	Yorkshire Terrier	17	Déficits proprioceptivos graves, nocicepção ausente em membros pélvicos, hiperestesia em região torácica a palpação espinal, reflexos miotáticos alterados, hipertonia, retenção urinária	
4	7	M	Shih Tzu	7	Déficits proprioceptivos graves, nocicepção diminuída nos quatro membros, hiperestesia em região cervical e cervico-torácica a palpação espinal, reflexos miotáticos alterados, hiper/hipotonia, retenção urinária	Déficits proprioceptivos moderados, hiperestesia em região cervical a palpação espinal, reflexos miotáticos alterados, hiper/hipotonia
5	3,8	M	Yorkshire Terrier	330	Déficits proprioceptivos moderados, paresia, desvio de cabeça, tremor de intenção, dismetria, balanço do tronco, base ampla, estrabismo, nistagmo, hiper/hipotonia	Déficits proprioceptivos graves, paresia, desvio de cabeça, tremor de intenção, dismetria, balanço do tronco, base ampla, estrabismo, nistagmo, hiper/hipotonia

6	4	F	Pug	90	Alterações comportamentais, déficits proprioceptivos moderados, paresia, desvio de cabeça, estrabismo, assimetria facial e da língua	
7	2,5	F	Yorkshire Terrier	30	Alterações comportamentais, andar em círculos, desvio de cabeça, rolamento, déficits proprioceptivos, dismetria, midríase, estrabismo, nistagmo, base ampla, ausência de resposta à ameaça	Alterações comportamentais, andar em círculos, desvio de cabeça, rolamento, déficits proprioceptivos, dismetria, midríase, estrabismo, nistagmo, base ampla, ausência de resposta à ameaça, opistótono, depressão
8	3	F	Shih Tzu	90	Depressão, crises epiléticas focais, generalizadas tônico-clônicas e seriadas, status epilepticus	Depressão, crises epiléticas focais, generalizadas tônico-clônicas e seriadas, status epilepticus
9	2	F	Shih Tzu	30	Depressão, desvio de cabeça, andar em círculos, déficits proprioceptivos, paresia, estrabismo	
10	4	M	Bulldogue Francês	30	Alterações comportamentais, déficits proprioceptivos, paresia, hiperestesia das regiões cervical e torácica a palpação espinhal	Alterações comportamentais, déficits proprioceptivos, paresia, hiperestesia das regiões cervical e torácica a palpação espinhal
11	6	M	Yorkshire Terrier	30	Alterações comportamentais, cegueira central, paresia, hiperestesia cervical a palpação espinhal	
12	6	M	Chihuahua	15	Depressão, déficits proprioceptivos graves, paresia, andar em círculos, inclinação da cabeça, estrabismo, rolamento, reflexos palpebral e oculocefálico ausentes, resposta à ameaça ausente	

Características dos cães e sinais neurológicos no momento pré-tratamento/transplante para os grupos PAC e cMSC. TD, tempo desde os sinais clínicos serem notados pela primeira vez até o diagnóstico. Os quadros cinzas sinalizam os cães incluídos no grupo cMSC.

(D) Características das imagens de ressonância magnética no pré-tratamento e aos 80 dias pós-tratamento do grupo PAC

Cão	M	Nº LES	NL	T1-W	T1-W C+	T2-W	FLAIR	EFM	V/H	EDM	HER
1	Pré	Focal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Não	Sim	Não	Não
	80d	Sem lesões	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Sim	N/a	Não
2	Pré	Focal	CE	HIPO	Não	HIPER	HIPER	Não	Sim	Não	Não
	80d	Sem lesões	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Sim	N/a	Não
3	Pré	Multifocal	T3-L3	ISO	Não	HIPER	HIPER	Sim	N/a	Sim	N/a
	80d	Multifocal	T3-L3	ISO	Não	HIPER	HIPER	Não	N/a	Não	N/a
4	Pré	Multifocal	C1-C5 e C6-T2	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	N/a	Sim	N/a
	80d	Multifocal	C1-C5	ISO	Não	HIPER	HIPER	Não	N/a	Não	N/a
5	Pré	Multifocal	TE e CL	ISO/HIPO	Não	HIPER	HIPER/HIPO	Sim	Sim	Sim	Sim SFAL
	80d	Multifocal	TE e CL	ISO/HIPO	Não	HIPER	HIPER/HIPO	Sim	Sim	Sim	Sim SFAL
6	Pré	Multifocal	CE, CL	ISO/HIPO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Sim (SFAL)
	80d	Não realizado (óbito)									
7	Pré	Multifocal	CE, TAL, TE, CE, C1-C5	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Sim FM
	80d	Multifocal	CE, TAL, TE, CE, C1-C5	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Sim FM

8	Pré	Focal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Não	Sim	Não	Não
	80d	Focal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Não	Sim	Não	Não
9	Pré	Multifocal	CE e TE	HIPO	Não	HIPER	HIPER	Não	Não	Não	Não
	80d	Não realizado (óbito)									
10	Pré	Multifocal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Não
	80d	Multifocal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Não
11	Pré	Multifocal	CE e C1-C5	ISO	Não	HIPER	HIPER	Não	Não	Sim	Não
	80d	Multifocal	CE e C1-C5	ISO	Não	HIPER	HIPER	Não	Não	Sim	Não
12	Pré	Multifocal	CL e TE	ISO	Não	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Não
	80d	Focal	TE	ISO	Não	HIPER	HIPER	Não	Sim	Sim	Não

M, momento. N° LES, número de lesões no(s) segmento(s) estudado(s) (sem lesões, focal ou multifocal). NL, neurolocalização das lesões (CL, cerebelo; CB, cérebro (substâncias branca e/ou cinzenta cerebrais)); TL, tálamo; TE, tronco encefálico (mesencefalo, ponte e/ou bulbo); segmentos medulares C1-C5, C6-T2 e T3-L3). T1-W, tempos ponderados em T1; T1-W C+, captação de contraste em tempos ponderados em T1; T2-W, tempos ponderados em T2; FLAIR, imagens de recuperação de inversão atenuada por fluidos. Intensidade de sinal na sequência estudada (iso, isointenso; hipo, hipointenso; hiper, hiperintenso). Pré, pré-transplante. 80d, 80 dias pós-transplante. EFM, presença de efeito de massa. V/H, presença de ventriculomegalia/hidrocefalia. EDM, presença de edema perilesional. HER, presença de herniação do encéfalo (FM, forame magno; SFAL, subfalcina). N/a - Não se aplica para a sequência estudada.

(E) Características das imagens de ressonância magnética pré-transplante e 80 dias pós-transplante do grupo cMSC

Cão	M	Nº LES	NL	T1-W	T1-W C+	T2-W	FLAIR	EM	V/H	EDM	HER
4	Pré	Multifocal	C1-C5	ISO	Não	HIPER	HIPER	Sim	N/a	Sim	N/a
	Não realizado (óbito)										
5	Pré	Multifocal	TE e CL	ISO/HIPO	Não	HIPER	HIPER/HIPO	Sim	Sim	Sim	Sim SFAL
	80d Pós	Multifocal	TE e CL	ISO/HIPO	Não	HIPER	HIPER/HIPO	Sim	Sim	Sim	Sim SFAL
7	Pré	Multifocal	CE, TAL, TE, CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Sim FM
	Não realizado (óbito)										
8	Pré	Multifocal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Não	Sim	Sim	Não
	80d Pós	Multifocal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Não	Sim	Sim	Não
10	Pré	Multifocal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Não
	80d Pós	Multifocal	CE	ISO	Sim	HIPER	HIPER	Sim	Sim	Sim	Não

M, momento. Nº LES, número de lesões no(s) segmento(s) estudado(s) (sem lesões, focal ou multifocal). NL, neurolocalização das lesões (CL, cerebelo; CB, cérebro (substâncias branca e/ou cinzenta cerebrais)); TL, tálamo; TE, tronco encefálico (mesencefalo, ponte e/ou bulbo); segmentos medulares C1-C5, C6-T2 e T3-L3). T1-W, tempos ponderados em T1; T1-W C+, captação de contraste em tempos ponderados em T1; T2-W, tempos ponderados em T2; FLAIRR, imagens de recuperação de inversão atenuada por fluidos. Intensidade de sinal na sequência estudada (iso, isointenso; hipo, hipointenso; hiper, hiperintenso). Pré, pré-transplante. 80d Pós, 80 dias pós-transplante. EFM, presença de efeito de massa. V/H, presença de ventriculomegalia/hidrocefalia. EDM, presença de edema perilesional. HER, presença de herniação do encéfalo (FM, forame magno; SFAL, subfalcina). N/a - Não se aplica para a sequência estudada.

(F) Análise do líquido cefalorraquidiano do pré-tratamento e 80 dias pós-tratamento dos grupos PAC e cMSC.

Cão	Grupo PAC								Grupo cMSC							
	Pré-tratamento				80 dias pós-tratamento				Pré-tratamento				80 dias pós-tratamento			
	ER (cél/s/μL)	CTCN (cél/s/μL)	PT (mg/dL)	LCR	ER (cél/s/μL)	CTCN (cél/s/μL)	PT (mg/dL)	LCR	ER (cél/s/μL)	CTCN (cél/s/μL)	PT (mg/dL)	LCR	ER (cél/s/μL)	CTCN (cél/s/μL)	PT (mg/dL)	LCR
1	33	100	24,0	INF	36	0,0	40,3	INF								
2	2,1	1,1	11,8	N-INF	1	0,0	14,9	N-INF								
3	1	6,0	22,8	INF	30	2,0	21,4	N-INF								
4	7	198,0	74,3	INF	1	18,0	22,1	INF	6	12,0	19,1	INF	Não realizado (retirado do estudo)			
5	56	8,0	27,4	INF	63	1,0	57,8	INF	63	1,0	57,8	INF	3	0,0	27,8	INF
6	1	40	63,4	INF	Não realizado (óbito)											
7	23.250 E:0	0,0	78,8 E:32	INF	1	1,0	35,0	INF	1	1,0	35,0	INF	Não realizado (óbito)			
8	10	1	40	INF	7.850*	96,8 E:81,1	29 E = 13,3	INF	7.850*	96,8 E:81,1	29 E:13,3	INF	2	5,0	24,8	INF
9	2	16,8	11	N-INF	Não realizado (óbito)											
10	86	49,7	19	INF	3	6,0	13,3	INF	3	6,0	13,3	INF	2	1,0	36	INF
11	421	37,0	55,3	INF	3	3,0	17,3	N-INF								
12	900*	2,0 E:1	70,0 E:69	INF	9.000	2,0 E:0,0	91,3 E: 71,2	INF								

CTCN (contagem total de células nucleadas): pleocitose ausente 0-4 células/μl; concentração normal de proteínas <25 mg/dl; Eritrócitos (número): Considerou-se contaminação com eritrócitos se >500 eritrócitos/μl. (E) Estimou-se o número de céls. nucleadas ou concentração de proteínas subtraindo-se 1 cél. ou 1 mg/dL proteínas para cada 500 eritrócitos. INF, LCR inflamatório. N-INF, LCR não-inflamatório. Os quadros cinzas sinalizam os cães incluídos no grupo cMSC.

9 TRABALHO CIENTÍFICO

9 TRABALHO CIENTÍFICO

“STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE”

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

<https://stemcells.journals.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/21576580/about/information-for-authors#> RefHeading 1861 229511628

TITLE PAGE

MANUSCRIPT TYPE: Original Research Article

TITLE: Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Transplantation for The Treatment of Canine Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin

RUNNING HEAD: Canine Mesenchymal Stem Cells for Dogs with Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin

NAME OF AUTHORS: Giovana B. Sánchez^a, Diego N. Rodríguez-Sánchez^a, Márcio de Carvalho^a, Marjorie M^b. Golim, Elenice Deffune^b, Vânia, M. V. M.^c, Regina K. Takahira^a, Rogério M. Amorim^a.

^aDepartment of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, 18618-681-Botucatu, SP, Brazil.

^bBlood Transfusion Center, Cell Engineering Laboratory, Botucatu Medical School, São Paulo State University 18618-687-Botucatu, SP, Brazil.

^cDepartment of Reproduction and Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, 18618-681-Botucatu, SP, Brazil.

Correspondence: Rogério M. Amorim, DVM, PhD, Associate Professor, Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State

University (UNESP), Professor Doutor Walter Mauricio Correia Street, UNESP, 18618-681-Botucatu, SP, Brazil. Fax: (55) 1438152343. E-mail: rogerio.amorim@unesp.br

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Giovana B. Sánchez: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript. Diego N. R. Sánchez: collection and interpretation of data, data acquisition and manuscript writing, final approval of manuscript. Márcio de Carvalho: collection of data, final approval of manuscript. Marjorie A. Golim: collection of data, final approval of manuscript. Vânia V. M. Machado: collection of data. Regina K. Takahira: collection of data, final approval of manuscript. Elenice Deffune: collection of data, provision of study material. Rogério M. Amorim: conception and design, administrative support, provision of study material or patients, data analysis and interpretation, final approval of manuscript.

KEYWORDS: Cell- and Tissue-Based Therapy, Demyelinating Autoimmune Diseases (CNS), Interleukins, Meningoencephalitis, Myelitis, Neuroimmunomodulation

ABSTRACT

Canine meningoencephalomyelitis of unknown origin (MUO) is an immune-mediated neuroinflammatory disease, highly debilitating, with poor prognosis and therapeutic failure. Mesenchymal stem cells (MSCs) are promising for the treatment of neuroimmune diseases. Different sources may present differences in the immunomodulatory/neuroprotective potential. *In vitro*, we evaluated the gene expression (BDNF, GDNF, HGF, IDO, IL-10 and PTGES2) and the secretory profile (IL-2, IL-6, IL-18, IL-10, GM-CSF and MCP- 1) of canine MSCs derived from adipose tissue (Ad-MSCs) and placenta (PMSCs) after priming with pro-inflammatory cytokines INF- γ alone and combined INF- γ and TNF- α . *In vivo*, we evaluated the clinical response to allogeneic Ad-MSCs transplantation in dogs with MUO. PAC group: 12 dogs treated with immunosuppressant cytarabine (ara-C) and prednisone. cMSC group: 5 dogs of PAC group with therapeutic failure were treated with 2.5×10^6 /kg Ad-MSCs by intrathecal (IT) (n = 6) or intravenous (IV) (n = 3) delivery routes (40 days of interval). Functional recovery and the reduction of inflammatory lesions by magnetic resonance

imaging (MR) and cerebrospinal fluid (CSF) were evaluated. *In vitro*, there was significant increase of BDNF, GDNF, HGF and IDO expression by Ad-MSCs after priming and expression of IDO after combined priming by PMSCs. Ad-MSCs had a significant increase in the secretion of IL-6 and PMSCs of IL-8 after priming. *In vivo*, a trend towards functional improvement was observed in both groups after treatment. In the cMSC group, most dogs had partial remission and mild adverse events were observed in 4/6 animals after IT transplantations, being absent by IV. Clinical and laboratory variables showed no statistical differences. Allogeneic Ad-MSCs transplantation demonstrated beneficial effects in dogs with MUO.

INTRODUCTION

Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin (MUO) is one of the most common causes of inflammatory disease of the central nervous system (CNS) of dogs ^{1,2} and is characterized by a group of non-infectious diseases with a suspected autoimmune basis that have similar neurological signs and distinct histopathological characteristics ¹. The neurological lesions cause progressive clinical signs of meningoencephalitis, meningoencephalomyelitis or meningomyelitis, often causing severe disability or death ¹⁻³.

MUO has been correlated with multiple sclerosis (MS) in several aspects, as both have similar immunopathogenic, clinical and radiological characteristics ⁴⁻⁸. The autoimmune origin of MUO is assumed by the identification of inflammatory cells that express major histocompatibility complex class II (MHC-II) and the predominance of CD3⁺ T cells in the CNS ^{4,5,9}. Moreover, the pro-inflammatory cytokine IL-17, usually related to autoimmune diseases in humans and MS ^{10,11}, was found to be evolved with the infiltrating macrophages/microglia within the inflamed tissue of dogs affected by the histopathological subtypes of MUO ⁹. Also similarly to MS that presents a genetic background ¹², genomic analyzes identified genetic risk factors associated for the histopathological subtypes of MUO ^{4,13,14}. Nonetheless, environmental factors and gut microbiota are probably also important to the development of MUO ^{1,7} and MS ¹².

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the major animal model of neuroinflammation for MS studies ^{15,16}, however, it does not encompass all features of MS as it tends to target a specific immune response ¹⁵. Therefore, the spontaneous appearance of MUO associated with the similarities between the human and canine

diseases may be advantageous for the use of the canine model as a natural model for MS treatment studies ⁴⁻⁸.

Immunosuppression is the main treatment for MUO which is based on the use of high doses of corticosteroids usually associated with adjunct immunomodulatory drugs³. However, the therapeutic effects may be temporary or ineffective in the long term^{2,17-21} and can cause several adverse events ²². In MS, although treatment has considerably advanced with disease-modifying therapies (DMTs), there is currently no approved drug capable of effectively preventing, reversing or stabilizing the progressive phase that affects severe or progressive MS subtypes ²³. Mesenchymal stem cells (MSCs)-based therapy exhibit potential for the treatment of neuroimmune diseases ^{24,25}. In addition to modulate innate and adaptive immune systems, MSCs stimulate the regenerative microenvironment mediated by paracrine secretion of neurotrophic factors, cytokines and exosomes that promote angiogenesis, neurogenesis, astrocyte activation, synaptogenesis, anti-apoptotic effects on neurons and glial cells ²⁶⁻²⁹.

Under an inflammatory environment, MSCs acquire an immunosuppressive phenotype and increase their proliferation and survival ³⁰. MSCs activation can be achieved through *in vitro* priming with pro-inflammatory cytokines, such as interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), predominant cytokines in the neuroinflammatory environment of dogs with MUO and humans with MS ^{9,31-33}. Preliminary observations with human MSCs indicate that immunomodulatory properties differ among cell sources ³⁴. To our knowledge, few studies showed the expression and secretion of soluble factors after priming by canine MSCs sources ³⁵⁻³⁸.

We hypothesized if canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (Ad-MSCs) and placenta-derived mesenchymal stromal cells (PMSCs) express and secrete soluble factors *in vitro* after direct priming with the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and IFN- γ combined with TNF- α . We also hypothesized if allogeneic canine Ad-MSCs (non-primed) promote clinical functional recovery and improve inflammation in MR scanning and cerebrospinal fluid parameters in dogs with MUO refractory to the immunosuppressive treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animal Welfare

All *in vitro* and *in vivo* studies were carried out according to institutional guidelines of the ethics committee for animal research (CEUA) of São Paulo State University (UNESP/Botucatu), accepted protocol number 0056/2018. Full informed client consent was obtained for all procedures involving dogs.

In vitro Study

Canine Ad-MSCs and PMSCs Isolation

Canine adipose tissue (n = 4) was obtained from subcutaneous fat from healthy donors that undergone routine abdominal surgery. Ad-MSC were isolated as previously described, with modifications^{39,40}. Briefly, 1g of adipose tissue was minced and digested at 37 °C for 30 min using 0.1% type I collagenase (Sigma Aldrich, San Pablo, SP, Brazil). The trypsin dissociation was quenched with 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and 10% fetal bovine-serum (FBS) (all from Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, NE, USA). Then, centrifugation was performed, and conditioned media was filtered using a 70 µm filter to remove the remaining lipid layer. Finally, the cell pellet was washed before being plated onto tissue culture flasks in standard medium followed by incubation.

Canine placental tissues were collected from healthy female donors after the completion of regularly scheduled caesarean (n = 3). PMSCs were isolated as previously described³⁶. In brief, the central band of placental tissue was mechanically dissected into 0.5-1 cm pieces and enzymatically dissected with 0.25% trypsin and followed incubation for 30 min at 37°C. Trypsin was quenched with the addition of DMEM containing 10% FBS. Suspension was collected and centrifuged, and the conditioned media removed and discarded. Then, the pellet was incubated with 5 mL of collagenase IA (1 mg/mL) for 45 min at 37°C and diluted with the addition of DMEM containing 10% FBS. Another centrifugation was performed, and the conditioned media was discarded. Finally, the pellet was resuspended in standard medium, plated and incubated.

Standard medium from all experiments contained DMEM, 10% SFB, 100 units/mL of penicillin, 100 units/mL of streptomycin and 250 µg/mL of amphotericin B (all from Life Technologies Corporation, Grand Island, NE, USA). When plates were roughly 80% confluent cells, Ad-MSCs and PMSCs were cryopreserved in passages P1-P3 in a freeze media composed of FBS and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, San Pablo, SP, Brazil) and thawed for subsequent experiments.

Canine Ad-MSCs and PMSCs Differentiation and Flow Cytometric Immunophenotyping

Adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation of Ad-MSCs and PMSCs in passages P2-P3 were induced following manufacturer's instructions (StemPro® Adipogenesis, Osteogenic and Chondrogenic Differentiation Kits Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, NE, USA).

Immunophenotyping assay of cells in P2-P3 was performed as described previously^{41,42}. Briefly, cells were fractioned into tubes containing approximately 1×10^5 cells and incubated with the following primary conjugated antibodies: CD 45 (PE Mouse anti-human, 554878), CD 106 (PE Mouse anti-rat, 559229), CD11b (APC Mouse anti-rat, 562102), CD90 (APC Mouse anti-human, 559869), HLA-DR (FITC, Mouse anti-human, 555560) (all BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA), CD44 (FITC Rat anti-mouse, 561859), CD34 (Ad-MSCs) (FITC Anti-human, 343604, Biolegend™, San Diego, CA, USA) or CD34 (PMSCs) (PE Mouse anti-dog, 559369, BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA) and isotypes PE (Mouse IgG1, 550617), APC (Mouse IgG1, 555751), and FITC (Mouse IgG2b, 555742) (all BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA). Analyzes were performed in the FACSCalibur® 4-color cytometer (Becton Dickinson Company, San Jose, CA, USA), standardizing a total of 2×10^4 events collected per tube. The results were analyzed using CellQuestPro® and FlowJo® software.

Priming of canine MSCs with IFN-γ and IFN-γ combined with TNF-α

Cryopreserved MSCs were thawed and culture expanded. When cells were approximately 80% confluent, the enzymatic protocol of trypsin was used to remove cells from the plates, that were resuspend in standard medium. Priming protocol was

used as previously described³⁷, with a few modifications. All lineages of Ad-MSCs and PMSCs were seeded at 1×10^5 per well of 24-well plate (growth area of $1,9 \text{ cm}^2$), with 0.75 mL total media volume per well. The cells were primed with IFN γ (50 ng/mL; canine recombinant IFN γ , Kingfisher, St. Paul, MN, USA) or a combined priming with IFN γ (50 ng/mL, Kingfisher, St. Paul, MN, USA) and TNF α (50 ng/mL, Kingfisher, St. Paul, MN, USA). Cells used as control received complete media only. MSCs were cultured for 96 hours and conditioned media were collected and cryopreserved at -80°C for soluble factors quantification. During collection of cells 400 μL of TRIzolTM (InvitrogenTM, ThermoFisher Scientific, San Pablo, SP, Brazil) were added onto each well and the cells were removed and cryopreserved at -80°C for the gene expression assay.

Ad-MSCs and PMSCs Gene Expression of Anti-Inflammatory Cytokines and Neurotrophic Factors

Gene expression of the following cytokines and neurotrophic factors were analyzed: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), hepatocyte growth factor (HGF), interleucin 10 (IL-10), prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PTGES2), and indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO).

Total RNA was extracted from cells using a hybrid method of TRIzolTM (InvitrogenTM, ThermoFisher Scientific, San Pablo, SP, Brazil), chloroform and the RNA Mini RNAeasyTM kit (Qiagen, San Pablo, SP, Brazil). Briefly, cells were homogenized in 1 mL of TRIzolTM and 0.2 ml of chloroform was added. Samples were incubated for 3 min and centrifuged. The aqueous phase was added into a new tube and an equal volume of ethanol 100% was added. Subsequently, samples were added to the Mini RNAeasyTM kit columns and manufacturer's instructions were followed.

Reverse transcription of total RNA was conducted in a 10 μL mixture using the Veriti 96 Well Thermal Cycler system (Applied BiosystemsTM, ThermoFisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). The cDNA obtained was diluted to a total volume of 110 μL . qPCR amplification of 2 μL of cDNA aliquots was then performed in the QuantStudioTM 12K Flex Real-Time PCR System (Applied BiosystemsTM, ThermoFisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). The canine primers used were drawn as stated in the GeneBank[®] database.

Secretory Profile of Soluble Factors from the Conditioned Media of Ad- MSCs and PMSCs

The concentrations of the following secreted soluble factors were quantified: granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). The soluble factors were quantified via the MILLIPLEX® multiplexed assay panel (CCYTOMAG-90K, Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany). The array was performed according to the manufacturer's instructions using MAGPIX® 200™ (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany) system. Collected images were quantified using Luminex xPONENT® 4.3 software and further plotting of standard curves and analysis was performed using MILLIPLEX® Analyst 5.1. software.

In vivo Study

Companion dogs included in this study were treated in the Neurology Service of São Paulo State University (UNESP/Botucatu). The inclusion criteria were: (1) evidence of focal or multifocal brain lesions during the neurological examination; (2) inflammatory changes in cerebrospinal fluid (CSF); (3) negative tests for endemic infectious diseases in the blood, urine and CSF (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Cryptococcus sp.*, *Anaplasma platys* and Distemper Virus); and (4) evidence of focal or multifocal intra-axial lesions in MR, as previously described^{3,43}.

Study Design and Canine Subjects

The study design is illustrated in Figure 1. Two experimental groups were obtained:

1. PAC group (n=12): Dogs with MUO treated with the protocol of cytosine arabinoside (ara-C) and prednisone (50 mg/m² subcutaneous every 12h for 2 consecutive days, then repeat every 21 days for 4 cycles or intravenous (IV) infusion at 200 mg/m² over 8h at same interval dose)^{2,44}.
2. cMSC group (n=5): Dogs of PAC group treated with two allogeneic Ad-MSCs transplantations due to the intermediate or absent response to immunosuppressive treatment.

For dogs with epilepsy, antiepileptic therapy was combined with immunosuppressive treatment. Control of epileptic seizures in our group of dogs was considered through measure of phenobarbital and potassium bromide serum dosage according to therapeutic range recommended by the International Veterinary Epilepsy Task Force Consensus ⁴⁵.

Ad-MSCs Treatment

All dogs of cMSC group received two intrathecal (IT) or IV transplantations of 2.5×10^6 cells/kg. The first transplantation was made right after the outcome results of PAC group, and the second was performed after 40 days. Dogs that could not be anesthetized (i.e. severe liver disease) received the Ad-MSCs transplantation following IV delivery route (Table 2).

Ad-MSCs in P2-P3 passages were prepared and the final *pellet* was washed several times before being suspended with 0.9% NaCl solution (IV transplantation) or Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco™, Life Technologies Corporation, Grand Island, NE, USA) (IT transplantation) and transferred to sterile glass vials. All dogs underwent general anaesthesia and intrathecal transplantation was performed immediately after CSF collection. The suspension containing the Ad-MSCs was aspirated with a sterile syringe and transplantation was performed in the anesthetized animal attaching the syringe to the catheter used to collect the CSF. The suspension was injected slowly (1 mL/min).

The IV transplantation was performed with the dog awake, after receiving fluid therapy with NaCL 0.9% (Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brazil) for at least 1 hour before transplantation. The fluid therapy was maintained during the transplantation and 12 hours after. The suspension containing the Ad-MSCs was removed from the glass vial and slowly transplanted (30 minutes/5mL aliquot) directly into the fluid therapy equipment.

Follow-Up

Neurological re-examination, complete blood count and serum biochemistry analyses were measured at 40 days and 80 days post-treatment in PAC and cMSC groups. The

analysis of MR scan and CSF were performed at 80 days post-treatment in PAC and cMSC groups. The occurrence of adverse events was recorded during all treatments.

Functional Recovery

To assess functional recovery, a scoring scheme was designed (Neurological Deficit Scale, EDN, Appendix 1) and applied to the results of the neurological examination for both groups.

MR Scanning

MR scan of the brain and spine was performed under general anesthesia. Midazolam (0.5 mg/kg, IV; Dormium®, União Química, Brazil) was used for premedication and propofol (6 mg/kg, IV; Profolen®, Bau Farmacêutica S.A, San Pablo, SP, Brazil) was used for induction. For maintenance, isoflurane (1-2%, Isoforine®, Cristália, Brazil) in oxygen was used. MR was performed using a 0.25 Tesla scanner (Vet-MR Grande, Esaote, Florence, Tuscany, Italy) to obtain T1-weighted, T2-weighted, fluid attenuated inversion recovery (FLAIR), gradient echo (GRE), Short TI Inversion-recovery (STIR) and post-contrast T1 sequences (Gadoversetamide, Optimark®, Mallinckrodt Inc., Raleigh, NC, USA) in the sagittal, dorsal, and transverse planes. The investigated features consisted of the number of lesions (focal or multifocal/diffuse); neurological localization of the lesions; signal intensity pattern; presence of meningeal contrast enhancement, perilesional vasogenic oedema, ventriculomegaly/hydrocephalus, mass effect and brain herniation. Images were analyzed with the Synapse® PACS system (FUJIFILM Medical Systems U.S.A., Inc.).

To assess the reduction of neurological lesions through MR scan, a scoring scheme was also designed (Magnetic Resonance Scale, ERM, Appendix 2) and applied to the MR findings for both groups.

CSF Analysis

CSF collection and analysis were performed as described elsewhere⁴⁶⁻⁴⁸. CSF was considered inflammatory in the presence of pleocytosis ($> 5-20$ cells/ μ L) and/or hiperproteinorrachia (> 25 mg/dL)⁴⁶⁻⁴⁸.

Outcome

To quantify the outcome of both groups a scoring scheme was designed (Treatment Response Scale for MUO Dogs, MERT, Appendix 3) and applied for both groups, which is based on the results of EDN, ERM and CSF analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

The variables MSCs gene expression and secretory profile were evaluated with normality tests (Shapiro-Wilk) and graphic analyses (histograms and quantile-quantile plot). Friedman test followed by Dunn test were utilized compare each group. For the *in vivo* study the variables were analyzed with graphic analyses (histograms and quantile-quantile plot), ANOVA and the Wilcoxon test (SAS/STAT® Software). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Canine Ad-MSCs and PMSCs showed Similar Mesodermal Differentiation Potential and Immunophenotype

All lineages of Ad-MSCs and PMSCs were successfully isolated and cell lines displayed plastic adherence, surface marker expression, and trilineage differentiation capacity that are characteristics of canine MSCs. Flow cytometric analysis revealed the PMSCs and Ad-MSCs expression of mesenchymal markers CD 90 and CD 44 and the absence of expression of hematopoietic markers CD34, CD45 and CD 11b, and adhesion molecule CD106 and HLA-DR/MHC-II (Supplemental Figures 1 and 2). When cultured using standard differentiation induction protocols, Ad-MSCs and PMSCs were capable of trilineage differentiation into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages (Supplemental Figures 1 and 2).

Ad-MSCs Expressed More Neurotrophic Factors than PMSCs

For canine Ad-MSCs, there was a significant increased in gene expression of BDNF ($p = 0.0046$), GDNF ($p = 0.0046$), HGF ($p = 0.041$) and IDO ($p = 0.0417$) after $\text{INF-}\gamma$ and $\text{INF-}\gamma + \text{TNF-}\alpha$ priming when compared to the control group. The expression was significant increased after $\text{INF-}\gamma + \text{TNF-}\alpha$ rather than $\text{INF-}\gamma$. However, the expression of

IL-10 and PTGES2 no showed differences in the comparison among the INF- γ , IFN- γ +TNF- α and control groups ($p = >0.05$) (Figure 2).

For canine PMSCS, no significant differences were detected in BDNF, GDNF, HGF, IL-10 and PTGES2 expression, comparing the INF- γ , IFN- γ +TNF- α and control groups ($p = > 0.05$). However, there was a significant increase in IDO expression after priming with IFN- γ +TNF- α when comparing to the control group ($p = 0,884$) (Figure 2).

In the comparison among the sources, the expression of IL-10 in INF- γ primed Ad-MSCs was significantly higher than in INF- γ primed PMSCs ($p < 0.028$). On the other hand, there were no statistical differences in the expression of BDNF, GDNF, HGF, PTGES2 and IDO in the comparison of INF- γ , IFN- γ +TNF- α and control groups among the sources ($p > 0.05$) (Figure 2).

Canine PMSCs and Ad-MSCs Showed Distinct Immunomodulatory Potential

For canine Ad-MSCS, there was a significant increase in the secretion of the cytokine IL-6 from cells primed with INF- γ and IFN- γ +TNF- α compared to the control and the secretion was even higher in IFN- γ +TNF- α group compared to INF- γ ($p = 0.027$). On the other hand, there were no statistical differences in the secretion of GM-CSF, IL-2, IL-8, IL-10 and MCP-1 in the comparison among the INF- γ , IFN- γ +TNF- α and control groups ($p > 0.05$) (Figure 3).

For canine PMSCs, there was a significant increase in IL-8 secretion in the IFN- γ +TNF- α group compared to the control ($p = 0,0278$). However, there were no statistical differences in the secretion of GM-CSF, IL-2, IL-10, MCP-1 and IL-6 when comparing the INF- γ , IFN- γ +TNF- α and control groups ($p > 0.05$) (Figure 6). In the comparison among the sources, there were no statistical differences in the secretion of GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 among the INF- γ , IFN- γ +TNF- α and control groups (Figure 3).

***In vivo* Study**

PAC Group

Twelve dogs that met the inclusion criteria for this study were included in the PAC group. For these dogs, time from the beginning of clinical signs to diagnosis (pre-treatment) was from 7 to 330 days. The onset was acute (< 7 days) and progressive in 100% (12/12) of the dogs (Supplemental Table 5).

cMSC Group

Five dogs from the PAC group that met the inclusion criteria (intermediate or absent response to immunosuppressive treatment at 80 days post-treatment by MERT scale) were inserted in the cMSC group (dogs 4, 5, 7, 8, 10). All dogs had a chronic presentation (100%, 5/5) (Supplemental Table 5). Given the withdrawal of dog 4 after the second transplant, the parameters related to the response to treatment at 80 days post-transplant were not performed.

Canine Allogenic Ad-MSCs Transplantation Promoted Functional Recovery in Dogs with MUO

In PAC group, intermediate functional recovery was observed in 50% (6/12), absent in 33.3% (4/12) and optimal in 16.7% (2/12) of dogs. Eighty-three percent (10/12) of the dogs have survived to date 80 days post-treatment (dogs 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 and 12) (Figure 4 B3, Table 1). Dog 6 died due to the progression of the disease and dog 9 was euthanized by the owner's decision.

In cMSC group, optimal functional recovery was noted in 25% (1/4) of the dogs, intermediate in 50% (2/4), absent in 25% (1/4) (Figure 4 B3, Table 1). Seventy-five percent (3/4) of the dogs have survived to date 80 days post-treatment (dogs 5, 8, 10). Dog 7 died due to the progression of the disease. Representative images of functional deficits recovery are observed in Figures 4 B1,B2 and 5 B1,B2 and Supplemental Video 1.

When comparing the EDN Scale of the PAC and cMSC group individually among the pre-treatment, 40 days and 80 days post-treatment, no statistical differences were observed ($p > 0.05$) (Figure 4 B3). However, in both groups there was a tendency to decrease EDN at 40 and 80 days after the respective treatments, indicating positive

effects in both treatments. In the comparison among the groups, no significant differences were observed ($p > 0.05$) (Figure 4 B3).

Canine Allogenic Ad-MSCs Transplantation Promoted Intermediate MR Recovery in Dogs with MUO

In dogs of PAC group, 50% (5/10) showed an intermediate reduction of the lesions, 30% (3/10) did not have any reduction in lesions, and 20% (2/10) showed an optimal reduction in lesions on MR scan (Table 1). Of the dogs of cMSC group, 100% (3/3) of the dogs showed an intermediate reduction in injuries (Table 1). Representative MR images are observed in Figures 4 A1-A6 and Figures 5 A1-A6.

Dogs with MUO had Partial Remission with the Transplantation of Allogenic Ad-MSCs

In dogs of PAC group, 41.7% (5/12) had partial remission with the immunosuppressive treatment, 41.7% (5/12) had no remission and 16.7% (2/12) had total remission at 80 days post-treatment (Table 1).

In dogs of cMSC group, 75% (3/4) had a partial remission and 25% (1/4) had no remission at 80 days post-treatment (Table 1).

IT and IV Transplantation of Allogenic Ad-MSCs Was Well Tolerated

In dogs of PAC group, all dogs (100%, 12/12) developed adverse event, which corresponded to: mild - polydipsia in 58.3% (7/12), polyuria in 58.3% (7/12), gastroenteritis in 41.7 % (5/12), lethargy in 33.3% (4/12), polyphagia in 33.3% (4/12), lethargy in 33.3% (4/12), tachypnea in 25% (3 / 12), weight gain in 16.7% (2/12), dermatopathy/skin infections in 16.7% (2/12), hyporexia in 16.7% (2/12), urinary tract infection in 16, 7% (2/12), otitis media in 8.3% (1/12); Moderate - melena or hematochezia in 25% (3/12); Severe - liver disease in 8.3% (1/12) and pneumonia in 8.3% (1/12).

In dogs of cMSC group, 66.6% (4/6) had adverse events by IT transplantation, in which they were mild (66.6%, 4/6) in the majority of dogs, followed by 33.3% (2/6)

of severe adverse events. None of the dogs that received Ad-MSCs via the IV route (100%, 3/3) had adverse events (Table 2).

Canine Allogenic Ad-MSCs Transplantation Promoted Nucleated Cells Reduction in CSF

In the PAC and cMSC groups, no significant differences were observed in the CSF analysis, comparing the pre-treatment and 80 days post-treatment individually or among the groups ($p > 0.05$). However, in the cMSC group there was a tendency to decrease the number of nucleated cells after Ad-MSCs transplantation (Figure 4 B3).

Canine Allogenic Ad-MSCs did not Promote Alterations in Blood Count and Serum Biochemistry

There were no statistical differences when comparing the number of erythrocytes, hemoglobin concentration, platelet and leukocyte count, total plasma proteins serum concentration, albumin, globulin, phosphatase alkaline (ALP), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine individually or among the groups ($p > 0.05$) (Figure 5 C).

DISCUSSION

The therapeutic properties of MSCs rely on the ability of cells to secrete bioactive molecules and on the interaction with the microenvironment of the injured tissue. Human and rodent MSCs activated with pro-inflammatory cytokines increased the immunomodulatory and anti-inflammatory properties of cells, showing their therapeutic potential in inflamed environments^{38,49–53}. However, there are few studies revealing the therapeutic properties of canine MSCs^{37,38} that is a relevant topic in translational research. In addition, preliminary observations with human MSCs indicate that immunomodulatory properties may have variability among cell sources³⁴.

Using the described methodology, canine Ad-MSCs and PMSCs lineages were isolated and expanded uniformly and showed self-renewal and multiplication characteristics *in vitro*. The Ad-MSC and PMSCs lineages showed the minimum criteria described for MSCs *in vitro*, including fibroblast-like morphology, plastic adherence, ability to differentiate into the three mesodermal osteogenic, adipogenic and

chondrogenic lineages, and the expression of specific surface markers ^{41,54–57}. Although the criteria are extrapolated from human MSCs, our immunophenotypic findings were comparable to previous studies using canine MSCs ^{41,54,55,57}. In addition, Ad-MSCs and PMSCs did not express HLA-DR/MHC-II, characterizing a non-immunogenic phenotype ³¹.

In order to evaluate the immunomodulatory and neuroprotective properties of activated MSCs *in vitro*, cells were primed with IFN- γ and IFN- γ combined TNF- α , often associated with neuroimmune processes of the CNS ^{9,37,58,59}. The enzymes PTGES2 and COX-2 mutually participate in the synthesis of the anti-inflammatory cytokine PGE₂. We observed that the single and combined inflammatory medium did not stimulate PTGES2 expression by canine Ad-MSCs and PMSCs. Previously, it was observed that PGE₂ levels in Ad-MSCs and PMSCs increased after stimulation with TNF- α and IFN- γ ³⁷ and an increase in COX-2 expression was found in primed canine Ad-MSCs ^{35,38}. We believe that PTGES2 could be less important for the production of PGE₂ stimulated by pro-inflammatory cytokines.

We observed different results in the activation of neurotrophic factors by the canine sources. The pro-inflammatory cytokines IFN- γ and IFN- γ with TNF- α potentiated the expression of BDNF, HGF and GDNF by Ad-MSCs, but not by PMSCs. Neurotrophic factors BDNF and GDNF are important regulators of cell survival, proliferation, migration and differentiation in the CNS ⁶⁰ and HGF is a potent angiogenic factor with anti-inflammatory, anti-apoptotic and tissue restoration effects ^{61,62}. Thus, Ad-MSCs showed greater neuroprotective potential when activated than PMSCs.

We found that IDO is not constitutively expressed by canine Ad-MSCs and PMSCs, but that requires activation by IFN- γ and, mainly by IFN- γ with TNF- α to be expressed, as previously reported ⁶³. Although Chow et al. (2017) did not show IDO-mediated T lymphocyte suppression secreted by canine MSCs ⁶⁴, our observations indicate that IDO could participate in the immunomodulatory mechanisms of canine Ad-MSCs and PMSCs in a similar way to human MSCs ^{65,66}.

Regarding the secretory profile, the MSCs from both sources shared the 6 soluble factors, however, with differences in the concentrations of the IL-6 and IL-8. As well as in PMSCs, there was a significant increase in IL-8 secretion after single and combined stimulation, Ad-MSCs secreted more IL-6 after stimulation. Recently, the cytokine IL-6 was classified as exclusively pro-inflammatory, produced after tissue destruction and infections, however, it is also involved in the metabolic, regenerative and neural

processes ⁶⁷. In addition, it was identified that IL-6 is capable of promoting neuroprotection ^{68,69}, astrocytes' apoptosis suppression ⁷⁰, and may be related to the immunoregulation of CD^s ⁷¹. On the other hand, IL-8 is a chemotactic cytokine that regulates the acute inflammatory response, that is able to increase the survival of endothelial cells and cell proliferation and to regulate angiogenesis ^{72–75}. Our results therefore suggest that canine Ad-MSCs and PMSCs have immunomodulatory properties through different mechanisms.

Although IL-10 was expressed in canine unprimed MSCs from both sources which was in contrast with previous studies ^{35,49} and with a higher expression in IFN- γ and TNF- α group, the cytokine secretion was not enhanced after stimulation. On the other hand, the levels of gene expression and protein secretion do not necessarily need to be proportionally correlated, since the control of regulatory processes occurs at different stages ^{76,77}. Interestingly, in a preliminary research, it was found that canine Ad-MSCs did not secrete IL-10, which was produced exclusively by monocytes after exposure to the cytokine IL-6 (KREŠIĆ et al., 2017; MELIEF et al., 2013). IL-10 production has also not increased when canine Ad-MSCs were co-cultured with leukocytes, indicating that this cytokine may not play an important role in the immunomodulation of canine MSCs ³⁵.

We found that the levels of the chemokine MCP-1, the anti-inflammatory cytokine GM-CSF and the pro-inflammatory cytokine IL-2 were similar among the two sources of MSCs and did not differ significantly after priming.

Based on our results, both sources of canine MSCs secreted soluble immunomodulatory/immunosuppressive factors, with differences in activation with the inflammatory medium. The results suggest that canine Ad-MSCs and PMSCs have immunomodulatory and neuroprotective activities through different mechanisms. These findings support the possible application of these cells in the clinical setting for the treatment of neuroimmune diseases, in which the inflammatory environment caused by immunological imbalances would promote an increase in the therapeutic activity of the cells.

The treatment of human MS has been the subject of several studies in MSC-based therapy, since current treatments approved are partially effective in the resolution and preventing damage to inflamed CNS tissue ^{78–81}. Canine MUO emerges as a potential natural model for MS, due to the numerous immunopathological, clinical and

radiological similarities and for its spontaneous development ^{4-6,9}. As MS, the current treatment for MUO poorly reduces clinical signs, and progression of disease ^{2,17-21}.

Herein, twelve dogs with MUO were prospectively treated with ara-C associated with prednisone (PAC group). Five dogs showed an intermediate or absent response to immunosuppressive treatment and received two Ad-MSCs transplantations by IT or IV route with interval of 40 days (cMSC group). We observed that the majority of dogs in both groups showed size, age distribution, onset and progression of neurological signs similar to the findings in the literature ^{43,82,83}.

Response to treatment was based on clinical findings, MR images and CSF analysis ². Due to the clinical heterogeneity of MUO and the lack of a method for assessing treatment response, we developed and applied a functional recovery scale (EDN), a MR reduction of neurological lesions scale (ERM) and, finally, a scale of treatment response for dogs with MUO (MERT), all based on MS scales ^{84,85}.

At 80 days after treatment, we observed that most dogs in the PAC group showed partial recovery (50%, 6/12) of neurological functions, followed by absence (33.3%, 4/12) and excellent functional recovery (16.7%, 2/12), respectively. Although there were no statistical differences between the moments, we noticed a trend towards clinical recovery after treatment. Survival was 83.3% (10/12) after treatment. In the literature, using a similar immunosuppression protocol, survival rates vary considerably ^{2,43}.

With the exception of dog 10, the dogs presented results of the EDN scale compatible with the ERM Scale. However, in the CSF analysis, there were no different in cellularity or protein concentration after treatment. Using the MERT scale, we observed that 41.7% (5/12) of the dogs showed partial remission of the disease, a frequency similar to those that did not show remission (41.7%, 5/12). The minority (16.7%, 2/12) of the dogs showed total remission.

In the cMSC group, two transplantations were performed based on previous studies in order to obtain a superior therapeutic response ⁸⁶⁻⁸⁸. In addition, our group observed limited therapeutic response after Ad-MSc transplantation via IT in a single dose in dogs with distemper (unpublished data). Ad-MSCs were chosen for the clinical study, based on our *in vitro* results, which showed advantages due to easy obtaining, fast isolation, and high neuroprotective and immunomodulatory potential.

In the cMSC group, at 80 days post-transplant, there was a tendency for functional improvement and intermediate functional recovery in the majority (50%, 2/4), excellent in 25% (1/4) of the dogs and absent in 25% (1/4). Three dogs in the cMSC

group underwent MR after treatment (dogs 5, 8, and 10). Only dog 8, MR images were compatible with clinical findings, however, in dogs 8 and 10 that showed intermediate functional recovery, MR images also showed the presence of inflammatory lesions. Previously, it was observed that although some dogs with MUO showed clinical remission after treatment, the MR findings were abnormal ². On the other hand, dogs may present neurological signs and abnormal CSF and lesions not identifiable on MR scan ^{2,48}. Thus, the clinical and radiological correlation in MUO still needs to be further studied.

The dogs of the cMSC group did not show significant differences after transplantation by CSF analysis, however there was a tendency to decrease nucleated cells, indicating a reduction in the level of inflammation. The dog that died (dog 7) had extensive multifocal neurological lesions in the thalamus-cortical region, brainstem and cerebellum. Importantly, multifocal and brainstem injuries are associated with a shorter survival time ⁸⁹. In this dog, the transplantation of Ad-MSCs was not able to contain the rapid progression of the lesions. In the present study, most dogs (75%, 3/4) had an intermediate response to transplantation and in only one dog (25%, 1/4) there was no response. The impact of MSC-based therapy on EAE, which is similar to MUO ⁸⁹, has been widely studied, with most studies reporting a potent immunosuppressive and immunomodulatory effect ⁹⁰⁻⁹³. In progressive EAE, transplantation of MSCs showed positive results at onset of the disease or at the peak of disease severity, but not when administered late ⁹¹.

In the present experiment, although the transplantation of AT-MSCs was performed in the chronic stage of the disease, we found a positive response in most dogs. In a previous study, dogs with refractory MUO were treated with autologous BM-MSCs, using different routes of administration (IA, IV and IT) ⁹⁴. After transplantations, the authors reported an improvement in MR images and neurological signs in most dogs ⁹⁴. Despite this, we hypothesized that transplantation of Ad-MSCs early in disease could result in a superior therapeutic response.

When analyzing the results of both experimental groups in the response to treatment criterion, we observed that the cMSC group showed better results, however, in addition to being in different stages of the neuroinflammatory and neurodegenerative processes, the number of dogs in this group was considerably less.

All dogs in the PAC group (100%, 12/12) developed adverse events during treatment, while adverse events were observed in a smaller portion of Ad-MSC

transplantation plus only through the IT route (66.7%, 4/6), also the majority being self-limiting. With the use of immunomodulators and immunosuppressants, such as ara-C and corticosteroids, dogs with MUO routinely develop dose-dependent adverse events^{17,22,95}. On the other hand, adverse events are rarely reported after transplantations IT and IV routes in humans, with pain, headache, hyperthermia and mild gastrointestinal disorders being manifested^{87,96–98}. Less commonly, pulmonary microembolism and thromboembolism have been described by IV delivery route⁹⁷. We previously observed that the transplantation of allogeneic MSCs by IT route was safe in healthy dogs (n = 5). Neurological deficits and CSF changes were not observed five days after transplantation, and abnormalities in MR images were not detected after 12 months (unpublished data).

Both IT and IV delivery routes can be considered for neuroimmune diseases^{86,90,91,96}. In our study, both routes of transplantation showed a similar therapeutic response. In addition, allogeneic Ad-MSC transplants proved to be feasible and tolerated by the IT and IV routes. Within the limitations of the IT route, there is a need for general anesthesia and invasiveness compared to the IV route. On the other hand, for IV transplantation, fluid therapy is recommended due to the risk of microembolization^{29,99,100}.

We designated to include cases based on clinical criteria and clinical findings, with no histopathological confirmation. While brain biopsy has been the mainstay for confirming the presence of specific meningoencephalitides, the need for a less invasive test in these often critically ill patients has been acknowledged¹. It is therefore impossible to define the precise nature of the inflammatory condition affecting each dog in the present study.

The present study was the first to perform serial transplantations of allogenic Ad-MSCs in dogs with MUO. Although this was not a controlled study, we observed the potential benefits of cell therapy for more chronic phase of the disease, based on the improvement of functional deficits and magnetic resonance imaging. The main limitations of this study are the small number of dogs transplanted with Ad-MSCs and the absence of a randomized, double-blind study. This is a preliminary study that demonstrates the effects of Ad-MSCs in dogs with MUO, being one more step towards the study of the potential effectiveness of therapy with Ad-MSCs in the canine disease and, possibly, that may contribute translationally with the studies of cell-based therapy in multiple sclerosis.

CONCLUSION

The inflammatory environment increased the gene expression of IDO, BDNF, GDNF and HGF and the secretion of IL-6 by canine Ad-MSCs and the expression of IDO and secretion of IL-8 by canine PMSCs.

The transplantation of allogeneic Ad-MSCs in dogs with MUO demonstrated beneficial effects and proved to be tolerable.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (process, 2018/01301-8). We thank the School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (FMVZ-UNESP, Botucatu Campus), the Experimental Research Unit of Botucatu Medical School (UNIPEX-FMB-Unesp, Botucatu Campus) and the Cell Engineering Laboratory (Blood transfusion center/FMB/UNESP, Botucatu Campus) for infrastructural and technical support.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTING INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Coates JR, Jeffery ND. Perspectives on meningoencephalomyelitis of unknown origin. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2014;44(6):1157-1185. doi:10.1016/j.cvsm.2014.07.009
2. Lowrie M, Smith PM, Garosi L. Meningoencephalitis of unknown origin: investigation of prognostic factors and outcome using a standard treatment protocol. *Vet Rec.* 2013;172(20):527-527. doi:10.1136/vr.101431
3. Cornelis I, Volk HA, Van Ham L, De Decker S. Clinical presentation, diagnostic findings and outcome in dogs diagnosed with presumptive spinal-only meningoencephalomyelitis of unknown origin. *J Small Anim Pract.* 2017;58(3):174-182. doi:10.1111/jsap.12622
4. Greer KA, Wong AK, Liu H, 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):110-118. doi:10.1111/j.1399-

0039.2010.01484.x

5. Park ES, Uchida K, Nakayama H. Comprehensive immunohistochemical studies on canine necrotizing meningoencephalitis (NME), necrotizing leukoencephalitis (NLE), and granulomatous meningoencephalomyelitis (GME). *Vet Pathol.* 2012;49(4):682-692. doi:10.1177/0300985811429311
6. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(9):545-558. doi:10.1038/nri3871
7. Jeffery ND, Barker AK, Alcott CJ, et al. The Association of Specific Constituents of the Fecal Microbiota with Immune-Mediated Brain Disease in Dogs. Wilson BA, ed. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170589. doi:10.1371/journal.pone.0170589
8. Hoffman AM, Dow SW. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells.* 2016;34(7):1709-1729. doi:10.1002/stem.2377
9. Park ES, 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. *Vet Pathol.* 2013;50(6):1127-1134. doi:10.1177/0300985813488957
10. Amatya N, Garg A V., Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017. doi:10.1016/j.it.2017.01.006
11. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172(1):146-155. doi:10.2353/ajpath.2008.070690
12. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2016;13(1):26-36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
13. Barber RM, Schatzberg SJ, Corneveaux JJ, et al. Identification of Risk Loci for Necrotizing Meningoencephalitis in Pug Dogs. *J Hered.* 2011;102(1):S40-S46. doi:10.1093/jhered/esr048
14. Schrauwen I, Barber RM, Schatzberg SJ, 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.* 2014;9(11). doi:10.1371/journal.pone.0112755

15. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):223-244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
16. 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):1079-1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
17. Zarfoss M, Schatzberg S, Venator K, et al. Combined cytosine arabinoside and prednisone therapy for meningoencephalitis of unknown aetiology in 10 dogs. *J Small Anim Pract.* 2006;47(10):588-595. doi:10.1111/j.1748-5827.2006.00172.x
18. Flegel T, Boettcher IC, Matiassek K, et al. Comparison of oral administration of lomustine and prednisolone or prednisolone alone as treatment for granulomatous meningoencephalomyelitis or necrotizing encephalitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2011;238(3):337-345. doi:10.2460/javma.238.3.337
19. JUNG D-I, LEE H-C, HA J, et al. Unsuccessful Cyclosporine plus Prednisolone Therapy for Autoimmune Meningoencephalitis in Three Dogs. *J Vet Med Sci.* 2013;75(12):1661-1665. doi:10.1292/jvms.12-0503
20. Wong M a, Hopkins AL, Meeks JC, Clarke JD. Evaluation of treatment with a combination of azathioprine and prednisone in dogs with meningoencephalomyelitis of undetermined etiology: 40 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc.* 2010;237(8):929-935. doi:10.2460/javma.237.8.929
21. 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):147-147. doi:10.1136/vr.103640
22. 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):147-147. doi:10.1136/vr.103640
23. Wingerchuk DM, Carter JL. Multiple sclerosis: Current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. *Mayo Clin Proc.* 2014;89(2):225-240. doi:10.1016/j.mayocp.2013.11.002
24. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(7):410-415. doi:10.1016/j.autrev.2011.01.005
25. Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, et al. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(11):1135-1148. doi:10.1002/sctm.19-0044

26. Paul G, Anisimov S V. The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. *Biochimie*. 2013;95(12):2246-2256. doi:10.1016/j.biochi.2013.07.013
27. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019;37(7):855-864. doi:10.1002/stem.3016
28. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499-3506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716
29. Ciervo Y, Ning K, Jun X, Shaw PJ, Mead RJ. Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1). doi:10.1186/s13024-017-0227-3
30. Noronha NDC, Mizukami A, Calíari-Oliveira C, et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):132. doi:10.1186/s13287-019-1259-0
31. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890-896. doi:10.1016/S0301-472X(03)00110-3
32. Kim DS, Jang IK, Lee MW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine*. 2018;28:261-273. doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.002
33. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. Verfaillie CM, ed. *PLoS One*. 2010;5(2):e9016. doi:10.1371/journal.pone.0009016
34. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(6):455-463. doi:10.5966/sctm.2012-0184
35. Kang JW, Kang K-S, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. Soluble Factors–Mediated Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(4):681-694. doi:10.1089/scd.2007.0153
36. Long C, Lankford L, Kumar P, et al. Isolation and characterization of canine

- placenta-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of neurological disorders in dogs. *Cytom Part A*. 2017;(3):7-9. doi:10.1002/cyto.a.23171
37. Amorim RM, Clark KC, Walker NJ, 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):304. doi:10.1186/s13287-020-01799-0
 38. Yang H-M, Song W-J, Li Q, et al. Canine mesenchymal stem cells treated with TNF- α and IFN- γ enhance anti-inflammatory effects through the COX-2/PGE2 pathway. *Res Vet Sci*. 2018;119(October 2017):19-26. doi:10.1016/j.rvsc.2018.05.011
 39. 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*. 2012;92(1):66-75. doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.012
 40. Russell KA, Chow NHC, Dukoff D, et al. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2016;11(12). doi:10.1371/journal.pone.0167442
 41. 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):279-289. doi:10.3727/096368909X481764
 42. Lankford L, Selby T, Becker J, et al. Early gestation chorionic villi-derived stromal cells for fetal tissue engineering. *World J Stem Cells*. 2015;7(1):195-207. doi:10.4252/wjsc.v7.i1.195
 43. Granger N, Smith PM, Jeffery ND. Clinical findings and treatment of non-infectious meningoencephalomyelitis in dogs: A systematic review of 457 published cases from 1962 to 2008. *Vet J*. 2010;184(3):290-297. doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.031
 44. Schatzberg SJ. Idiopathic Granulomatous and Necrotizing Inflammatory Disorders of the Canine Central Nervous System. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2010;40(1):101-120. doi:10.1016/j.cvsm.2009.09.003
 45. Podell M, Volk HA, Berendt M, et al. 2015 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Seizure Management in Dogs. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):477-490. doi:10.1111/jvim.13841

46. Di Terlizzi R, Platt S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. *Vet J*. 2006;172(3):422-431. doi:10.1016/j.tvjl.2005.07.021
47. Vernau W, Vernau KA, Sue Bailey C. Cerebrospinal Fluid. In: Elsevier, ed. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego, California: Elsevier Inc.; 2008:769-819. doi:10.1016/B978-0-12-370491-7.00026-X
48. Bohn AA, Wills TB, West CL, Tucker RL, Bagley RS. Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: a retrospective study. *Vet Clin Pathol*. 2006;35(3):315-320. doi:10.1111/j.1939-165X.2006.tb00138.x
49. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2007;110(2):91-100. doi:10.1016/j.imlet.2007.04.001
50. Lin T, Pajarinen J, Nabeshima A, et al. Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):277. doi:10.1186/s13287-017-0730-z
51. Vigo T, La Rocca C, Faicchia D, et al. IFN β enhances mesenchymal stromal (Stem) cells immunomodulatory function through STAT1-3 activation and mTOR-associated promotion of glucose metabolism. *Cell Death Dis*. 2019;10(2). doi:10.1038/s41419-019-1336-4
52. Hemeda H, Jakob M, Ludwig A-K, Giebel B, Lang S, Brandau S. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Differentially Affect Cytokine Expression and Migration Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(5):693-706. doi:10.1089/scd.2009.0365
53. Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, Jumabay M, Chen WCW. Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1-10. doi:10.1155/2016/3924858
54. Kang B-J, Ryu H-H, Park SS, et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci*. 2012;13(3):299. doi:10.4142/jvs.2012.13.3.299
55. Long C, Lankford L, Kumar P, et al. Isolation and characterization of canine placenta-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of neurological disorders in dogs. *Cytom Part A*. 2018;93(1):82-92. doi:10.1002/cyto.a.23171

56. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
57. Zhan XS, El-Ashram S, Luo DZ, 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). doi:10.3390/ijms20061485
58. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2016;36(2):115-127. doi:10.1055/s-0036-1579739
59. Kerschensteiner M, Meinl E, Hohlfeld R. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Results Probl Cell Differ*. 2010;51(3):197-216. doi:10.1007/400_2009_6
60. Weishaupt N, Blesch A, Fouad K. BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012. doi:10.1016/j.expneurol.2012.09.001
61. NAKAMURA T, MIZUNO S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Japan Acad Ser B*. 2010;86(6):588-610. doi:10.2183/pjab.86.588
62. Wang A, Brown EG, Lankford L, et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(6):659-669. doi:10.5966/sctm.2014-0296
63. Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. The Role of IFN- γ and TNF- α -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase. *J Interf Cytokine Res*. 2005;25(1):20-30. doi:10.1089/jir.2005.25.20
64. Chow L, Johnson V, Coy J, Regan D, Dow S. Mechanisms of Immune Suppression Utilized by Canine Adipose and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2017;26(5):374-389. doi:10.1089/scd.2016.0207
65. Su J, Chen X, Huang Y, et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ*. 2014;21(3):388-396. doi:10.1038/cdd.2013.149
66. De Witte SFH, Franquesa M, Baan CC, Hoogduijn MJ. Toward development of imesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. *Front Immunol*. 2016;6(JAN). doi:10.3389/fimmu.2015.00648
67. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol*

- Cell Res.* 2011;1813(5):878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
68. Jung JE, Kim GS, Chan PH. Neuroprotection by Interleukin-6 Is Mediated by Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Antioxidative Signaling in Ischemic Stroke. *Stroke.* 2011;42(12):3574-3579. doi:10.1161/STROKEAHA.111.626648
 69. Lahiani A, Zahavi E, Netzer N, et al. Human PLacental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(2):422-430. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.009
 70. Gu Y, He M, Zhou X, et al. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by supressing apoptosis in astrocyte. *Sci Rep.* 2016;6:1-16. doi:10.1038/srep18587
 71. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells.* 2007;25(8):2025-2032. doi:10.1634/stemcells.2006-0548
 72. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *J Immunol.* 2003;170(6):3369-3376. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3369
 73. Hou Y, Ryu CH, Jun JA, Kim SM, Jeong CH, Jeun S-S. 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):1050-1059. doi:10.1002/cbin.10294
 74. Legler DF, Thelen M. Chemokines: Chemistry, biochemistry and biological function. *Chimia (Aarau).* 2016;70(12):856-859. doi:10.2533/chimia.2016.856
 75. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307(1):97-101. doi:10.1016/0014-5793(92)80909-z
 76. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):227-232. doi:10.1038/nrg3185
 77. Shebl FM, Pinto LA, García-Piñeres A, et al. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(4):978-981.

- doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0064
78. Freedman MS, Bar-Or A, Atkins HL, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group. *Mult Scler J*. 2010;16(4):503-510. doi:10.1177/1352458509359727
 79. Yamout B, Hourani R, Salti H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: A pilot study. *J Neuroimmunol*. 2010;227(1-2):185-189. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.013
 80. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, et al. Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol*. 2010;67(10):1187-1194. doi:10.1001/archneurol.2010.248
 81. Connick P, Kolappan M, Crawley C, et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: An open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 2012;11(2):150-156. doi:10.1016/S1474-4422(11)70305-2
 82. Cooper JJ, Schatzberg SJ, Vernau KM, et al. Necrotizing meningoencephalitis in atypical dog breeds: a case series and literature review. *J Vet Intern Med*. 2014;28(1):198-203. doi:10.1111/jvim.12233
 83. Timmann D, Konar M, Howard J, Vandeveld M. Necrotising encephalitis in a French bulldog. *J Small Anim Pract*. 2007;48(6):339-342. doi:10.1111/j.1748-5827.2006.00239.x
 84. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2014. doi:10.1186/1471-2377-14-58
 85. Sormani MP, Rio J, Tintorè M, et al. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2013. doi:10.1177/1352458512460605
 86. Harris VK, Yan QJ, Vyshkina T, Sahabi S, Liu X, Sadiq SA. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2012;313(1-2):167-177. doi:10.1016/j.jns.2011.08.036
 87. Oh KW, Noh MY, Kwon MS, et al. Repeated Intrathecal Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 2018;84(3):361-373.

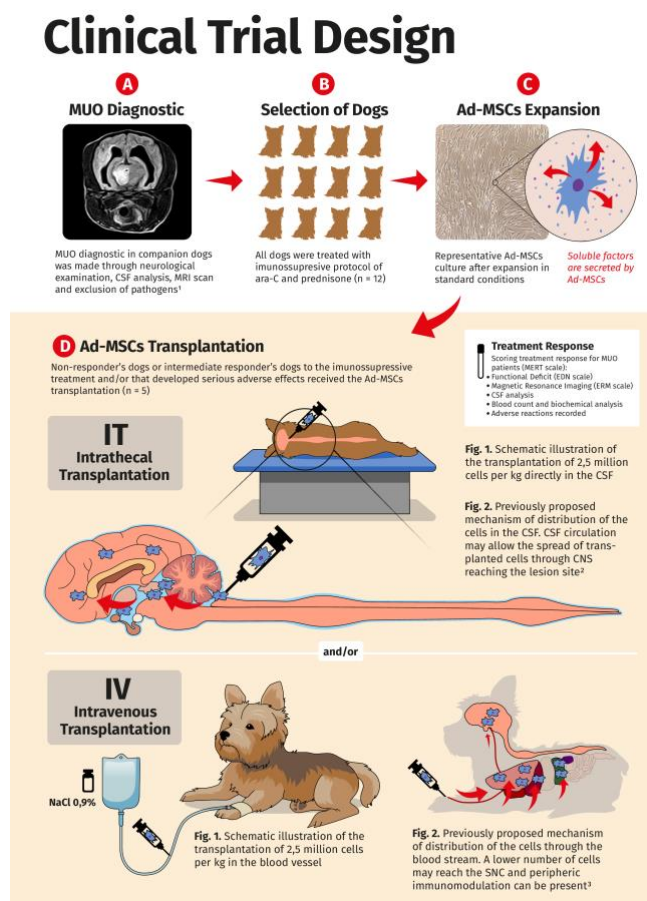
doi:10.1002/ana.25302

88. Zhang C, Zhou C, Teng J-J, Zhao R-L, Song Y-Q. Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. 2009;11(3):299-306. doi:10.1080/14653240902806986
89. Muñana KR, Luttgen PJ. Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). *J Am Vet Med Assoc*. 1998;212(12):1902-1906. doi:10.1586/era.10.131.Expression
90. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2007;61(3):219-227. doi:10.1002/ana.21076
91. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy
Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. 2008;106(5):1755-1761. doi:10.1182/blood-2005-04-1496
92. Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther*. 2009;17(10):1799-1803. doi:10.1038/mt.2009.157
93. Anderson P, Gonzalez-Rey E, O'Valle F, Martin F, Oliver FJ, Delgado M. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Self-Reactive T Cell Responses and Dendritic Cell Function. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1-15. doi:10.1155/2017/2389753
94. Zeira O, Asiag N, Aralla M, 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. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):181. doi:10.1186/s12974-015-0402-9
95. Menaut P, Landart J, Behr S, Lanore D, Trumel C. Treatment of 11 dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin with a combination of prednisolone and cytosine arabinoside. *Vet Rec*. 2008;162:241-245. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.2006.00172.x>.
96. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with

- multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2010;67(10):1187-1194. doi:10.1001/archneurol.2010.248
97. Boltze J, Arnold A, Walczak P, Jolkkonen J, Cui L, Wagner DC. The dark side of the force - constraints and complications of cell therapies for stroke. *Front Neurol*. 2015;6. doi:10.3389/fneur.2015.00155
 98. Hur JW, Cho T-H, Park D-H, Lee J-B, Park J-Y, Chung Y-G. Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. *J Spinal Cord Med*. 2016;39(6):655-664. doi:10.1179/2045772315Y.0000000048
 99. Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJM, et al. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(1):75-86. doi:10.5966/sctm.2015-0127
 100. Kim Y, Jo S, Kim WH, Kweon O-K. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):229. doi:10.1186/s13287-015-0236-5

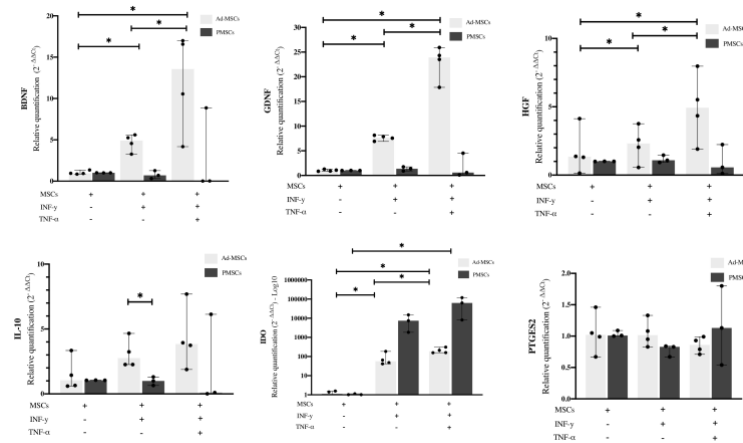
FIGURES

FIGURE 1. Illustrative representation of the *in vivo* study design. (A) MUO diagnosis was performed in companion dogs by neurological examination, blood count and serum biochemistry, exclusion of infectious diseases, MR scan and CSF analysis. (B) Dogs with MUO were treated with prednisone and cytarabine immunosuppressive protocol and rechecked in 80 days (PAC group, n=12).



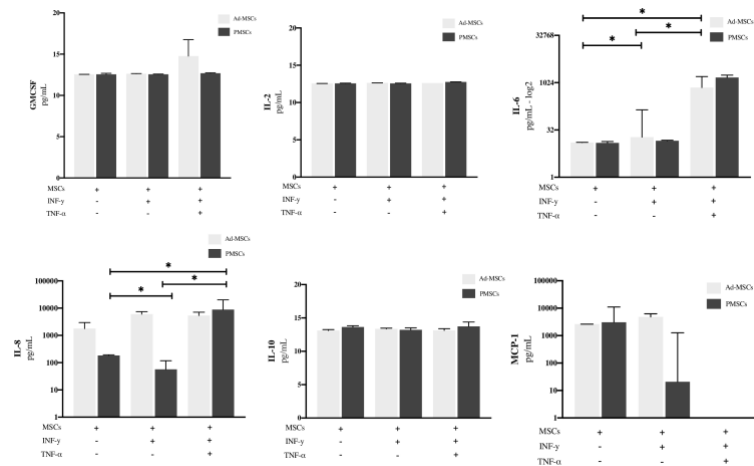
(C, D) Dogs that had an intermediate or absent clinical by MERT Scale were treated with two allogeneic Ad-MSCs transplantation via IT or IV (n=5), after expansion of the cells in standard conditions. Response to treatment was assessed by MERT scale using a combination of neurological examination, MR scan and CSF analysis. Blood count and biochemistry analysis were performed, as the occurrence of adverse events recorded. *Illustration by Luís Renato do Nascimento.*

FIGURE 2. Gene expression of cytokines and neurotrophic factors of canine Ad-MSCs and PMSCs after priming with INF- γ and INF- γ combined with TNF- α .



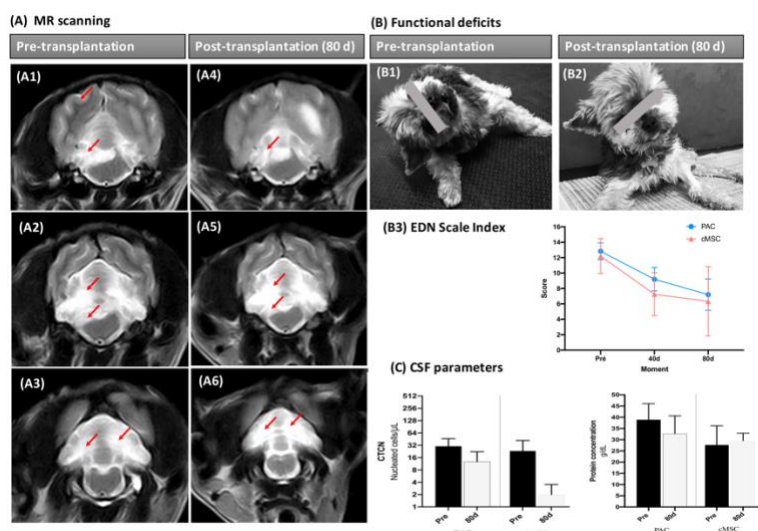
Data were represented as mean, minimum and maximum ($p < 0,05^*$).

FIGURE 3. Secretory profile of canine Ad-MSCs and PMSCs after priming with INF- γ and INF- γ combined with TNF- α .



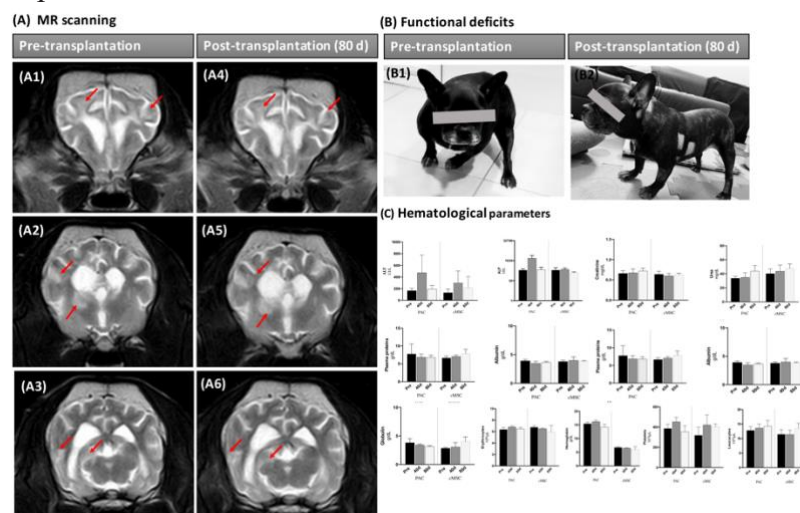
Data were represented as mean, minimum and maximum ($p < 0,05^*$).

FIGURE 4. Clinical assessments of the outcome at pre-transplantation and 80 days after Ad-MSCs transplantation by MR scanning, neurological exam and EDN Scale index, and CSF analysis.



(A) MR scanning of dog 5 that received two transplantations of Ad-MSCs by intrathecal route, at pre-treatment (A1-3) and 80 days post-treatment (A4-6) in the transverse plane and T2-W sequence. Hypersignals are observed in the cerebellopontine region involving the white matter of the cerebellum, cerebellar peduncles and the right side of the brainstem (red arrows). At 80 days after transplantation of Ad-MSCs, the hypersignals persisted in the same regions (red arrows). In the neurological examination of the same dog at pre-transplantation it was observed (B1) head tilt, non-ambulatory tetraparesis, increased extensor tone in the left pelvic and thoracic left limbs, and other clinical signs as nystagmus, strabismus and trunk swing. After Ad-MSC transplantations (B2) there was an improvement of head tilt, extensor tone and nystagmus, despite the absence of lesions' recovery in the MR images. (B3) The line graph indicated a tendency for EDN to decrease over time in dogs with MUO in the PAC and cMSC groups. The values obtained were represented as median, minimum and maximum ($p > 0.05$). (C1, C2) The line graph indicated a tendency for cell number reduction in the cMSC group. Values were represented as median, minimum and maximum ($p > 0.05$). CTCN, Number of nucleated cells in the CSF. Proteins, total protein concentration.

FIGURE 5. Clinical assessments of the outcome at pre-transplantation and 80 days after Ad-MSCs transplantation by MR scanning, neurological clinical assessment and hematological parameters.



(A) MR scanning of dog 10 that received the transplantations of Ad-MSCs by IV route (first) and the IT route (second), at pre-treatment (A1-3) and 80 days post-treatment (A4-6) in the transverse plane and T2-W sequence. (A1-A6) Diffuse hypersignal areas are noted in the frontal lobe bilaterally and in the right region of the thalamus and parietal lobe, and bilaterally the temporal lobe and the right rostral coliculus (arrows). Note the presence of hydrocephalus and asymmetry of the lateral ventricles. At 80 days after transplantation of Ad-MSCs the hypersignals persisted. (C) Blood count and serum biochemistry parameters of the PAC and cMSC groups did not show significant alterations ($p > 0.05$) in the pre-treatment and at 40 days and 80 days after treatment.

TABLES

TABLE 1. Results of MERT Scale scores based on EDN and ERM Scales and CSF of PAC and cMSC groups.

Dog	Scale Index	PAC group				cMSC group										
		Pre-	40d	80d	Outcome Criteria	MERT Index	Pre-	40d	80d	Outcome Criteria	Sume Response and					
1	EDN Score	6	3	0	Optimal	1 Total										
	ERM Score				Optimal											
	CSF				Inflammatory											
2	EDN Score	10	6	0	Optimal	0 Total										
	ERM Score				Optimal											
	CSF				Non-Inflammatory											
3	EDN Score	15	8	3	Intermediate	2 Partial										
	ERM Score				Intermediate											
	CSF				Inflammatory											
4	EDN Score	16	6	5	Intermediate	3 Partial	5	2	Withdr aw	n/a	Not performed (withdraw)					
	ERM Score				Intermediat		Not performed (withdraw)									
	CSF				Inflammatory		Not performed (withdraw)									
5	EDN Score	13	13	16	Absent	5 Absent	16	15	15	Intermediate	3 Partial					
	ERM Score				Absent		1			Intermediate						
	CSF				Inflammatory					Inflammatory						
6	EDN Score	20	Death		Absent	6 Absent										
	ERM Score	Not performed (death)			n/a											
	CSF				Inflammatory											
7	EDN Score	17	18	18	Absent	4						18	Death		Absent	6

	ERM Score				Absent	Absent	Not performed (death)			N/a	Absent
	CSF				Inflammatory		Not performed (death)			N/a	
8	EDN Score	11	11	11	Intermediate	3 Partial	11	11	5	0	3 Partial
	ERM Score				Intermediate		1			Intermediate	
	CSF				Inflammatory					Inflammatory	
9	EDN Score	13	Death		Absent	6 Absent					
	ERM Score	Not performed (death)			n/a						
	CSF				Non-Inflammatory						
10	EDN Score	11	11	11	Intermediate	4 Absent	11	7	4	Intermediate	3 Partial
	ERM Score				Absent		1			Intermediate	
	CSF				Inflammatory					Inflammatory	
11	EDN Score	12	7	5	Intermediate	2 Partial					
	CSF				Inflammatory						
	ERM Score				Intermediate						
12	EDN Score	10	6	3	Intermediate	3 Partial					
	CSF				Inflammatory						
	ERM Score				Intermediate						

(EDN = 0) Optimal functional recovery, no clinical evidence of post-treatment functional disability; (Pre-treatment EDN < post-treatment EDN) intermediate recovery, partial improvement of functional disability followed by stability or relapse preceded by stability or clinical improvement or stability; (Pre-treatment EDN > post-treatment EDN score) missing functional recovery, progression of functional disability or death. Pre, pre-treatment. 40 days, 40 days post-treatment. 80 days, 80 days post-treatment.

TABLE 2. Adverse events observed after transplantation of Ad-MSCs in the cMSC group. IT, transplantation performed by intrathecal delivery route. IV, transplantation performed by intravenous delivery route. N/a, not applicable. *self-limiting adverse events (24-48 hours).

After 1 st AD-MSCs Transplantation				After 2 nd AD-MSCs Transplantation				
Dog	Delivery Route	Apathy*	Hyporexia*	Delivery Route	Apathy*	Hyporexia*	Bradycardia	Hypotension
4	IT	No	No	IT	Yes	No	Yes	Yes
5	IT	Yes	Yes	IT	Yes	No	Yes	Yes
7	IT	No	No	Not performed (death)				
8	IV	No	No	IV	No	No	No	No
10	IV	No	No	IT	n/a	n/a	n/a	n/a

