



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL ALÓGENA DERIVADA DE TECIDO  
ADIPOSO EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA: EFICÁCIA E SEGURANÇA**

**FERNANDA OLIVEIRA RAMOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
JANEIRO DE 2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**USO DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL ALÓGENA DERIVADA DE TECIDO  
ADIPOSO EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA: EFICÁCIA E SEGURANÇA**

**FERNANDA OLIVEIRA RAMOS**

**ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES LIMA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO:**

**BRASÍLIA/DF**

**JANEIRO DE 2019**

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
1.1. Dermatite Atópica .....	11
1.2. Célula Tronco .....	14
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>17</b>
2.1. Delineamento Experimental .....	17
2.2. Randomização e Tratamento da Dermatite Atópica .....	18
2.2.1. Períodos avaliados entre os grupos .....	18
2.2.1.1 Dia zero (D0) .....	18
2.2.1.2 Dias 10 (D10), 31 D (31) e 52 (D52) .....	19
2.2.1.3. Dia 82 (D82) .....	19
2.3. Processamento e Avaliação Histopatológica das Biópsias de Pele.....	20
2.4. Tratamento da Dermatite Atópica a Partir da Aplicação de CTMs.....	20
2.5. Isolamento, Cultivo, Imunofenotipagem e Congelamento de CTMs.....	20
2.6. Caracterização das CTMs .....	21
2.7. Análise Estatística .....	22
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Isolamento, Cultivo e Caracterização das CTMs .....	23
3.2. Avaliação do CADESI 4, Grau de Prurido, Exames Hematológicos, Bioquímicos, e Temperatura Corporal .....	25
3.3. Mensuração da Espessura da Epiderme .....	28
3.4. Avaliação Histopatológica .....	30
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>38</b>

## RESUMO

A dermatite atópica canina (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, pruriginosa de origem genética e com envolvimento de fatores ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tratamento com células tronco alógenas derivadas de tecido adiposo de cães (CTMs) em cães com DA. Dezesesseis cães foram selecionados e divididos em três grupos, sendo leve, moderado e severo de acordo com o CADESI4. O protocolo preconizado neste experimento foi  $2 \times 10^6$ /kg de peso corporal de CTMs pela via endovenosa, com intervalos de aplicações de 21 dias. Foram avaliados os parâmetros de grau de prurido pela escala analógica visual (VAS), escore do CADESI 4 (Canine Atopic Dermatitis Extend & Severity Index), histopatológicos da pele, hematológicos, bioquímicos, efeito pirogênico das CTMs e mensuração da espessura da epiderme. Houve diferença significativa na diminuição da espessura da epiderme nos grupos moderado e severo. Os parâmetros hematológicos, bioquímicos e as temperaturas corporais se mantiveram dentro da normalidade para a espécie, sem efeitos colaterais. O grau de prurido diminuiu e houve diminuição da hiperplasia da epiderme e do edema superficial.

**TERMO DE INDEXAÇÃO:** atopia, prurido, imunorregulação

## **ABSTRACT**

Canine atopic dermatitis (AD) is a pruritic chronic inflammatory skin disease, of genetic origin, that involves environmental factors. The aim of the present study is to evaluate the efficacy of treatment with allogeneic stem cells derived from adipose tissue of dogs (CTMs) in dogs with AD. Sixteen dogs were selected and divided into three groups, which were classified as mild, moderate and severe according to CADESI4. The protocol recommended in this experiment was  $2 \times 10^6$ /kg body weight of CTMs endovenous, with intervals of applications of 21 days. The parameters of pruritus were evaluated by visual analogue scale (VAS), CADESI 4 (Canine Atopic Dermatitis Extend & Severity Index), histopathological findings of the skin, hematological, biochemical, pyrogenic effect of CTMs and measurement of epidermal thickness. There was a significant difference in the reduction of epidermal thickness in the groups classified as moderate and severe. Hematological, biochemical and body temperature parameters remained within normal limits for the species, with no side effects. The study observed a decrease on the degree of pruritus and also in epidermal hyperplasia and superficial edema.

**Term of indexation:** atopy, pruritus, immunoregulation

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1-** modelo de avaliação clínica baseado no CADESI 4 (Olivry et al. 2014) em relação aos grupos do experimento – leve, moderado e severo.....18
- Figura 2-** Delineamento experimental do protocolo de tratamento..... 19
- Figura 3-** Representação dos marcadores celulares na Imunofenotipagem das CTMs. (A) controle positivo de CD29, (B) controle positivo de CD90, (C) controle positivo de CD44, (D) controle positivo SOX<sub>2</sub> e (E) controle positivo OCT3.4. Citometria de fluxo com Amnis®.....24
- Figura 4-** Análise por citometria de fluxo das CTMs após o descongelamento: células mortas (A), necróticas (B), vivas (C) e apoptóticas (D).....25
- Figura 5-** Imagens das diferentes etapas do processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais). (A) diferenciação em condrócitos, (B) diferenciação em osteócitos e (C) diferenciação em adipócitos. Barra 10µm, aumento 400x.....25
- Quadro 1-** Representação dos valores relativos (%) obtidos para CADESI-04, grupos leve, moderado e severo. Dias avaliados D0, D10, D31, D52 e D82. Escore CADESI 4: N/AD, sem lesões ou remissão; Mi, leve; Mod, moderado; sev, severo.....26
- Quadro 2-** Representação dos valores relativos (%) para a determinação da Escala visual de prurido (VAS) referente aos dias D0, D10, D31, D52, D82. Pacientes dos grupos leve, moderado e severo. Graus de prurido: ESV-10, extremamente severo; SV-8, severo; MD-6, moderado; MI-4, leve; VMI-2 muito leve; NO-0, sem prurido.....27
- Figura 6-** Mensuração da espessura da epiderme. (A), paciente macho, lhasa, grupo leve antes do tratamento dia D0. (B), o mesmo paciente após o tratamento dia D82. (C), paciente fêmea, shih tzu, grupo moderado antes do tratamento dia D0. (D), a mesma paciente dia D82 com diferença significativa com relação ao dia D0. (E), paciente buldogue francês, fêmea, grupo moderado antes do tratamento D0. (F), a mesma paciente dia D82 apresentou diferença significativa com relação ao dia D0. Barra 10µm, aumento 400x.....30

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1-</b> Representação dos dados descritivos empregados no delineamento experimental. Pacientes selecionados para o experimento (Sexo: F, fêmeas, M, machos; §Raça: BF, Buldogue francês JR, Jack russel, LA, Lhasa apso, ST, Shih tzu, CT, Cotton de tular, M, Maltês; *VAS: Escala visual de prurido; °CAD: CADESI-04, Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index version 4).....	17
<b>Tabela 2-</b> Valores obtidos para os dados hematológicos e bioquímicos – ALT, creatinina. Nos dias 10, 31 e 52. Grupos leve, moderado e severo. Abs, valor absoluto; Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas $p \leq 0,05$ .....	27
<b>Tabela 3-</b> Tabela descritiva da temperatura corporal (°C) avaliada entre os períodos das aplicações de CTMs. Dias D10, D31, D52.....	28
<b>Tabela 4-</b> Mensuração da espessura da epiderme em $\mu\text{m}$ nos dias D0 e D82, grupos leve moderado e severo. TTO, tratamento. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas $p \leq 0,05$ .....	29
<b>Tabela 5-</b> Frequência de ocorrência (%) dos achados da avaliação histopatológica dos diferentes grupos antes e após a aplicação de CTMs, dias 0(D0) e 82(D82), parâmetros avaliados- infiltrado inflamatório perivascular, hiperplasia da epiderme, edema superficial e hiperqueratose, grupos leve, moderado e severo.....	31
<b>Tabela 6-</b> Valores absolutos da quantificação do número de mastócitos antes do tratamento com CTMs (D0) e após (D82) para os diferentes grupos avaliados..	31

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES**

DA – Dermatite atópica  
Th1 – Linfócito T helper 1  
Th2 – Linfócito T helper 2  
IgE – Imunoglobulina E  
CTMs – Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo  
TEWL – Perda de água transepidermica  
FLG – Filagrina  
IL 4 – Interleucina 4  
IL 13 – Interleucina 13  
IL 6 – Interleucina 6  
IL 17 – Interleucina 17  
IL 10 – Interleucina 10  
IL 5 – Interleucina 5  
IL 22 – Interleucina 22  
IL 23 – Interleucina 23  
IL 31 – Interleucina 31  
IFN $\gamma$  – Interferon gama  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
NK – Natural killer  
PGE2 – Prostaglandina 2  
COX 2 – Ciclo-oxigenase 2  
TGF $\beta$ 1 – Fator de transformação do crescimento beta 1  
CADESI 4 - Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index version 4  
VAS – Escala visual de prurido  
ALT – Alanina aminotransferase  
H&E – Hematoxilina-eosina  
EV – Via endovenosa  
CRI - International Center for Biotechnology  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
SFB – Soro fetal bovino  
IgM – Imunoglobulina M  
PI – Iodeto de propídio  
VG – Volume globular  
PPT – Proteínas plasmáticas totais

## **CAPÍTULO 1**

## INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença genética de caráter inflamatório e pruriginoso que acomete os cães, a prevalência desta afecção é de, aproximadamente, 15% da população canina (Crosgrave et al. 2013). A DA é multifatorial, com interações ambientais, como estresse, aeroalérgenos, trofoalérgenos e condição imunológica (Bizikova et al. 2015), além da alteração da barreira cutânea decorrente da diminuição dos lipídeos (ceramidas) interlamelares (Shimada et al. 2009).

Na DA, há uma exacerbação da resposta imunológica, na fase aguda há um predomínio de estímulo dos linfócitos T helper 2 (Th2) com liberação de citocinas pró-inflamatórias, eosinófilos, degranulação de mastócitos e imunoglobulina E (IgE) (Majewska et al. 2016; Pucheu-Haston et al. 2015). Na fase crônica ocorre uma resposta predominante de linfócitos T helper 1 (Th1), mas também existe nesta fase resposta Th2 (Olivry et al. 2016).

As terapias preconizadas atualmente são uso sistêmico por via oral de imunossuppressores como corticoides, ciclosporina e oclacitinib, associados às loções, pipetas e cremes compostos por hidratantes, emolientes e umectantes para recompor a barreira da pele (Crosgrave et al. 2013; Olivry et al. 2010). Terapias coadjuvantes com imunoterapia alérgeno específico colaboram para atenuar os efeitos da DA no organismo (Olivry et al. 2010).

A DA altera a qualidade de vida tanto do cão como do proprietário, principalmente devido ao prurido. É de grande importância o avanço na pesquisa com relação ao tratamento da DA, por ser uma doença emergente. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o uso sistêmico de células tronco mesenquimais alógenas (CTMs) pela via endovenosa (EV) como forma de tratamento adjuvante em pacientes atópicos, como também demonstrar a segurança e possíveis efeitos colaterais.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Dermatite Atópica

A dermatite atópica (DA) é definida como uma doença alérgica inflamatória e pruriginosa com predisposição genética em cães (Hensel et al. 2015). É caracterizada pela disfunção da barreira epidérmica, com recorrentes inflamações e apoptoses dos queratinócitos (Jee et al. 2013). Está associada à produção de IgE que atua contra os alérgenos ambientais (Bizikova et al. 2015). Segundo Shimada et al. (2008), há correlação positiva da perda de água transepidérmica (TEWL) e o dano na barreira da pele. O aumento da TEWL está associado à diminuição dos níveis de ceramidas em cães com DA (Shimada et al. 2009). As moléculas de ceramidas localizam na camada dupla lipídica, é composta por esfingosinas e ácidos graxos (Madison, 2003).

As principais regiões afetadas nos cães incluem áreas distais dos membros, região perioral, axilas, regiões interdigitais, pavilhões auriculares, barriga, períneo e flexuras. É comum apresentar eritema, erupções papulares, alopecia auto induzida pelo prurido, escoriações, xerose, eczema, hiperpigmentação e liquenificação, além das infecções secundárias bacterianas e por malassezia (Leung et al. 2004, Bizikova et al. 2015). Em cães, devido a redução dos ceramídeos e alteração da estrutura da camada córnea, sugere-se uma disfunção da barreira da pele similar aos humanos. Estudos indicam que essa disfunção ocorre por causa da mutação da filagrina (Asahina & Maeda, 2017).

Em humanos, é demonstrado que a mutação da filagrina é um dos fatores mais relevante no risco do desenvolvimento na DA (Osawa et al. 2011). A filagrina é uma proteína importante na formação da barreira cutânea, é precursor da profilagrina que atuará na formação dos grânulos de cerato-hialina que compõem o estrato granuloso da epiderme (Manabe et al. 1991), são considerados fatores hidratantes naturais da pele. A filagrina (FLG) é conhecida por ser uma proteína chave para a barreira da pele (Rawlings & Harding. 2004). Em cães com DA, há

correlação da deficiência de FLG, porém ainda faltam mais estudos que determinem a correlação a esta mutação (Kanda et al. 2013).

Cães com DA são acometidos por infecções recorrentes bacterianas e por leveduras, principalmente a *Malassezia pachydermatis* na pele e nos condutos auditivos (De Boer & Marsella. 2001). O agente mais isolado nas infecções secundárias por bactéria é o *Staphylococcus pseudintermedius* (Mason et al. 1996).

*Malassezia pachydermatis* é uma levedura que habita de forma comensal a pele dos mamíferos em geral e alguns selvagens. São lipofílicas não dependentes e se tornam patógenos oportunistas em situação de desordens imunológicas da pele, favorecendo as infecções cutâneas e otites (Gaitanis et al. 2012). Estudos demonstram que *Malassezia spp* tem aptidão para produzir melanina (Youngchim et al. 2013), com objetivo de proteção das células fúngicas contra fatores ambientais, radiação ultravioleta, imunossupressores, agentes antioxidantes aumentando o fator de virulência, com isso, favorece a patogenicidade e sobrevivência na pele, além de liberar enzimas como proteases, fosfolipases que são pró-inflamatórias e intensificam o prurido (Nosanchuk et al. 2015).

Tanto em humanos como em cães com DA, há alteração na barreira cutânea (Marsella et al. 2011), sendo um fator importante na patogênese da doença pois leva ao aumento da sensibilização alérgica (Olivry et al. 2011). Segundo Saridomichelakis & Olivry (2015), com a barreira defeituosa da pele, ocorre a exposição de alérgenos por via percutânea, estes alérgenos ambientais são capturados pelas células dendríticas que migram para o linfonodo para apresentar o antígeno ao linfócito T (CD4+), a diferenciação do CD4+ em linfócito Th2 aumenta a maturação de anticorpos alérgenos específicos B e a produção de IgE, a qual se ligará aos mastócitos. A degranulação dos mastócitos estimula a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos, prostaglandinas e várias citocinas que recrutam células inflamatórias para dentro da pele. Orciani et al. (2017) citam que na DA ocorre um desbalanço das respostas Th2 com Th1-Th17 na fase aguda da doença, no entanto, há um misto das respostas Th1/Th2 na fase crônica. Em camundongos com DA, foi demonstrado o aumento das citocinas IL 4, IL 13, IL 6, IL 17, interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e diminuição da expressão de IL 10 (Kim et al. 2018). Nos cães atópicos, normalmente, o linfócito Th0 induz uma resposta imunológica do tipo Th2, com aumento de algumas interleucinas, como por exemplo a IL4, IL5, IL6, IL13, estimulando a liberação de mediadores inflamatórios e a produção de IgE (Nuttall et al. 2002).

O diagnóstico da DA é clínico e se faz por exclusão de doenças pruriginosas como dermatite alérgica à saliva de pulga, escabiose, pediculose, otoacariase, demodicose, infecções secundárias na pele por bactérias e malasseziose, dermatite de contato, hipersensibilidade alimentar (Kennis, 2006) e tumores cutâneos como linfomas (DeBoer & Hillier, 2001, Hensel et al. 2015). Além da exclusão das doenças citadas, são aplicados os critérios de Fravot, pelos quais aumentam a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico. Os critérios foram subdivididos em subtipos, sendo o primeiro os seguintes fatores: início dos sinais clínicos com menos de 3 anos, cão intradomiciliar, prurido responsivo ao glicocorticoide, infecções por levedura recorrente ou crônica, patas dianteiras afetadas, pavilhão auricular acometido, margens auriculares não afetadas, área dorsolombar polpada. Ao apresentar cinco critérios, a especificidade é de 85,4% e a sensibilidade, 79,1%; em seis critérios, a especificidade é de 88,5% e sensibilidade 58,2%. No segundo subtipo: início dos sinais clínicos antes de 3 anos de idade, cão intradomiciliar, fase inicial com prurido sem lesão, patas dianteiras afetadas, acometimento das pinas, margens auriculares não afetadas e região dorsolombar não afetada. Neste caso, se o paciente apresentar cinco critérios a sensibilidade é de 77,2% e especificidade em 83% e com seis critérios a sensibilidade será de 42% e especificidade 93,7% (Hensel et al. 2015).

Para auxiliar o diagnóstico da DA, podem ser realizadas biópsias de pele. Na avaliação histopatológica da pele, pode apresentar padrão inflamatório perivascular superficial, infiltrado de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, hiperplasia da epiderme, exocitose (Olivry et al. 2001, Marsella et al. 2006).

Os testes alérgenos específicos e painéis sorológicos são ferramentas coadjuvantes para auxiliar na definição do perfil alérgico do paciente (Hensel et al. 2015).

O tratamento da DA se baseia na investigação das causas de base, controle das infecções secundárias bacterianas (Hillier et al. 2014, Olivry et al. 2015) e por *Malassezia sp* (Pinchbeck et al. 2002, Berger et al. 2012). É fundamental o uso de xampus e hidratantes específicos para recompor a barreira cutânea, a frequência de banho varia de acordo com cada paciente (Bensignor & Bourdeau, 2013, Bourdeau et al. 2007). O controle do prurido e das lesões cutâneas se faz pelo uso de glicocorticoides orais ou tópicos, ciclosporina oral e oclacitinib (Kovalik et al. 2011, Cosgrove et al. 2013, Nam et al. 2012, Gadeyne et al. 2014). É recomendada a aplicação tópica de compostos lipídicos com ceramidas, ácidos graxos e colesterolis para auxiliar na recomposição da barreira cutânea (Piekutowska et al. 2008, Popa et al. 2012). A imunoterapia alérgeno específica é usada como tratamento coadjuvante com o

objetivo de minimizar as crises e aumentar a tolerância aos alérgenos ambientais (Carlotti et al. 2013).

## 1.2. Células Tronco

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes, indiferenciadas presentes em diversos tecidos adultos (Foudah et al. 2014). Podem ser isoladas do tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical, medula óssea, entre outros (Pittenger et al. 1999, Jiang et al. 2002, Bianco et al. 2008, Lee et al. 2013 ). Essas células, indiferenciadas, exercem duas ações principais: diferenciação em tecidos da linhagem mesenquimal e efeito parácrino. O efeito de diferenciação manifesta-se para alguns tecidos, como adipócitos, osteoblastos, miócitos, condrócitos, células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (Gao et al. 2016). Já o efeito parácrino relaciona-se com a liberação de moléculas bioativas (de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas, receptores de fatores de crescimento) que permitem uma interação com o meio no qual elas são transplantadas, de forma que, ao se unir com as células do organismo, modulam a resposta inflamatória e mitose das células que estão relacionadas ao processo de reparação tecidual e promovem a imunomodulação (Huss, 2000, Bobis et al. 2006, Wan et al. 2008, Caplan, 2009). Ainda, as CTMs estimulam a liberação de fatores imunorregulatórios e fatores de crescimento auxiliando na reparação tecidual (Prockop & Oh, 2012), podendo ser aplicadas no tratamento de doença inflamatória intestinal, autoimune, esclerose múltipla, diabetes tipo I, artrite, doenças alérgicas, asma e doença do enxerto contra o hospedeiro (Le Blanc et al. 2004, Zappia et al. 2005, Augello et al. 2007, Gonzales et al. 2009, Sun et al. 2012, kim et al. 2015). Segundo Asari et al. (2009) e Prigione et al. (2009), as CTMs atuam tanto na imunidade inata quanto na adaptativa com efeito supressor na ativação das células T e B, dendríticas e *natural killer* (NK).

As CTMs agem na regulação da resposta imune de várias doenças, altera as respostas das células T e B, age na supressão da proliferação das células T, secreção de citocinas, citotoxicidade e agem na regulação do balanço Th1/Th2 e Treg – células T regulatórias (Gao et al. 2016), impede o aumento sérico de prostaglandina-2 (PGE-2) que estimula IL22 (Kim et al. 2015), a qual tem um papel importante na patogênese da DA na indução da produção de queratinócitos que liberam citocinas de resposta Th2 (Lou et al. 2017).

Na dermatite atópica, a terapia com célula tronco apresenta resultado promissor pela imunomodulação na maturação do linfócito B via COX-2 (Tae et al. 2017) e degranulação dos mastócitos (Le Blanc & Mougiakakos, 2012, Kim et al. 2015, Shin et al. 2017).

Estudos experimentais realizados por Lee et al. (2011) e Firinci et al. (2011) mostraram que a aplicação sistêmica de CTMs reduz a concentração de IgE e as citocinas liberadas pelo Th2, tais como, IL-4, IL-5 e IL-13, além de inibir o processo inflamatório, segundo Cho et al. (2018), podem diminuir a expressão das citocinas IL 23, IL31 e TNF  $\alpha$  em camundongo com DA. As CTMs levam a mudança de resposta Th2 para Th1 em doenças inflamatórias de fundo alérgico, incluindo rinite alérgica (Cho et al. 2009) e asma (Cho et al. 2010) em ratos. As CTMs possuem a capacidade de inibir a maturação e a ativação das células dendríticas (Gao et al. 2016).

Segundo Jee et al. (2013), as células tronco autólogas mesenquimais derivadas do tecido adiposo melhoraram significativamente os sintomas da dermatite atópica canina, estimulando a liberação de citocinas imunomodulatórias IL10 e TGF $\beta$ 1. Kim et al. (2018) relataram que a aplicação de CTMs minimizou os sinais clínicos da DA, como também diminuiu a hiperplasia e infiltração linfocitária. Estudos anteriores indicam que os tratamentos são seguros e normalmente não causam efeitos colaterais em humanos (Le Blanc et al. 2008; Karussis et al. 2010, Connick et al. 2012).

## CAPÍTULO 2

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Delineamento Experimental

Foram selecionados dezesseis cães com diagnóstico clínico de dermatite atópica, oito fêmeas e oito machos, com idade entre um e doze anos. Os animais foram incorporados tomando como base o fato de apresentarem lesões cutâneas não induzidas, mas sim evidenciadas semiologicamente por meio de avaliação empírica. A gravidade dos sinais clínicos foi verificada de acordo com a aplicação dos critérios do CADESI 4 (Olivry et al. 2014) de acordo com a Tab.1. Os cães foram separados em grupos de acordo com o CADESI 4, sendo grupo leve com score de 10-34, moderado 35-59 e severo acima de 60. Os grupos foram representados na fig.1 conforme seus respectivos graus de gravidade clínica.

**Tabela 1** – Representação dos dados descritivos empregados no delineamento experimental. Pacientes selecionados para o experimento (Sexo: F, fêmeas, M, machos; §Raça: BF, Buldogue francês JR, Jack russel, LA, Lhasa apso, ST, Shih tzu, CT, Cotton de tular, M, Maltês; \*VAS: Escala visual de prurido; °CAD: CADESI-04, Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index version 4

Animal	Sexo	Raça §	Peso (kg)	Idade (anos)	Dia (0)		Dia 10		Dia 31		Dia 52		Dia 82	
					VAS*	CAD°	VAS*	CAD°	VAS*	CAD°	VAS*	CAD°	VAS*	CAD°
1	F	BF	10	1	7	28	8	23	7	28	7	21	5	6
2	M	BF	7,8	1	9	23	9	21	8	20	7	10	7	8
3	M	JR	7	7	8	24	8	23	6	20	3	4	3	5
4	M	M	6	4	8	16	8	16	6	10	5	7	4	4
5	M	LA	7,6	9	6	17	6	17	5	9	5	9	5	4
6	M	ST	7,9	8	8	23	8	23	8	35	7	28	5	13
7	F	CT	7,3	1	8	28	8	28	8	20	8	16	8	14
8	F	BF	11	4	8	54	8	56	8	50	7	28	6	29
9	M	ST	7,1	10	8	35	8	32	7	24	6	21	7	16
10	F	ST	5,2	5	8	35	8	29	7	18	7	19	7	19
11	M	M	6	5	10	83	10	83	10	88	10	98	10	101
12	F	BF	12,2	4	10	125	8	119	8	95	6	87	3	48
13	M	LA	7	6	9	100	10	100	8	95	8	59	8	62
14	F	M	3,6	5	10	111	10	111	10	87	10	86	10	90
15	F	BF	9,3	4	10	106	8	107	8	102	8	106	8	122
16	F	LA	6,6	12	9	102	9	130	9	188	8	62	7	60



**Figura 1** – Modelo de avaliação clínica baseado no CADESI 4 (Olivry et al. 2014) em relação aos grupos do experimento – leve, moderado e severo.

Na triagem dos animais, foram descartadas doenças pruriginosas ectoparasitárias, sendo estabelecida restrição alimentar com ração hipoalergênica por oito semanas para descartar hipersensibilidade alimentar. Para controle da infecção secundária da pele por bactérias e leveduras, estabeleceu-se o uso do shampoo antisséptico composto por nitrato de miconazol 2% e gluconato de clorexidina 2% - Cloresten® (Hillier et al. 2014).

## 2.2. Randomização e Tratamento da Dermatite Atópica

### 2.2.1. Períodos avaliados entre os grupos

#### 2.2.1.1. Dia zero (D0)

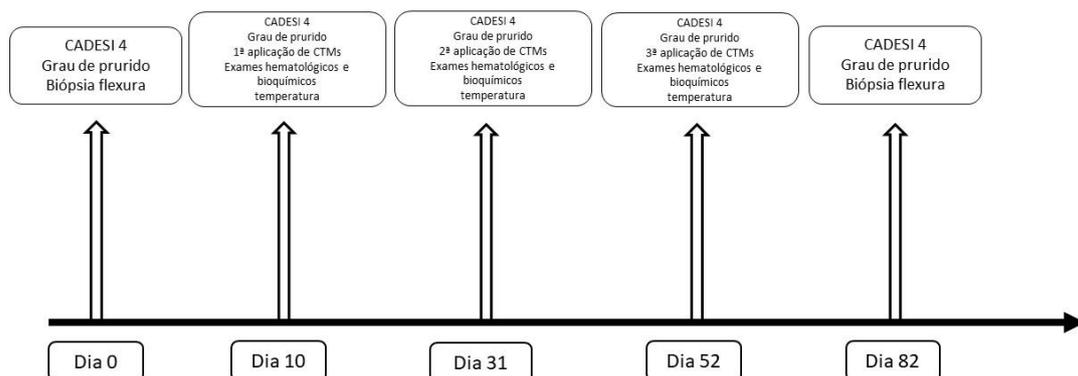
Foi realizada a avaliação diagnóstica da afecção baseada nos critérios de Favrot (Hensel et al. 2015). No dia zero (D0), os pacientes foram submetidos à avaliação do escore preconizado por CADESI 4 (Olivry et al. 2014) e ainda estabelecido o grau de prurido determinado pelo escore da escala visual (VAS) (Rybníček et al. 2009). Biópsia com *punch* de 6mm da pele na flexura direita, foi utilizada anestesia local na dose de 0,8 ml de cloridrato de lidocaína 2% sem vaso constritor.

### 2.2.1.2. Dias 10(D10), 31 (D31) e 52 (D52)

Visando o estabelecimento e relação de fatores orgânicos com os momentos de aplicação das CTMs nos dias 10 (D10), 31 (D31) e 52 (D52) os animais foram submetidos à colheita por venopunção da jugular de amostra sanguínea para avaliação hematológica, tais como, hemograma completo, função hepática (alanina aminotransferase - ALT ) e função renal (creatinina) antes da aplicação endovenosa de CTMs. Foram mensuradas as temperaturas retais antes, cada animal, dos diferentes grupos, antes, imediatamente após e após uma hora da aplicação de CTMs (Sun et al. 2016). Bem como, avaliação por meio do CADESI 4 e grau de prurido. Os cães receberam  $2 \times 10^6$ /kg diluído em soro ringer com lactato (50 ml) nos dias 10, 31 e 52 (o tratamento será relatado posteriormente).

### 2.2.1.3. Dia 82 (D82)

No dia 82 (D82), foram feitas as biópsias com punch de 6mm da pele da flexura direita de cada paciente com anestesia local na dose de 0,8ml de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor, avaliação do CADESI 4 e grau de prurido.



**Figura 2-** Desenho esquemático do delineamento experimental do protocolo de tratamento empregado.

### **2.3. Processamento e Avaliação Histopatológica das Biópsias de Pele**

Os fragmentos de pele, dos animais de cada um dos grupos, nos dias zero (D0) e 82 (D82) foram clivados e submetidos a fixação por imersão em solução aquosa a 10% de formaldeído. Em seguida foram incluídos em parafina histológica e seccionados em micrótomo histológico a 4µm de espessura (Elder et al. 2008). De cada fragmento avaliado, foram obtidas duas lâminas, sendo uma corada com H&E e a outra com azul de toluidina. Para quantificação dos mastócitos, as lâminas foram avaliadas as coradas com azul de toluidina e daí obtidos a quantidade relativa de mastócitos evidenciados da epiderme dos animais dos diferentes grupos nos dias D0 e D82, de acordo com o preconizado por Elder et al. (2008) estabelecido a partir da soma de 10 campos no aumento (400x). A partir das lâminas obtidas foram avaliadas alterações tais como caracterização do infiltrado inflamatório perivascular, hiperplasia da epiderme, edema superficial da derme e hiperqueratose (Olivry & Hill, 2001). Para a determinação da espessura da epiderme, foi utilizada câmera digital e software de análise de imagens (ProgResCapturePro 2.5<sup>®</sup>) que foram acoplados ao microscópio Nikon binocular E200.

### **2.4. Tratamento da Dermatite Atópica a Partir da Aplicação de CTMs**

A partir da casualização dos diferentes grupos acometidos por dermatite atópica, os animais foram submetidos ao tratamento a partir de três aplicações de  $2 \times 10^6$ /kg (Villatoro et al. 2018b) de células tronco mesenquimais (CTMs) acrescido de soro ringer com lactato no volume de 50 ml, com intervalos de 21 dias, por via endovenosa periférica (EV).

### **2.5. Isolamento, Cultivo, Imunofenotipagem e Congelamento de CTMs**

Os protocolos de isolamento, cultivo e congelamento foram realizados nos Laboratórios BIOCELL e International Center for Biotechnology (CRI). As CTMs foram isoladas e cultivadas a partir de tecido adiposo de um cão doador saudável, da raça shih tzu de três anos de idade, fêmea, de acordo com protocolos descritos (Lindroos et al. 2011, Romagnoli & Brandi, 2014, De Francesco et al. 2015). Para a coleta do tecido adiposo, o doador foi submetido à anestesia. O protocolo anestésico usado foi 0,3mg/kg de metadona e 0,02mg/kg de acepromazina pela via intramuscular (Fantoni, 2002), realizou-se uma incisão de aproximadamente dois centímetros na região lombar e, aproximadamente, 20 gramas de tecido

adiposo foram retirados da base da cauda. O tecido adiposo foi lavado em solução salina 0,9% para remover resíduos celulares e sanguíneos, cortado em pequenos pedaços e, em seguida, exposto à hialuronidase, para passar por uma digestão enzimática. Depois disso, as células foram submetidas a um processo de filtração para iniciar uma seleção das CTMs. Posteriormente, as células foram colocadas em frascos de cultura com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e foram incubadas a 37,5 °C e 5% na presença de gás carbônico. Após 24 horas, o meio foi descartado juntamente com as células não aderentes, e meio de cultura fresco foi adicionado às garrafas. O meio foi trocado uma vez a cada três dias, até as células atingirem 80% de confluência, quando a tripsinização foi realizada para retirar as células das garrafas promoveu-se a quantificação destas na câmara de Neubauer. posteriormente foram envasadas em palhetas (1 milhão de células / palheta) para congelamento juntamente com dimetilsulfóxido (DMSO) e soro fetal bovino (SFB) em nitrogênio líquido (De Rosa et al. 2009, Cui & Pu, 2010). Cinco palhetas (5 milhões de células) foram descongeladas para caracterização de CTMs.

Uma parte das células congeladas ficou armazenada em botijão de nitrogênio líquido para utilização na terapia. Dois milhões de células foram descongeladas e acondicionadas em seringas de 1 ml, encaminhadas para a clínica Pet especialidades e aplicadas com 50 ml de ringer com lactato por via endovenosa, através da veia cefálica.

## **2.6. Caracterização das CTMs**

Parte das células foi encaminhada para a CRI afim de realizar a caracterização molecular através da citometria de fluxo com quantificação por imagem, avaliando também o grau de pureza, funcionalidade e a viabilidade de tais células através da identificação de marcadores moleculares específicos, encontradas apenas em células-tronco. Os testes de caracterização molecular das CTMs foram realizados conforme determinado pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (Dominici et al. 2006). Foram incubadas  $1 \times 10^6$  de células com anticorpos específicos, sendo os marcadores de indiferenciação de superfície positivos para as CTMs testados: CD29-RD1 de rato anti-humano, CD44-FITC de rato anti-equino, caprina anti-canina CD90 primária e IgM de rato conjugado anti-caprino AF594 (secundário). O marcador de superfície negativo foi CD34-FITC anti-humano de rato. A função das CTMs também foi analisada pela presença de dois fatores de transcrição de pluripotência (marcadores intranucleares) SOX2 e OCT3 / 4. Esses marcadores foram avaliados pelo método de

imunofenotipagem por citômetro de fluxo de Imagem Amnis® (fig.3).

A capacidade das células se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos também foi confirmada (fig.5), como descrito anteriormente (De Francesco et al. 2015, Marx et al. 2015). As células foram avaliadas quanto a contaminantes (bactérias, fungos, micoplasma), utilizando a reação em cadeia com polimerase (Veriti Thermal Cycler - ThermoFischer Scientific). Além disso, a viabilidade das células após o descongelamento foi avaliada por citômetro de fluxo com o kit de anexina Alexa Fluor™ 488 e iodeto de propídio (PI) (ThermoFischer Scientific™) no citômetro de fluxo de imagem Amnis® (fig.4).

## **2.7.Análise Estatística**

Os dados relativos ao CADESI-4 e grau de Prurido foram avaliados diante da frequência de ocorrência para os diferentes aspectos observados, em relação aos grupos. Em relação aos dados do hemograma, estes foram avaliados por meio da aplicação de uma análise descritiva a obtenção da média e desvio padrão de cada um destes. A análise descritiva também foi aplicada para obtenção da média e desvio padrão em relação as quantificações do TGP e creatinina, bem como para a variação da temperatura corporal, quantificação da espessura da epiderme e do número de mastócitos, obtendo-se assim, a média e desvio padrão em relação a cada um dos grupos. Estes dados foram ainda submetidos a aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov, visando avaliar a normalidade. Em seguida a TGP e a temperatura foram avaliadas a partir da aplicação do teste one-way Anova, com pós teste de Tukey's de múltipla comparação. Já a creatinina foi submetida a aplicação do teste one-way Anova, com pós teste de Dunn's de múltipla comparação. A espessura da epiderme foi avaliada a partir da aplicação do teste T e o número de mastócitos foram avaliados a partir da aplicação do teste Mann Whitney. A análise foi realizada usando o software Sigma-Stat 3.5 em  $p \leq 0,05$ .

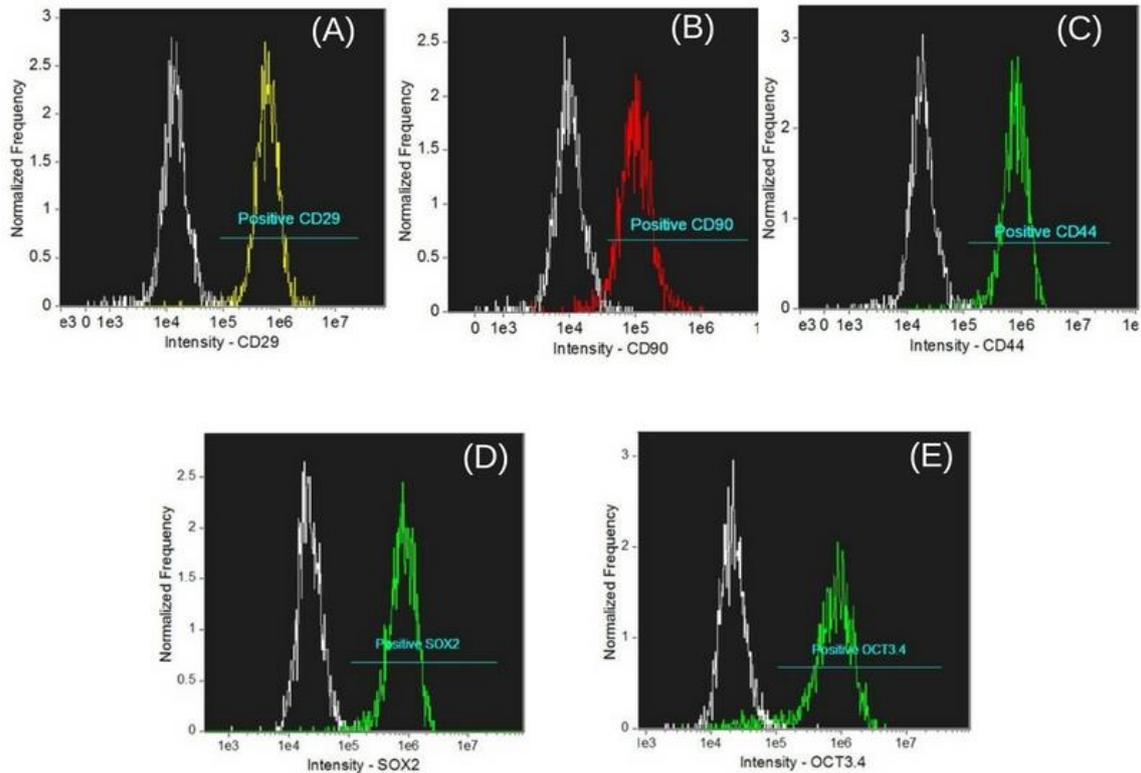
## RESULTADOS

### 3.1. Isolamento, Cultivo e Caracterização das CTMs

As CTMs foram obtidas de tecido adiposo de animal doador, sendo devidamente isoladas e caracterizadas previamente à utilização. Após 24 horas de isolamento, pequenas colônias de células aderentes foram espalhadas pelo fundo das garrafas. Após 2 dias, as células começaram a crescer e alongar-se, tornando-se um formato de fuso semelhante aos fibroblastos. O número elevado de CTMs com alta capacidade de adesão ao plástico foi obtido.

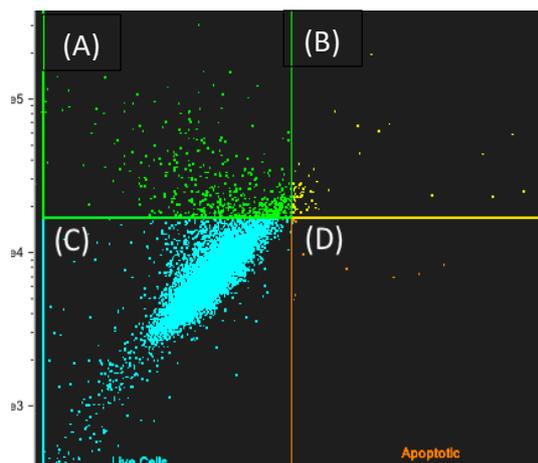
Quando as células atingiram 80% de confluência, elas possuíam características fenotípicas típicas de CTMs e estavam presas ao fundo da garrafa com uma forma fusiforme.

Os resultados da imunofenotipagem, ou seja, dos marcadores moleculares específicos de CTMs avaliados por citometria de fluxo demonstraram que as células expressaram níveis elevados de marcadores de indiferenciação de superfície CD 29, CD44 e CD90 e tiveram baixa expressão do marcador negativo, de células hematopoiéticas CD34. Ainda, apresentaram alta expressão de fatores de transcrição de pluripotência SOX2 e OCT3.4 (fig. 3). O cão doador deste trabalho apresentou alta expressão dos marcadores CD29, CD44 e CD90 em torno de 90%, como também SOX2 e Oct 3.4 apresentaram 96% e 92% respectivamente.

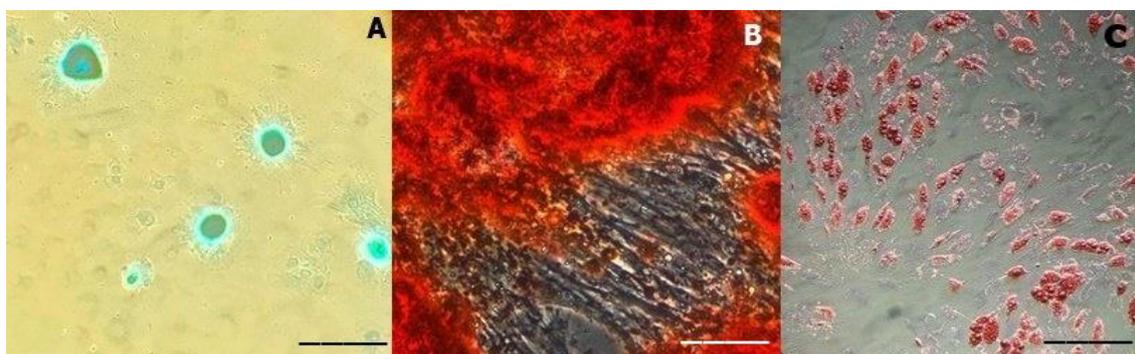


**Figura 3-** Representação dos marcadores celulares na Imunofenotipagem das CTMs. **(A)** controle positivo de CD29, **(B)** controle positivo de CD90, **(C)** controle positivo de CD44, **(D)** controle positivo SOX<sub>2</sub> e **(E)** controle positivo OCT3.4. Citometria de fluxo com Amnis®.

A análise de viabilidade com kit de anexina mostrou que 92% da população celular manteve-se viva, ao ser avaliada 30 minutos após o descongelamento, foram apontadas 8% de células em apoptose inicial e 0,06% na fase final da apoptose e início de necrose (fig. 4). Ainda, os resultados expressaram que as CTMs obtidas dos doadores mostraram consistência em seu isolamento, expansão, alta taxa de proliferação, aderência ao plástico e comportamento *in vitro*, exibindo sua capacidade de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica (fig. 5), semelhante ao que já foi anteriormente descrito (Marx et al. 2015). Por fim, o resultado de análise de contaminantes foi negativo.



**Figura 4-** Análise por citometria de fluxo das CTMs após o descongelamento: células mortas (A), necróticas (B), vivas (C) e apoptóticas (D) kit anexina. 92% de células vivas.



**Figura 5-** Imagens das diferentes etapas do processo de diferenciação das células tronco mesenquimais. (A) diferenciação em condrócitos, (B) diferenciação em osteócitos e (C) diferenciação em adipócitos. Barra 10 $\mu$ m, aumento 400x.

### 3.2. Avaliação do CADESI-4, Grau de Prurido, Exames Hematológicos, Bioquímicos e Temperatura Corporal

Neste experimento, foram selecionados cães com DA, sem uso de medicações imunossupressoras orais há três meses, receberam a mesma prescrição de terapia tópica com nitrato de miconazol 2% e gluconato de clorexidina 2% - Cloresten® para evitar infecções secundárias durante o estudo. Os cães foram divididos em três grupos, leve, moderado e severo, de acordo com o grau de severidade da doença, baseado no CADESI-04.

O CADESI-04 de cada paciente foi estabelecido na triagem no dia zero (D0) para a separação dos grupos. No grupo leve, foi observado no dia 82, trinta dias após a última aplicação, um predomínio de 71,42% (5/7) do score para abaixo de 10. No grupo moderado, nos dias 52 e 82 demonstrou 100% (3/3) apresentaram score leve. Com relação ao grupo severo,

nos dias 52 e 82, o escore diminuiu em 16,67% (1/6) para o grau moderado, os demais permaneceram severos (quadro 1).

**Quadro 1-** Representação dos valores relativos (%) obtidos para CADESI-04, grupos leve, moderado e severo. Dias avaliados D0, D10, D31, D52 e D82. Escore CADESI 4: N/AD, sem lesões ou remissão; Mi, leve; Mod, moderado; sev, severo

CADESI-4					
Grupo leve					
	D0	D10	D31	D52	D82
N/ remission	-	-	14,29	42,86	71,42
Mi	100	100	71,42	57,14	28,58
Mod	-	-	14,29	-	-
Sev	-	-	-	-	-
Grupo moderado					
	D0	D10	D31	D52	D82
N/ remission	-	-	-	-	-
Mi	-	-	66,37	100	100
Mod	100	100	33,33	-	-
Sev	-	-	-	-	-
Grupo severo					
	D0	D10	D31	D52	D82
N/ remission	-	-	-	-	-
Mi	-	-	-	-	-
Mod	-	-	-	16,67	16,67
Sev	100	100	100	83,33	83,33

O grau de prurido foi observado, de acordo com a escala visual de prurido (VAS) no dia 82 (D82), com relação ao grupo leve, apontou 42% no grau moderado. Com relação ao grupo moderado, 66,% mantiveram o grau severo. O escore da escala visual de prurido observado no grupo severo, demonstrou 33,33% extremamente severo, 50% severo (quadro 2).

**Quadro 2-** Representação dos valores relativos (%) para a determinação da Escala visual de prurido (VAS) referente aos dias D0, D10, D31, D52, D82. Pacientes dos grupos leve, moderado e severo. Graus de prurido: ESV-10, extremamente severo; SV-8, severo; MD-6, moderado; MI-4, leve; VMI-2 muito leve; NO-0, sem prurido

Grau de prurido					
Grupo leve					
	D0	D10	D31	D52	D82
ESV-10	14,29	14,29	-	-	-
SV-8	71,42	71,42	57,14	57,14	28,57
MD-6	14,29	14,29	42,86	28,58	42,86
MI-4	-	-	-	14,28	28,57
VMI-2	-	-	-	-	-
NO-0	-	-	-	-	-
Grupo moderado					
	D0	D10	D31	D52	D82
ESV-10	-	-	-	-	-
SV-8	100	100	100	66,67	66,67
MD-6	-	-	-	33,33	33,33
MI-4	-	-	-	-	-
VMI-2	-	-	-	-	-
NO-0	-	-	-	-	-
Grupo severo					
	D0	D10	D31	D52	D82
ESV-10	83,33	66,67	50	33,33	33,33
SV-8	16,67	33,33	50	50	50
MD-6	-	-	-	16,67	-
MI-4	-	-	-	-	16,67
VMI-2	-	-	-	-	-
NO-0	-	-	-	-	-

Nos grupos leve e severo, os parâmetros hematológicos e as enzimas ALT (alanina aminotransferase) e creatinina não apresentaram alterações significativas nos dias das aplicações das CTMs, conforme descrito abaixo (tab. 2). Os valores de VG (volume globular) e hemácias no grupo moderado demonstraram uma diferença significativa entre os dias 10 e 52, porém dentro do valor de normalidade para a espécie, como também os valores dos linfócitos entre os dias 10 e 21 (tab. 2).

**Tabela 2-** Valores obtidos para os dados hematológicos e bioquímicos – ALT, creatinina. Nos dias 10, 31 e 52. Grupos leve, moderado e severo. Abs, valor absoluto; Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas  $p \leq 0,05$

Grupo leve			
Parâmetros	D10	D31	D52
Volume Globular (%)	51±4,08	51,86±5,15	50,86±3,58
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7,58±0,93	7,53±1,15	7,94±0,73
Hemoglobina (g/dL)	17,19±1,33	17,31±1,88	17,07±1,12
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9,31±2,31	8,7±1,88	8,6±1,55
Segmentados abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	2703±3462	5014±2710	5987±936,8
Linfócitos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1388±380,50	1482±424,4	1266±421,9
Monócitos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	703,9±525,0	543,2±285,8	513,1±155,7
Eosinófilos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	886,3±936,2	629,0±431,3	824,0±562,8
Segmentados %	68,86±11,22	69,86±8,00	70±5,56
Linfócitos %	15,29±4,88	16,43±5,74	14,43±3,04
Monócitos %	7,28±4,23	6,42±3,15	6±1,52
Eosinófilos %	8,57±7,32	7,28±3,45	9,42±5,53
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	6,94±0,77	7±0,61	6,94±0,67
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	294±98,88	266,1±81,10	259±57,95
Alanina transferase- ALT (UI/L)	58,43±49,76	56,86±37,91	68±45,94
Creatinina (mg/dL)	0,68±0,23	0,84±0,27	0,74±0,20
Grupo moderado			
Parâmetros	D10	D31	D52
Volume Globular (%)	51,57±1,72 <sup>a</sup>	49±5,97	48,43±1,81 <sup>c</sup>
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7,37±0,23 <sup>a</sup>	7±0,69	6,90±0,16 <sup>c</sup>
Hemoglobina (g/dL)	17,06±0,62	16,54±1,48	16,54±0,87
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,64±1,96	8,42±1,96	8,94±0,96
Segmentados abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5889±1353	5845±991,5	6505±664,1
Linfócitos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1917±924,60 <sup>a</sup>	2416±1142 <sup>b</sup>	1822±453,9 <sup>ac</sup>
Monócitos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	483,7±375,30	135,4±15,55	473,4±301,2
Eosinófilos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	404,6±450,7	324,3±39,75	159,4±97,54
Segmentados %	68,43±0,97	68,57±4,92	71,71±3,68
Linfócitos %	21,00±7,52 <sup>a</sup>	24,71±6,13 <sup>b</sup>	20±4,12 <sup>ac</sup>
Monócitos %	5,42±4,03	1,71±4,03	5,14±2,96
Eosinófilos %	5,14±5,01	4±0,81	2,42±0,53
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	7,42±0,63	7,31±0,19	7,62±0,21
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	352,3±23,84	338,7±101,3	378,9±80,51
Alanina transferase- ALT (UI/L)	100,4±112,5	49±17,96	51,14±37,20
Creatinina (mg/dL)	0,65±0,17	0,77±0,15	0,75±0,17
GRUPO SEVERO			
Parâmetros	D10	D31	D52
Volume Globular (%)	44,29±3,03	43,71±4,85	44,29±4,07
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7,46±2,78	6,33±0,62	6,67±0,66
Hemoglobina (g/dL)	15,19±1,33	14,34±1,70	15,11±1,21
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,50±3,63	8,57±3,68	8,25±3,57
Segmentados abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	2627±3954	3908±3986	3399±4173
Linfócitos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1080±291,1	1306±768,6	873,6±671,3
Monócitos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	647,4±415,7	756,0±596,4	492,6±388,2
Eosinófilos abs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	410,9±284,5	476,1±383,0	326±308,7
Segmentados %	76,71±3,59	71,43±6,13	76,14±8,51
Linfócitos %	10,43±3,25	14,86±3,28	9,14±3,67
Monócitos %	8,00±4,16	8,28±3,77	7±3,41
Eosinófilos %	4,85±2,26	5,28±3,72	4,14±3,80
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	7,28±0,42	7,17±0,52	7,54±0,56
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	357,0±221,4	291,6±96,01	338,7±121,0
Alanina transferase- ALT (UI/L)	33,86±14,37	35,43±12,18	45,14±39,45
Creatinina (mg/dL)	0,71±0,49	0,54±0,13	0,51±0,08

A temperatura corporal foi mensurada nos dias 10, 31 e 52, antes, imediatamente após e 1 hora após a aplicação de CTMs, não houve alteração, todos os pacientes permaneceram com os valores dentro do padrão fisiológico da espécie (tab.3).

**Tabela 3-** Tabela descritiva da temperatura corporal (°C) avaliada entre os períodos das aplicações de CTMs. Dias D10, D31, D52

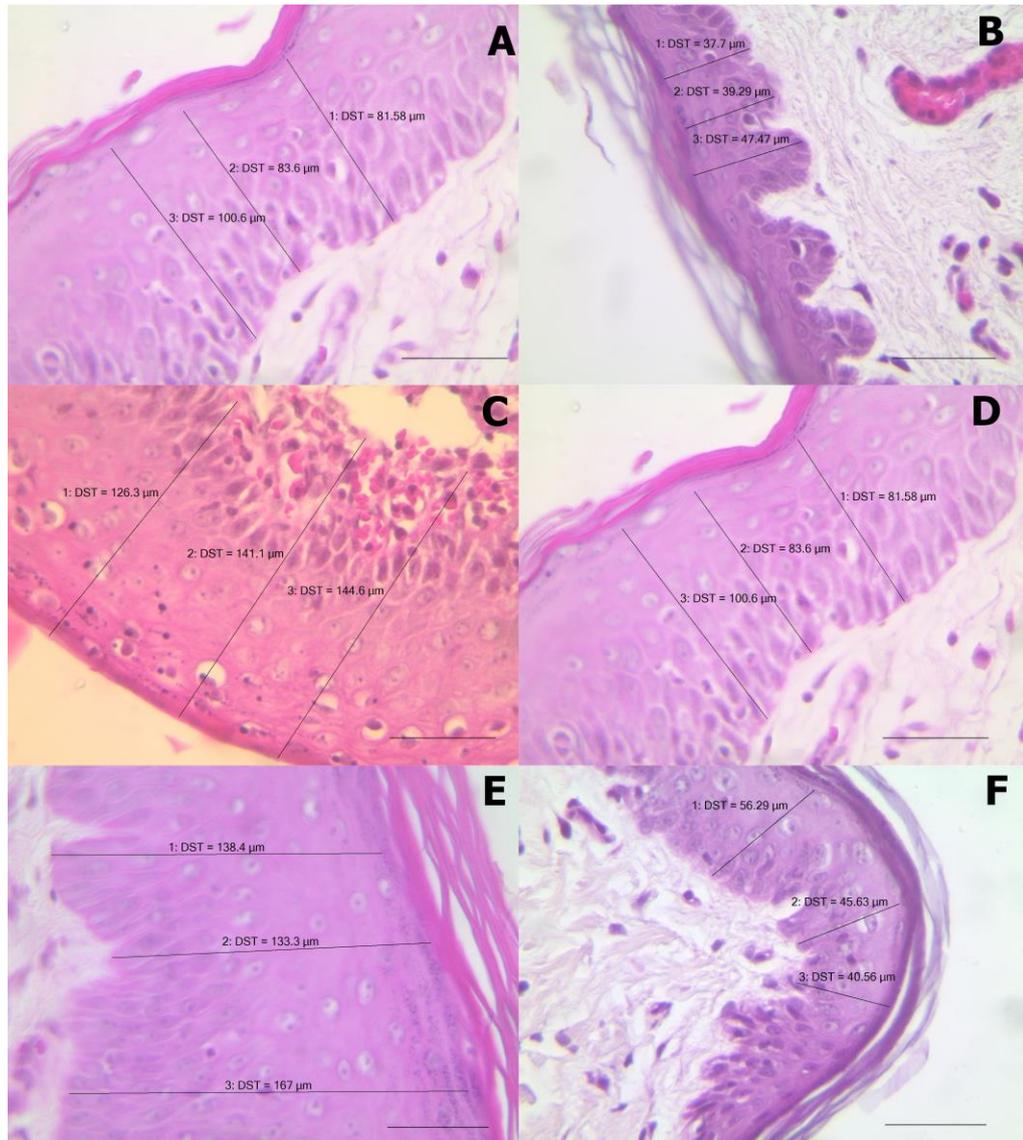
	Grupo leve			Grupo moderado			Grupo severo		
	D10	D31	D52	D10	D31	D52	D10	D31	D52
Antes aplicação	38,65±0,56	38,45±0,49	38,48±0,36	38,27±0,40	38,27±0,18	38,10±0,47	38,73±0,23	38,48±0,27	38,38±0,41
Após aplicação 1 horas após aplicação	38,32±0,57	38,2±0,68	38,22±0,47	38,07±0,22	38,07±0,10	37,9±0,0	38,47±0,36	38,23±0,23	38,32±0,34
	38±0,65	38,08±0,49	37,88±0,68	37,90±0,32	38,23±0,05	37,9±0,35	38,65±0,22	38,52±0,49	38,13±0,17

### 3.3. Mensuração da Espessura da Epiderme

Nos dias D0 e D82, os pacientes foram submetidos à biopsia com punch de 6mm na flexura direita, as espessuras das epidermes foram mensuradas. No grupo leve, mesmo com a diminuição da medida e melhora clínica com relação ao prurido e diminuição do escore do CADESI-04 não houve diferença significativa na mensuração da epiderme. Nos grupos moderado e severo foi demonstrada diferença significativa na espessura da epiderme antes e após o tratamento, entre os dias 0 (D0) e 82 (D82) como descrito na (tab.4 e fig.6).

**Tabela 4-** Mensuração da espessura da epiderme em µm nos dias D0 e D82, grupos leve moderado e severo. TTO, tratamento. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas  $p \leq 0,05$ 

Mensuração da epiderme (µm)					
Grupo leve		Grupo moderado		Grupo severo	
ANTES TTO	APÓS TTO	ANTES TTO	APÓS TTO	ANTES TTO	APÓS TTO
37,76±25,00	26,86±16,96	71,03±45,89 <sup>a</sup>	37,33±14,57	91,52±31,10 <sup>a</sup>	57,21±6,45



**Figura 6-** Mensuração da espessura da epiderme. (A), paciente macho, lhasa, grupo leve antes do tratamento dia D0. (B), o mesmo paciente após o tratamento dia D82. (C), paciente fêmea, shih tzu, grupo moderado antes do tratamento dia D0. (D), a mesma paciente dia D82 com diferença significativa com relação ao dia D0. (E), paciente buldogue francês, fêmea, grupo moderado antes do tratamento D0. (F), a mesma paciente dia D82 apresentou diferença significativa com relação ao dia D0. Barra 10µm, aumento 400x.

### 3.4. Avaliação Histopatológica

No exame histopatológico do grupo leve, foi constatada diminuição na hiperplasia com predominância nos escores leve e negativo após o tratamento, bem como também o edema superficial e hiperqueratose. O infiltrado inflamatório indicou alterações do grau leve para o negativo. No grupo moderado, foi observada uma melhora importante com relação ao edema superficial, houve mudança de escore para o grau leve em 100% dos pacientes (3/3), não foi observada mudança na hiperqueratose. No grupo severo não houve mudança expressiva quanto

à hiperqueratose, infiltrado perivascular e hiperplasia, foi indicada uma diminuição quanto ao edema superficial (tab. 5).

**Tabela 5-** Frequência de ocorrência (%) dos achados da avaliação histopatológica dos diferentes grupos antes e após a aplicação de CTMs, dias 0(D0) e 82(D82), parâmetros avaliados- infiltrado inflamatório perivascular, hiperplasia da epiderme, edema superficial e hiperqueratose, grupos leve, moderado e severo

Histopatológico – Grupo Leve								
	Infiltrado perivascular		Hiperplasia epiderme		Edema superficial		Hiperqueratose	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Negativo (-)	14,29	28,57	28,57	28,57	28,57	42,86	42,86	71,43
Leve (+)	71,42	57,14	42,86	71,43	42,86	57,14	42,86	28,57
Moderado (++)	14,29	14,29	-	-	28,57	-	14,28	-
Severo (+++)	-	-	28,57	-	-	-	-	-
Histopatológico – Grupo moderado								
	Infiltrado perivascular		Hiperplasia epiderme		Edema superficial		Hiperqueratose	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Negativo (-)	-	-	33,34	33,33	-	-	33,33	33,33
Leve (+)	66,67	66,67	33,33	66,67	66,67	100	66,67	66,67
Moderado (++)	-	33,33	-	-	33,33	-	-	-
Severo (+++)	33,33	-	33,33	-	-	-	-	-
Histopatológico – Grupo severo								
	Infiltrado perivascular		Hiperplasia epiderme		Edema superficial		Hiperqueratose	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Negativo (-)	-	-	-	16,67	-	-	16,67	16,67
Leve (+)	33,34	-	16,67	16,67	50	66,67	66,67	50
Moderado (++)	33,33	66,67	50	50	33,33	33,33	16,66	16,67
Severo (+++)	33,33	33,33	33,33	16,66	16,67	-	-	16,66

A contagem dos mastócitos antes do tratamento e após não apresentou diferença significativa nos três grupos. Foram mensurados nos dias D0 e D82 (tab.6).

**Tabela 6-** Valores absolutos da quantificação do número de mastócitos antes do tratamento com CTMs (D0) e após (D82) para os diferentes grupos avaliados

	Grupo leve	Grupo moderado	Grupo severo
Antes tratamento (D0)	50,00±36,51	61,43±14,64	82,86±28,12
Após tratamento (82)	51,43±44,51	62,86±20,59	142,9±85,77

## DISCUSSÃO

A dermatite atópica é uma doença crescente, pois os cães estão instalados, predominantemente, em ambientes intradomiciliares, com maior exposição aos aeroalérgenos. Sendo assim, visando minimizar os efeitos e a ocorrência de complicações decorrentes da dermatite atópica em cães, foi avaliada a eficácia, segurança e ainda o efeito remissivo do emprego de CTMs alógenas aplicadas pela via endovenosa em cães com dermatite atópica. Tomando como base parâmetros relacionados com os diferentes graus de prurido, escore do CADESI-4 e ainda alterações histopatológicas evidenciadas na pele decorrentes de processo inflamatório.

Tomando como base a importância da via de administração das CTMs, em especial a endovenosa, foi observado que não houve alterações nos parâmetros sanguíneos. Revelando a eficácia diante do método adotado para tratamento da dermatite atópica. A ação esperada pelas CTMs demonstrou uma relação quimiotática com o processo inflamatório presente na pele dos animais acometidos, garantindo assim o deslocamento destas células ao longo dos vasos sanguíneos responsáveis pelo aporte sanguíneo da pele. Enfatizando ainda que as CTMs não atuaram diretamente na epiderme, mas sim, desempenham de forma direta uma ação parácrina local, liberando citocinas regulatórias diretamente envolvidas com o mecanismo modulatório da afecção (Ferrer et al. 2015).

A ação, positiva, do envolvimento das CTMs na terapia da atopia aplicadas por meio da via endovenosa esteve baseada diretamente aos valores hematológicos e bioquímicos dos cães avaliados. Pois estes parâmetros apresentaram-se dentro dos padrões fisiológicos determinados para a espécie, para os grupos leve, moderado e severo. Bem como, o mencionado por Ferrer et al. (2015), quando relataram a segurança quanto aos valores hematológicos no tratamento realizado com CTMs humanas em fístulas para-anais de pacientes caninos. Reforçando assim a viabilidade da via empregada para a aplicação das CTMs, determinando o fato de apresentar-se como uma terapia segura e eficaz.

De uma maneira não específica, conforme Na et al. (2014), as CTMs podem ser efetivas no tratamento da DA em humanos. Ainda a eficácia do tratamento com células tronco derivadas de cordão umbilical humano foi mencionada em camundongos com DA (Kim et al. 2015). Mais especificamente, e de forma coincidente com o mecanismo de ação que também ocorreu nos animais avaliados, Cho et al. (2018), relataram melhora dos sintomas de DA em camundongos com o uso sistêmico de exossomos de células tronco mesenquimais humanas, responsáveis pela regulação da resposta inflamatória e da expressão das citocinas inflamatórias.

Tomando como base os parâmetros sanguíneos dos animais avaliados em relação a via de aplicação das CTMs e sua ação frente a afecção, foi possível observar que os valores de ALT permaneceram dentro da normalidade em todos os grupos. Comparativamente Nishimura et al. (2019), relataram o uso de CTMs em fibrose hepática em Beagles, e verificaram que a taxa de ALT diminuiu, mas não causou danos aos hepatócitos, garantindo melhora clínica.

Da mesma forma a creatinina permaneceu estável e dentro dos valores fisiológicos durante todo o estudo. Levando a crer que as CTMs apresentaram uma ação parácrina de renoproteção, com um potencial efeito anti-inflamatório, que pode ser verificado em doenças renais agudas e crônicas, quando há diminuição da creatinina e da apoptose e aumento da angiogênese renal (Roushandeh et al, 2017). Portanto, coadunando com Ferrer et al. (2015), foi possível estabelecer que marcadores bioquímicos, relativos às enzimas hepáticas e renais, não sofreram alterações no tratamento a partir de CTMs.

Buscando o fortalecimento e garantia da viabilidade da via de aplicação e do tratamento adotado a partir de CTMs, verificou-se que a temperatura corporal dos cães, dos diferentes grupos avaliados não sofreu alteração após diferentes períodos da sua aplicação. Sendo determinante assim para garantir que mesmo com a ação de modulação tissular revelado, esta sinalização não foi comprometida, devido a não ocorrência de oscilações deste parâmetro, conforme proposto por Sun et al. (2016), quando ressalta a segurança no tratamento imposto.

Visando o estabelecimento de um paralelismo, decorrente da aplicação e mecanismo de ação estabelecidos pelas CTMs no organismo dos animais deste estudo, e sua ação frente a dermatite atópica, foi necessário considerar diferentes fatores. Dentre estes aqueles relacionados com a caracterização, imunofenotipagem e diferenciação das células tronco utilizadas, os mecanismos adotados para a caracterização e enquadramento da afecção e ainda suas relações com o processo inflamatório decorrente da afecção.

Neste estudo, a caracterização e imunofenotipagem das CTMs foram indicadas pelos níveis elevados de marcadores de indiferenciação de superfície CD29, CD44 e CD90 e a expressão de fatores de transcrição de pluripotência pela citometria de fluxo. Tal procedimento esteve de acordo com o proposto por Vieira et al. (2010), Bourin et al. (2013), Ferrer et al. (2015) e Villatoro et al. (2018b) ao mencionarem que esta padronização é fundamental para a certificação do tratamento adequado com células tronco mesenquimais.

Outro fator grande de importância frente as CTMs e sua ação, foi aquele relacionado com sua capacidade de diferenciação em outros tecidos relevantes. Dentre estes, aquele atestado pela capacidade de diferenciação das CTMs em osteócitos, condrócitos e adipócitos como demonstrada neste trabalho, corroborando assim com estudos de Ferrer et al. (2015), Merino et al. (2015), Harman et al. (2016) e Villatoro et al. (2018b). Garantindo, portanto, o potencial restaurador, e com grande capacidade de minimizar os efeitos decorrentes da dermatite atópica em cães.

Tomando como base os dados expressos da interpretação do CADESI-04, o qual foi considerado parâmetro de grande importância diagnóstica, visto que estabeleceu os locais e a severidade da dermatite atópica, alta sensibilidade e especificidade para a afecção, bem como, na avaliação da manutenção clínica do paciente conforme proposto por Olivry et al. (2014). Nos animais avaliados foi observada a melhora clínica e diminuição do escore do CADESI-04 nos três grupos do experimento. Portanto indo de encontro com os achados de Villatoro et al. (2018b), que verificaram uma melhora considerável deste parâmetro em cães atópicos tratados com CTMs alógenas, aplicados por via endovenosa na dose de  $1,5 \times 10^6$ /kg. Sendo determinante ressaltar que os dados diferenciais entre o trabalho mencionado estiveram presentes entre a dose e na frequência de aplicação.

O grau de prurido apontou uma diminuição mais expressiva entre os grupos leve e moderado, já no severo a resposta quanto ao prurido não foi tão evidente. Contudo para um paciente com dermatite atópica mesmo que em escala menor, a diminuição do grau de prurido já representa uma melhor qualidade de vida, coincidindo assim com os achados apresentados por Villatoro et al. (2018b), quando relataram melhora significativa no grau de prurido.

Na dermatite atópica, o prurido é um fator predominante, sendo mediado pela interação da disfunção da barreira cutânea e ativadores inflamatórios (Mollanazar et al. 2016). Kim et al. (2016) observaram melhora do grau de prurido, dos pacientes com dermatite atópica moderada e severa, quando empregaram CTMs alogênicas derivadas de cordão umbilical, as quais

promoveram diminuição do eczema, prurido e dos níveis séricos de IgE, sem ainda desencadear efeitos adversos nos pacientes tratados. Portanto, o emprego das CTMs, como nos animais deste estudo, se mostrou eficaz diante da interferência e diminuição do grau de prurido.

Alterações tissulares foram determinantes para caracterização da modulação da resposta diante da aplicação das CTMS, em pacientes com dermatite atópica. Principalmente por ser capaz de revelar, em associação com o processo inflamatório verificado, modificações impostas pelo tratamento. Assim, por meio da avaliação de fragmentos de biopsia de pele, de animais acometidos foi verificada diminuição da hiperplasia da epiderme e do edema superficial em todos os grupos. De outra forma, mas coincidindo em parte, em camundongos com dermatite atópica, ocorreu diminuição da hiperplasia da epiderme e da inflamação dérmica após o tratamento com CTMs (Kim et al. 2015). Portanto, deve ser ressaltado que estas alterações de epiderme são frequentemente evidenciadas em indivíduos com dermatite atópica, determinadas sim pela cronicidade do processo inflamatório imposto localmente. Garantindo assim a importância da avaliação histológica da pele frente a relevância clínica quando empregado CTMs alógenas em pacientes atópicos.

A degranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores inflamatórios provocam o estímulo do prurido (Steinhoff et al. 2003, Tsujii et al. 2009), a partir de então os mastócitos recrutam os linfócitos, eosinófilos e neutrófilos para a região da inflamação (Malaviya, 2002). A quantificação dos mastócitos não apontou diferenças significativas antes e após as aplicações, para os diferentes grupos avaliados. Sobretudo, de acordo com Shin et al. (2017), houve redução significativa na infiltração e degranulação dos mastócitos pela via dependente de PGE2 (Shin et al. 2017). De outra forma, Villatoro et al. (2018a) relataram a diminuição de mastócitos e eosinófilos nas citologias das córneas após aplicação local, na mucosa conjuntiva, de CTMs em gatos com ceratites eosinofílicas. Portanto, no presente estudo foi possível deduzir que as CTMs interferem na maturação das células dendríticas, levando assim ao desencadeamento de uma atenuação da cascata inflamatória. Sugerindo então que a mensuração da PGE2 poderia ser empregada como um biomarcador, relacionado com a degranulação dos mastócitos, acrescido da sua quantificação. De outra forma, outra análise que deveria ser considerada seriam os pacientes atópicos ou também os “atopic-like” que nem sempre apresentam números altos de mastócitos e não são IgE dependentes, conforme mencionados por Botoni et al. (2018). Relacionando ao fato que os cães do experimento apresentaram melhora no quadro clínico, tanto quanto ao prurido, bem como, indiretamente em relação ao processo inflamatório evidenciado diante da avaliação histopatológica.

Outro fator relevante, que deve ser considerado localmente, foi o relativo a espessura da epiderme. Visto que este parâmetro apresentou diferença estatística para os grupos moderado e severo. Já foi possível observar que grupo leve mesmo apresentando melhora clínica aparente e diminuição considerável da epiderme, não apresentou diferença significativa. Foi possível estabelecer que pacientes com dermatite atópica apresentaram hiperplasia da epiderme, com aumento do infiltrado perivascular e do número de mastócitos, sendo ainda que em casos mais crônicos poderiam apresentar hiperqueratose (Olivry & Hill, 2001). Sobretudo, a diminuição da espessura da epiderme possivelmente esteve relacionada com a diminuição do padrão inflamatório e da hiperplasia da epiderme, isto ainda, considerando a ação do tratamento imposto. Portanto, este parâmetro mostrou-se como sendo fundamental para avaliar a melhora em níveis microscópicos das alterações provindas da dermatite atópica. Atuando ainda na sinalização da ação parácrina promovidas pelas CTMs na resposta regulatória diante da inflamação.

Ainda de relevância, foi avaliada a ocorrência ou não de efeitos adversos, ou mesmo colaterais, nos animais submetidos ao tratamento da dermatite atópica a partir da aplicação de CTMs. Os cães que receberam o tratamento de CTMs não apresentaram efeitos colaterais durante as aplicações e 82 dias após. Coincidindo então com Ferrer et al. (2015), ocorreu a melhora clínica após aplicação de células tronco humana de origem embriogênica no tratamento de fistulas perianal em cães. Ainda a segurança do tratamento foi observada por Harman et al. (2016), que indicaram a segurança do tratamento após 60 dias da aplicação de CTMs em cães com osteoartrites quando comparado ao grupo placebo. Sobretudo para Kim et al. (2016), em pacientes humanos, foi mencionado que o tratamento da dermatite atópica foi bem tolerado. Tal segurança pode ser entendida quando analisados os mecanismos envolvidos na atenuação da afecção, pois as CTMs atuam sim na modulação de resposta celular, a partir da liberação de citocinas localmente. Garantindo assim uma menor interferência sistêmica, que poderia desencadear respostas indesejadas no tratamento da doença atópica.

Para Kapoor et al. (2012) e Sun et al. (2012), em tratamentos de doenças alérgicas, as CTMs são responsáveis por desencadear uma certa capacidade imunomodulatória. Pois de acordo com Jee et al. (2013), as CTMs derivadas de tecido adiposo canino foram capazes de interferir na produção e liberação de IL10 e TGF $\beta$ 1, que são citocinas imunorregulatórias, capazes de melhorarem de forma efetiva a dermatite atópica em cães. Para English et al. (2008) as CTMs poderiam agir nas células dendríticas, não permitindo a sua maturação, com isso toda a ativação e apresentação ao linfócito TCD4 $^{+}$  seria bloqueada e a cascata de liberação de

interleucinas pró-inflamatórias seria atenuada por este efeito imunorregulatório. Diante do exposto, a eficácia e segurança do tratamento imposto foi determinado pela apresentação das células dendríticas de agentes alergênicos ao linfócito T, estabelecendo um papel relevante na patogenia da dermatite atópica. Fato que garante o papel promissor da terapia com CTMs para esta afecção.

Como efeito positivo do tratamento a partir do emprego das CTMs em cães com dermatite atópica, foi possível verificar que a melhora clínica dos pacientes com relação ao grau de prurido, escore do CADESI 04, alterações teciduais de contexto inflamatório (histopatológico de pele) e diminuição da espessura da epiderme estiveram relacionados com a minimização do padrão inflamatório imposto pela dermatite atópica. De outra forma, a mensuração das citocinas pró-inflamatórias e regulatórias bem como a avaliação do IgE tecidual poderiam ser fatores complementares para reforçar a ação parácrina imposta pelas CTMs em cães atópicos. Pois foi observado por Ferrer et al. (2015) a inibição da proliferação de linfócitos T, CD4+ e CD8+, em cães com fístula anal tratados com CTMs humana. Portanto, o tratamento sistêmico com CTMs alógenas revelou-se como sendo uma opção promissora para a atenuação da dermatite atópica canina. Visto que, foi capaz de promover uma melhora do quadro clínico e ainda não desencadeou efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAHINA, R.; MAEDA, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. **Vet Dermatol**, 28:16-e5, 2017.
- ASARI, S.; ITAKURA, S.; FERRERI, K.; LIU, C. P.; KURODA, Y.; KANDEEL, F. et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. **Exp. Hematol**, 37, 604–615. doi: 10.1016/j.exphem.01.005, 2009.
- AUGELLO, A.; TASSO, R.; NEGRINI, S.M.; CANCEDDA, R.; PENNESI, G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen induced arthritis. **Arthritis Rheum**, 56:1175–1186, 2007.
- BENSIGNOR, E.; PIN, D.; BOURDEAU, P. A multicentric randomised controlled single blinded study to evaluate the value of a new protocol with a shampoo and a foam to treat canine allergic dermatitis (in French). **Pratt Méd Chir Anim Comp**. 48:49–55, 2013.
- BERGER, D.J.; LEWIS, T.P; SCHICK, A.E; STONE, R.T. comparison of once-daily versus twice-weekly terbinafine administration for the treatment of canine Malassezia dermatitis – a pilot study. **Vet Dermatol**, 23: 418-e79, 2012.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G. & SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Stem Cell**, 2, 313–319, 2008.
- BIZIKOVA, P.; PUCHEU-HASTON, C.M.; EISENSCHENK, M.N; MARSELLA, R.; NUTTAL, T.; SANTORO, D. Review of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. **Vet Dermatol**, 26(2):95-e26, 2015.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemical Cytobiological**, v.44, p.215-230, 2006.
- BOTONI, L.S.; TORRES, S.M.F.; KOCH, S.N.; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P. Comparison of dermatographic data, disease severity and response and atopic-like dermatitis: a retrospective study. **Vet Dermatol**, 29:274, 2018.
- BOURDEAU, P.; BRUET, V.; GREMILLET, C. Evaluation of phytosphingosine-containing shampoo and microemulsion spray in the clinical control of allergic dermatoses in dogs: preliminary results of a multicentre study (abstract). **Vet Dermatol**, 18:177–8, 2007.
- BOURIN, P.; BUNNEL, B.A.; CASTEILLAM L.; DOMINIC, M.; KATZ, A.; MARCH, K.I et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture

expanded adipose tissue-derived adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and International Society For Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, 15(6):641-8, 2013.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, p.318-324, 2009.

CARLOTTI, D.N.; GRIBEAUVAL, C.; COSTARGENT, F.A.; GANIAVRE, J.; VIAUD, S.E. A retrospective survey of the results of allergen-specific immunotherapy in 205 atopic dogs in Aquitaine, France (1989-2001). **Prat Med Chir Anim Comp**, 48:41-7, 2013.

CHO, B. S.; KIM, J. O.; HA, D. H.; YI, Y. W. Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. **Stem Cell Res. Ther**, 9:187. doi: 10.1186/s13287-018-0939-5, 2018.

CHO, K.S.; PARK, H.K.; PARK, H.Y.; JUNG, J.S.; JEON, S.G.; KIM, Y.K; R, H.J. IFATS Collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue derived stem cells in na allergic rhinitis mouse model. **Stem Cell** , 27:259-265, 2009.

CHO, K.S.; ROH, H.J. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in airway allergic diseases. **Curr Stem Cell Res Ther**, 5: 111–115, 2010.

CONNICK, P.; KOLAPPAN, M.; CRAWLEY, C. et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2<sup>a</sup> proof-of-concept study. **The Lancet Neurology**, 11:150-156, 2012.

COSGROVE, S.B.; WREN, J.A.; CLEAVER, D.M.; MARTIN, D.D.; WALSH, K.F.; HARFST, J.A. et al. Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. **Vet Dermatol**, 24:479–e114, 2013.

CUI, X.; PU, L.L. The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: part I. In vivo study. **Anesthetic Surgery Journal**, 30: 248-252, 2010.]

DEBOER, D.J.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. **Vet Immunol Immunopathol**. 81 (3-4): 271-6, 2001.

DEBOER, D.J.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic deratitis. **Vet Immunopathol**, 81: 239-249, 2001.

DE FRANCESCO, F.; RICCI, G.; D'ANDREA, F.; NICOLETTI, G.F.; FERRARO, G.A. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. **Tissue Engineering**, 21, 572-584, 2015.

DE ROSA, A.; DE FRANCESCO, F.; TIRINO, V.; FERRARO, G.A.; DESIDERIO, V.; PAINO, F.; PIROZZI, G.; D'ANDREA, F.; PAPACCIO, G. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. **Tissue Engineering**, 15: 659-667, 2009.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, 8: 315–317, 2006.

ELDER, D.E.; ELENITSA, R.; JOHNSON, B.L.; MURPHY, G.F; XU, X. **Histopathology of the skin**. 10<sup>th</sup> edition, 2008.

ENGLISH, K.; BARRY, F.P.; MAHON, B.P. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. **Immunology Letters**, 115:50-58, 2008.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Ed. Roca, 389p, 2002.

FERRER, L.; KIMBREL, E.A.; LAM, A.; FALK, E.B.; ZEWE, C.; JUOPPERI, T.; LANZA, R.; HOFFMAN, A. Treatment of perianal fistula with human embryonic stem cell-derived MSCs: a canine model of human fistulizing Crohn's disease. **Regenerative Medicine**, Doi: 10.2217/rme.15.69, 2015.

FIRINCI, F.; KARAMAN, M.; BARAN, Y.; BAGRIYANIK, A.; AYYILDIZ, Z.A.; KIRAY, M. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma. **Int Immunopharmacol**, 11: 1120–1126, 2011.

FOUDAH, D.; MONFRINI, M.; DONZELLI, E. et al. Expression of neural markers by undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. **J Immunol Res**, 987678, 2014.

GADEYNE, C.; LITTLE, P.; KING, V.L.; EDWARDS, N.; DAVIS, K.; STEGEMANN, M.R. Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. **Vet Dermatol**, 25:512–8. e86, 2014.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I.D.; VELEGRAKI A. The Malassezia genus in skin and systemic diseases. **Clin Microbiol Rev**, 25, 106-141, 2012.

GAO, F.; CHIU, S.M.; MOTAN, D.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H.L.; TSE, H.F.; FU, Q.L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death and Disease**, 7: e2062, 2016.

GONZALEZ, M.A.; GONZALEZ-REY, E.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. **Gastroenterology**, 136:978–989, 2009.

HARMAN, R.; CARLSON, K.; GAYNOR, J.; GUSTAFSON, S.; DHUPA, S.; CLEMENT, K.; HOELZLER, M.; MCCATHY, T.; SCHWARTZ, P.; ADAMS, C. A Prospective, randomized, masked, and placebo-controlled efficacy study of intraarticular allogeneic adipose stem cells for the treatment of osteoarthritis in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3:81, 2016.

HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C.; HILL, P.; GRIFFIN, C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. **BMC Veterinary Research**, 2015 11:196.

HILLIER, A.; LLOYD, D.H.; WEESE, J.S.; BLONDEAU, J.M.; BOOTHE, D.; BREITSCHWERDT, E. et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine

superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial guidelines working group of the international Society for companion animal infectious diseases). **Vet Dermatol**, 25:163-75. e42-3, 2014.

HUSS, R. Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. **Stem Cells**, v.18, n.1, p.1-9, 2000.

JEE, M.K.; IM, Y.B.; CHOI, J.I et al. Compensation of cATSCs-derived TGF beta 1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatitis. **Cell Death Dis**, 4, 2013.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, 418, 41–49, 2002.

KANDA, S.; SASAKI, T.; SHIOHAMA, A.; NISHIFUJI, K.; AMAGAI, M.; IWASAKI, T.; KUDOH, J. Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. **Vet Dermatol**, 24:25-e7, 2013.

KAPOOR, S.; PATEL, S.A.; KARTAN, S. et al. Tolerance-like mediated suppression by mesenchymal stem cells in patients with dust mite allergy-induced asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, 129:1094-1101, 2012.

KARUSSIS, D.; KARAGEORGIU, C.; VAKNIN- DEMBINSKY, A et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. **Archives of neurology**, 67:1187-1194, 2010.

KENNIS, R.A. Food allergies: update of pathogenesis, diagnoses and management. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 36 (1): 175-84, vii-viii, 2006.

KIM, H.S.; LEE, J.H.; ROH, K.H.; JUN, H.J.; KANG, S.; KIM, T.Y. Clinical trial of human umbilical Cord Blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: Phase I/IIa studies. **Stem Cells**, 00:00-00, 2016. Doi: 10.1002/stem.2401.

KIM, H.S.; YUN, J.W.; SHIN, T.H. et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells-derived PGE2 and TGF-beta1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. **Stem Cells**, 33:1254-1266, 2015.

KIM, M.; LEE, S.H.; KIM, Y.; PARK, Y.; LEE, H.K.; JUNG, H.S.; JEOUNG, D. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells attenuate atopic dermatitis by regulating the expression MIP-2, miR-122a-SOCS1 axis, and Th1/Th2 responses. **Frontiers in pharmacology**, doi: 10.3389/fphar.2018.01175, 2018.

KOVALIK, M.; TASZKUN, I.; POMORSKI, Z.; KOZAK, M.; POMORSKA, D.; SZCZEPANIK, M. et al. Evaluation of a human generic formulation of ciclosporin in the treatment of canine atopic dermatitis with in vitro assessment of the functional capacity of phagocytic cells. **Vet Rec**, 168:537–42, 2011.

LE BLANC, K.; FRASSONI, F.; BALL, L et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**, 371:1579-1586, 2008.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, 12:383-396, 2012.

LE BLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; GOTHERSTROM, C.; HASSAN, M.; UZUNEL, M.; RINGDEN, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, 363:1439–1441, 2004.

LEE, S.H.; JANG, A.S.; KWON, J.H.; PARK, S.K.; WON, J.H.; PARK, C.S. Mesenchymal stem cell transfer suppresses airway remodeling in a toluene diisocyanate-induced murine asthma model. **Allergy Asthma Immunol Res**, 3: 205–211, 2011.

LEE, K.S.; NAH, J.J.; LEE, B.C et al. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in Veterinary Science**, Vol. 94, n°1 p. 144-151, 2013.

LEUNG, D.Y.; NICKLAS, R.A.; LI, J.T. et al. Disease management of atopic dermatitis: an updated practice parameter. Joint Task Force on Practice Parameters. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy*. **Asthma & Immunology**, 93:S1-21, 2004.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Rev**, 7 (2), 269-291, 2011.

LOU, H.; LU, J.; CHOI, E. B.; OH, M. H.; JEONG, M.; BARMETTLER, S. et al. Expression of IL-22 in the skin causes Th2-biased immunity, epidermal barrier dysfunction, and pruritus via stimulating epithelial Th2 cytokines and the GRP pathway. **J. Immunol**, 198, 2543–2555. doi: 10.4049/jimmunol.1600126, 2017.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. **J Invest Dermatol**, 121: 231-241, 2003.

MAJEWSKA, A.; GAJEWSKA, M.; DEMBELE, K. et al. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. **BMC Vet Res**, 12:174, 2016.

MALAVIYA, R.; GEORGES, A. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. **Clin Rev Allergy Immunol**, 22:189-204, 2002.

MANABE, M.; SANCHEZ, M.; SUN, T.T. et al. Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. **Differentiation**, 48: 43-50, 1991.

MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; CARLOTTI, D.N. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. **Vet Dermatol**, 22: 239–248, 2011.

MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; NICKLIN, C. et al. Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. **Vet Dermatol**, 17:24– 35, 2006.

MARX, C.; SILVEIRA, M.D.; BEYER, N.N. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. **Stem Cells Dev**, 24 (7), 803-13, 2015.

MASON, I.S.; MASON, K.V; LLOYD, D.H. A review of the biology of canine skin with respect commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* and *Malassezia pachydermatis*. **Vet Dermatol**, 1996. 7:119-132

MERINO, E.M.P.; CASAUS, J.M.U.; BAYLE, C.Z.; CARRASCO, J.D.; PARDO, L.M.; PRIETO, M.H; CHACON, R.B.; GUALTIERRE, M. Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: endoscopic and histological outcomes. **The Veterinary Journal**, Doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.003, 2015.

- MOLLANAZAR, N.; SMITH, P.K.; YOSIPOVITCH, G. Mediators of chronic pruritus in atopic dermatitis: getting the itch out? **Clinic Ver Immunol**, 51:263-292, 2016.
- NA, K.; YOO, H.S.; ZHANG, Y.X. et al. Bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit ovalbumin-induced atopic dermatitis. **Cell Death Dis**, 5:e1345, 2014.
- NAM, E.H.; PARK, S.H.; JUNG, J.Y.; HAN, S.H.; YOUNG, H.Y.; CHAE, J.S. et al. Evaluation of the effect of a 0.0584 % hydrocortisone aceponate spray on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. **J Vet Sci**, 13:187–91, 2012.
- NISHIMURA, T.; TAKAMI, T.; SASAKI, R.; ALBE, Y.; MATSUDA, T.; FUSHISAWA, K.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, N.; TANI, K.; TAURA, Y.; SAKAIDA, I. Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. **Research Article**, Plos one. 14(1):e0210588, 2019.
- NOSANCHUK, J.D.; STARK, R.E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: what do we know about structure? **Front Microbiol**, 6, 1-7, 2015.
- NUTTALL, T. J., KNIGHT, P. A., MCALEESE, S. M., LAMB, J. R. AND HILL, P. B. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. **Clinical & Experimental Allergy**, 32: 789–795. doi:10.1046/j.1365-2222.2002.01356.x, 2002.
- OLIVRY, T.; DEBOER, D.; FAVROT, C.; JACKSON, H.A.; MUELLER, R.S.; NUTTALL, T.; PRELAUD, P. and for the International Committee on Allergic Diseases of Animals. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 update guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). **BMC Veterinary Research**, 11:210, 2015.
- OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the international task force on canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v.21, n.3 p. 233-248, 2010.
- OLIVRY, T.; HILL, P. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 81:305-309, 2001.
- OLIVRY, T.; MAYHEW, D., PAPS, J.S. et al. Early activation of Th2/Th22 inflammatory and pruritogenic pathways in acute canine atopic dermatitis skin lesions. **J Invest Dermatol**, 136: 1964-9, 2016.
- OLIVRY, T.; SARIDOMICHELAKIS, M.; NUTTALL, T.; BENSIGNOR, E.; GRIFFIN, C.E.; HILL, P.B. Validation of the canine atopic dermatitis extent and severity index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. **Vet dermatol**, 25:77-e25, 2014.
- OLIVRY, T; DUNSTON, S.; MURPHY, K.M. et al. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. **Vet Dermatol**, 12:49–58, 2001.
- ORCIANI, M.; CAMPANATI, A.; CAFFARINI, M.; GANZETTI, G.; CONSALES, V; LUCARINI, G.; OFFIDANI, A.; DI PRIMIO, R. T helper (Th)1, Th17 and Th2 imbalance in mesenchymal stem cells of adult patients with atopic dermatitis: at the origin of the problem. **British Journal of Dermatology**, 176:1437-1438, 2017

OSAWA, R.; AKIYAMA, M.; SHIMIZU, H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. **Allergol Int**, 60: 1-9, 2011.

PIEKUTOWSKA, A.; PIN, D.; RÈME, C.A.; GATTO, H.; HAFTEK, M. Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier of atopic dogs. **J Comp Pathol**, 138:197–203, 2008.

PINCHBECK, L.R.; HILLIER, A.; KOWALSKI, J.J.; KWOCZKA, K.W. Comparison of pulse administration versus once daily administration of itraconazole for the treatment of *Malassezia pachydermatis* dermatitis and otitis in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, 220:1807-12, 2002.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284, 143–147, 1999.

POPA, I.; REMOUE, N.; OSTA, B.; PIN, D.; GATTO, H.; HAFTEK, M. et al. The lipid alterations in the stratum corneum of dogs with atopic dermatitis are alleviated by topical application of a sphingolipid-containing emulsion. **Clin Exp Dermatol**, 37:665–71, 2012.

PRIGIONE, I.; BENVENUTO, F.; BOCCA, P.; BATTISTINI, L.; UCCELLI, A.; PISTOIA, V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. **Stem cells**, 27: 693–702. doi: 10.1634/stemcells.2008-0687, 2009.

PROCKOP, D.J. & OH, J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. **Mol. Ther**, 20, 14–20, 2012.

PUCHEU-HASTON, C.M.; BIZIKOVA, P; MARSELLA, R. et al. Review: lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1 T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. **Vet Dermatol**, 26:124-e32, 2015.

RAWLINGS, A.V.; HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatol Ther**, 17 (Suppl 1): 43-48, 2004.

ROMAGNOLI, C.; BRANDI, M.L. Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. **World J Stem Cells**, 6 (2), 144-152, 2014.

ROUSHANDEH, A.M.; BAHADORI, M.; ROUDKENAR, M.H. Mesenchymal stem cell-based therapy as a new horizon for kidney injuries. **Medical Research**, 48: 133-146, 2017.

RYBNICEK, J.; LAU-GILLARD, P.J; HARVEY, R. et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. **Vet Dermatol**, 20: 115-122, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M.N; OLIVRY, T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. **The Veterinary Journal**, doi: 10.1016/j.tvjl.2015.09.016, 2015.

SHIMADA, K.; YOON, J.S; YOSHIHARA, T.; IWASAKI, T.; NISHIFUJI, K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**. 20:541-546, 2009.

SHIMADA, K.; YOSHIHARA, T.; YAMAMOTO, M. et al. Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. **J Vet Med Sci**, 70: 841-843, 2008.

SHIN, T.H.; LEE, B.C.; CHOI, S.W.; SHIN, J.H.; KANG, I.; LEE, J.Y.; KIM, J.J.; LEE, K.H.; JUNG, J.E.; CHOI, Y.W.; LEE, S.H.; YOON, J.S.; CHOI, J.S.; LEE, C.S.; SEO, Y.; KIM,

H.S.; KANG, K.S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation. **Oncotarget**, v. 8 (n.1), p.512-522, 2017.

STEINHOFF, M.; NEISIUS, U.; IKOMA, A. et al. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: A novel pathway for pruritus in human skin. **J neurosci**, 23:6176-6180, 2003.

SUN, L.I.; RONGMAN, X.U.; XIAOXIAN, S.; YUPING, D.; YIWEN, H.; YUANYUAN, Z.; HUI, Q.; WEI, Z.; WENRONG, X. Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell. **Cytotherapy**, 18:413-422, 2016.

SUN, Y.Q.; DENG, M.X.; HE, J.; ZENG, Q.X.; WEN, W.P.; WONG, D.S.H.; TSE, H.F.; XU, G.; LIAN, Q.Z.; SHI, J.B.; FU, Q.L. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Allergic Airway Inflammation in Mice. **Stem cells**, 30:2692–2699, 2012.

TAE, H.S.; BYUNG, C.L.; SOON, W.C.; JI, H.S.; INSUNG, K.; JIN, Y. L; JAE, J.K.; HONG, K.L.; JAE, E.J.; YONG, W.C.; SUNG, H.L.; JIN, S.Y.; JIN, S.C.; CHI, S.L; YOOJIN, S.; HYUNG, S.K.; KYUNG, S.K. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation. **Oncotarget**, v.8, (n° 1), p.512-522, 2017.

TSUJII, K.; ANDOH, T.; UI, H. et al. Involvement of trypase and proteinase-activated response in mice with atopy-like dermatitis. **J Pharmacol Sci**, 109:388-395, 2009.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B.E.; ZATZ, M. Isolation, characterization and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplant**, 19 (3): 279-39, 2010.

VILLATORO, A.J.; CLAROS, S.; FERNANDEZ, V.; ALCOHOLADO, C.; FARINAS, F.; MORENO, A.; BECERRA, J.; ANDRADES, J.A. Safety and efficacy of mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. **BMC Veterinary Research**, 14:116, 2018a.

VILLATORO, J.A.; PRIETO, M.H.; FERNANDEZ, V.; FARINAS, F.; ALCOHOLADO, C.; GARCIA, M.I.R.; PARDO, L.M.; BECERRA J. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. **Veterinary Record**, Doi: 10.1136/vr.104867, 2018b.

WAN, C.D.; CHENG, R.; WANG, H.B.; LIU, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.7, p.29-33, 2008.

YOUNGCHIM, S.; NOSANCHUK, J.D.; PORNSUWAN, S.; KAJIWARA, S.; VANITTANAKOM N. The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia Furfur*. **PloS one**, 8, 1-12, 2013.

ZAPPIA, E.; CASAZZA, S.; PEDEMONTE, E.; BENVENUTO, F.; BONANNI, I.; GERDONI, E.; GIUNTI, D.; CERAVOLO, A.; CAZZANTI, F.; FRASSONI, F.; MANCARDI, G.; UCCELLI, A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell allergy. **Blood**, 106:1755–1761, 2005.