

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM
AFECÇÕES DO SISTEMA NERVOSO DE CÃES**

BIANCA ANDRIOLO MONTEIRO

BOTUCATU-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM
AFECÇÕES DO SISTEMA NERVOSO DE CÃES**

BIANCA ANDRIOLO MONTEIRO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do Título de Doutor

Orientador(a): Prof Dra Fernanda Da Cruz Landim

BOTUCATU- SP
JULHO 2017

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

Monteiro, Bianca Andriolo.

Efeitos da terapia com células tronco
mesenquimais em afecções do sistema nervoso de
cães / Bianca Andriolo Monteiro. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Cães - Doenças. 2. Cinomose. 3. Coluna
vertebral - Doenças. 4. Células-tronco. 5. Sistema
nervoso. 6. Terapia celular.

Nome do Autor(a): Bianca Andriolo Monteiro

Título: EFEITOS DA TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM AFECÇÕES DO SISTEMA NERVOSO DE CÃES

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Fernanda da Cruz Landim
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP- Botucatu

Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ-UNESP- Botucatu

Profª Drª Claudia Barbosa Fernandes
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ- USP

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ-UNESP- Botucatu

Data da Defesa: 04 de Agosto de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e aos meus orixás, por me darem fé durante esta longa jornada, não me fazendo desistir nos momentos difíceis.

Aos meus pais Teresa Cristina Andriolo e Wagner Pinheiro Monteiro pelo amor incondicional, pela integral dedicação em relação a minha vida e a minha profissão, pelos anos de luta, conquistas e derrotas que enfrentamos juntos. Meu alicerce, minha base, meu caráter devo a vocês!

Minha irmã Olivia Andriolo Monteiro por ser meu chão quando caí, por me ajudar a levantar mesmo diante do mais difícil obstáculo. Nosso amor mostra que duas almas podem se reencontrar em várias vidas!

A minha afilhada Luiza Campos Nadal por me ensinar a ser uma pessoa melhor e aprender o verdadeiro significado da palavra AMOR!

A minha filha Helena mesmo que ainda não tenha nascido já me tornou um ser humano mais sensato, maduro e resiliente!

AGRADECIMENTOS

A FMVZ-Unesp de Botucatu pelo aprendizado e realização do projeto.

A CAPES pela bolsa de estudo.

Ao Serviço de Acupuntura e Dor Crônica da FMVZ – Unesp pelos anos de ensino, apoio, por conceder os dados para coleta e avaliação no nosso trabalho!

A residente Maíra Belli pela amizade, pelo exemplo de profissionalismo, caráter, ensino e por me acalmar no momentos de desespero. Você foi essencial para a realização deste trabalho!

A família Andriolo por ser um alicerce mesmo longe se mantendo presente! Aos meus padrinhos Ana Maria Dunley e Márcio Dunley pelo amor e carinho durante toda a minha vida!

Aos animais utilizados durante este trabalho, talvez eles sejam a verdadeira razão deste sonho! A minha eterna gratidão e amor por cada um!

Ao Jean Joaquim por ser o grande Mestre da minha vida, por me ensinar a amar e respeitar nossa profissão como ninguém jamais havia me mostrado antes. A você não tenho palavras para agradecer por tanto aprendizado. Obrigada por me tornar uma profissional melhor!

A minha orientadora pelo apoio ao longo destes sete anos de jornada. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma não o fiz, por nos acalmar nas horas difíceis, por ser nossa luz quando não enxergávamos mais uma saída!

A minha amiga e fiel companheira Isadora Arruda por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, você foi essencial para a realização deste trabalho! Obrigada por ser essa amiga indispensável em todos os momentos!

A toda a equipe do Lança, Bruna Devita, Natália Genú, Carolina Serrano, Midyan Daroz, Maria Laura, Laís Cintra, Amanda Listoni pela convivência no laboratório e pela ajuda durante a realização deste trabalho!

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal por todos estes anos de convivência, pelo ensino e pela dedicação irrestrita à nossa profissão.

Aos funcionários do Departamento Felipe, Edivaldo, Edilson e Evandro pela ajuda, apoio e amizade.

A funcionária Dona Raquel por ser uma amiga carinhosa, atenciosa e por cuidar de todos com tanto amor e zelo! Obrigada por tudo!

Aos meus compadres Loreta Campos e André Nadal por estarem ao meu lado quando mais precisei e por me darem uma das minhas maiores alegrias da vida, a minha afilhada Luiza!

Ao casal amigo Mirelle e João por tanto carinho e amor durante estes três anos, vocês foram meu alicerce nos momentos difíceis!

Aos meus amigos de sempre e pra sempre Thaís Rocha, Julianna Spinelli, Fernanda Erthal, Eliana Gulão, Luzia Raposa, Alan Marqui, Gabriel Monteiro, Yamê Fabres, Camila Fumes e a todos os amigos que estiveram ao meu lado durante estes anos!

“A força dos fortes é a mesma que todas as demais pessoas usam, a diferença está na forma de fazer dela sábias conquistas!”

Autor desconhecido

LISTA DE ABREVIATURAS

AF= ânulo fibroso

CD= *cluster differentiation*

CTAs= células tronco derivadas de tecido adiposo

CTEs= células tronco embrionárias

CTs= células tronco

CTMs= células tronco mesenquimais

COX-2= cicloxigenase 2

DIV= disco intervertebral

DDIV= doença do disco intervertebral

EAC= eletroacupuntura

ECC= encefalite da cinomose canina

FVE= fração vascular estromal

IA= intra-articular

IL= interleucina

IT= intra-tecal

IV= intra-venoso

iPS= células pluripotentes induzidas

LCR= líquido cefalorraquidiano/líquor

LM= lesão medular

LME= lesão da medula espinhal

LED= leucoencefalite desmielinizante

ME= medula espinhal

MEOD= meningoencefalite de origem desconhecida

NP= núcleo pulposos

miRNA= micro RNA

RNM= ressonância magnética

SCU= sangue do cordão umbilical

SNC= sistema nervoso central

TRM= trauma raquimedular

VCC= vírus da cinomose canina

SUMÁRIO	PÁGINA
CAPÍTULO 1.....	1
1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2- REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Células tronco e terapia celular.....	4
2.2 Caracterização imunofenotípica das CTMs de tecido adiposo.....	6
2.3 Trauma raquimedular.....	7
2.4 Lesão do sistema nervoso central e cinomose	11
2.5 Discopatia	16
2.5.1 Patogenia e sinais clínicos	16
OBJETIVOS	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2.....	30
BACKGROUND	33
METHODS	35
Cell culture.....	36
MSCs Cryopreservation.....	37
Osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs.....	38
Chondrogenic differentiation.....	38
Preparing MSCs for application	39
Distemper.....	39
SCI and IVDD	40
Statistical Analysis.....	40
RESULTS	41
Immunophenotypic Characterization.....	41
Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation	41
Clinical Utilization.....	42
DISCUSSION	44
CONCLUSIONS	47
REFERENCES	49
Figure 1	52
Figure 2	53

MONTEIRO, B.A. Efeitos da terapia com células tronco mesenquimais em afecções do sistema nervoso de cães. Botucatu, 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

RESUMO

O trauma raquimedular, a discopatia e a cinomose são distúrbios que se caracterizam por sinais neurológicos, os quais muitas vezes são de difícil tratamento. Nesse contexto, a terapia celular busca minimizar os sinais e as sequelas neurológicas adquiridas pelas afecções, com objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o resultado do tratamento com células tronco mesenquimais de tecido adiposo nas afecções de trauma raquimedular, sequela de cinomose e discopatia de cães atendidos no serviço de Acupuntura e Dor Crônica da FMVZ-UNESP. Foram utilizados 62 animais, sendo 14 com trauma raquimedular, 17 com discopatias e 31 com sequela de cinomose, todos submetidos ao exame neurológico prévio seguido de terapia celular. A comparação entre os graus antes e após o tratamento com CTMs alogênicas de tecido adiposo para cada tipo de lesão foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney para medidas repetidas. Foi observada diferença entre as medianas referentes ao grau de gravidade das enfermidades tratadas. Nos casos de sequela de cinomose 43.3% (13/30) dos animais tratados apresentaram diminuição dos sinais neurológicos com melhora da graduação da doença. Nos animais com trauma raquimedulares a melhora foi observada em 50% (7/14), e 66.7% dos animais (12/18) que apresentavam discopatias tiveram uma melhora de quadro clínico. Concluiu-se que as aplicações de células tronco mesenquimais em animais com distúrbios neurológicos da lesão da medula espinhal, doença do disco intervertebral e sequelas de cinomose diminuíram o grau de lesão das demais afecções.

Palavras-chave: cães; terapia celular; trauma raquimedular; discopatia; cinomose.

MONTEIRO, B.A. Evaluation of the effects of stem cells application on nervous system injury in dogs. Botucatu, 2017. Thesis (Doctorate) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Sao Paulo State University, Sao Paulo.

ABSTRACT

Spinal cord injury, intervertebral disc disease and distemper are disorders characterized by neurological signs, which are often difficult to treat. In this context, cell therapy seeks to minimize the signs and the neurological sequelae acquired by injuries, aiming to improve the patients' quality of life. Thus, the aim of this study was to evaluate the results of treatment with mesenchymal stem cells of adipose tissue in conditions of spinal cord injury, distemper sequelae and intervertebral disc disease of dogs treated at the Acupuncture and Chronic Pain Service of FMVZ-UNESP. Sixty-two animals were used, 14 of them with spinal cord injury, 18 with intervertebral disc disease and 30 with distemper sequelae, all submitted to previous neurological examination followed by cell therapy. A comparison between grades before and after treatment with allogenic adipose tissue MSCs for each type of injury was performed using the Mann-Whitney test for repeated measurements. A difference was observed between to the injury degree of the diseases treated. In the case of distemper, 43.3% (13/30) of the treated animals showed decreased neurological signs with a reduction in the injury degree. In animals with spinal cord injury was observed decrease in 50% (7/14) of injury degree, and 66.7% of the intervertebral disc disease animals (12/18) had a reduced injury degree. It can be concluded that mesenchymal stem cells in animals with nervous system injuries, it covers a medical clinic of second-hand products with neurological disorders of spindle trauma, discopathy and sequelae of distemper. It was concluded that the MSCs applications in animals with neurological disorders of spinal cord injury, intervertebral disc disease and distemper sequelae decreased the injury degree of the diseases treated.

Key words: dogs; cell therapy; spinal cord injury; intervertebral disc disease; distemper

CAPÍTULO 1

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O trauma raquimedular, a discopatia e a cinomose são distúrbios que se caracterizam por sinais neurológicos, os quais muitas vezes são de difícil recuperação. As terapias atuais buscam minimizar os sinais e as sequelas neurológicas adquiridas pelas doenças, com objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Os cães representam uma espécie frequentemente afetada por doenças espontâneas idiopáticas degenerativas e inflamatórias do SNC, as quais comumente compartilham muitas semelhanças com condições patológicas do SNC em homens. Dessa forma, além da importância na medicina veterinária são considerados um importante modelo translacional (SPTIZBARTH et al. 2012).

A doença do disco intervertebral (DDIV) é uma doença comum em cães, principalmente cães de raças condrodistróficas com meia-idade. Os sinais clínicos variam desde dor moderada a paraplegia. A disfunção neurológica é classificada em Graus de I a V, correspondente ao nível de dano da medula espinhal. Estudos anteriores indicaram que cães com Graus I a IV possuem boa melhora após tratamento médico ou cirúrgico, e cães com Grau V sem presença de dor profunda, e com lesão da medula espinhal grave somente demonstraram melhora após tratamento cirúrgico. Aproximadamente 60% das cirurgias descompressivas têm sucesso, mas existe pouca evidência do sucesso terapêutico com tratamento médico (KIM et al., 2016).

O tratamento atual para cães com trauma raquimedular (TRM) e DDIV é focado na eliminação da fonte do dano mecânico primário e consiste na descompressão cirúrgica da medula espinhal. No entanto, logo após o dano primário, uma cascata complexa e dinâmica de processos celulares incluindo inflamação, edema, isquemia, espécies reativas de oxigênio, excitotoxicidade e ativação microglial e astrocítica ocorrem. Este tipo de resposta é conhecido como “dano secundário” e ocorre segundos até semanas após o dano primário (WANG-LEANDRO et al., 2017).

A cinomose canina é uma enfermidade devastadora causada por uma infecção do RNA morbilivirus de cadeia simples pertencente à família Paramixoviridae. A infecção pelo vírus da cinomose causa doença sistêmica em diversas espécies de carnívoros e pode envolver os tratos respiratório e gastrointestinal, assim como o SNC (SUMMERS

et al., 1984; KRAKOWKA et al, 1987; MARTELLA et al., 2008; SPTIZBARTH et al. 2012).

O tratamento para cinomose é baseado na terapia de suporte e tratamento convencional, os quais não têm demonstrado serem muito efetivos. Diversas drogas antivirais usadas em estudos *in vitro* e *in vivo* se mostraram ineficazes até o presente momento, não sendo relatado um tratamento antiviral efetivo e seguro em cães com vírus da cinomose canina (PINHEIRO et al. 2016).

Sendo assim, devido à falta de tratamentos efetivos e pela severidade dos sinais clínicos, os quais constantemente progridem para sequelas neurológicas irreversíveis, a eutanásia é sempre uma indicação frequente para animais com cinomose (PINHEIRO et al. 2016).

Nem sempre as terapias convencionais apresentam bons resultados e os animais continuam manifestando sinais irreversíveis. Em um cenário atual das terapias de reabilitação, surgem novas perspectivas para o tratamento destas doenças. A fisioterapia, acupuntura, eletroacupuntura assim como a ozonioterapia são as ferramentas mais promissoras para o sucesso na recuperação e regeneração destes distúrbios.

Devido à sua capacidade imunomoduladora e atividade trófica, bem como à sua capacidade de regenerar tecidos lesados, as CTMs são uma alternativa para o tratamento de várias doenças. Além disso, representam uma população celular heterogênea e altamente proliferativa, com características de auto-renovação e múltipla capacidade de diferenciação *in vitro*. No tratamento de neuropatias, a aplicação de CTs visa à recuperação de animais para ou tetraplégicos, sem reflexos de micção e defecação, sendo considerada promissora.

A terapia celular utilizando células tronco adultas foi recentemente utilizada como uma modalidade terapêutica no TRM. As CTMs produzem diversos fatores neurotróficos e são diferenciados em várias células neurais. Além disso, demonstram melhora na função motora em modelos animais com TRM (KIM et al., 2016).

Poucos estudos foram desenvolvidos utilizando a aplicação de terapia celular em cães com lesão neurológica, sendo a maioria direcionada para camundongos, ratos, equinos e homens.

Como a recuperação funcional pode ser alcançada no SNC de mamíferos adultos é uma pergunta interessante, uma vez que o SNC adulto foi considerado durante muito

tempo como estático e incapaz de regenerar ou reparar por si só após uma lesão (BAREYRE, 2008).

Apesar dos resultados positivos obtidos em modelos experimentais utilizando uma variedade de espécies animais e o progresso recente em transplante celular, o desenvolvimento de poderosas estratégias para tratar TRM permanece um grande desafio clínico (PENHA et al., 2014).

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células tronco e terapia celular

CTMs são células mesodermas primordiais presentes em todos os tecidos e são capazes de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em diferentes tipos celulares. Seu potencial terapêutico é principalmente explicado pela produção de moléculas bioativas, que fornecem um microambiente regenerativo em tecidos lesionados (MARX et al., 2014).

O considerável potencial terapêutico das células tronco mesenquimais (CTMs) humanas gera um interesse crescente na área de terapia regenerativa. À medida que os estudos com terapia celular se desenvolveram, surgiram vários métodos de isolamento e expansão, assim como diferentes abordagens de caracterização das CTMs.

Dessa forma, Dominici *et al.* (2007) estabeleceram critérios mínimos para definir as CTMs humanas. Primeiramente, as CTMs devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultivo. Segundo, as mesmas devem expressar os marcadores CD 105, CD 73, CD 90 e não expressar CD 45, CD 34, CD 14, CD 19 e moléculas de superfície HLA-DR. Terceiro, as CTMs devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, condrócitos *in vitro* (DOMINICI, et al., 2007).

Na medicina regenerativa, as CTMs derivadas do tecido adiposo são uma área de pesquisa de crescimento constante e rápido. O isolamento das células do tecido adiposo implica no corte do tecido em pequenos fragmentos, que são submetidos à digestão enzimática, seguido de centrifugação. O *pellet* formado frequentemente denominado fração vascular estromal (FVE), é uma mistura heterogênea de células, incluindo fibroblastos, pericitos, células endoteliais, células sanguíneas e células tronco derivadas do tecido adiposo (MARX et al., 2014).

A população de CTMs isoladas do tecido adiposo tem recebido atenção especial, devido à facilidade de coleta, abundância e potencial regenerativo. Critérios mínimos

para definir estas células, tanto a fração vascular estromal fresca, quanto as CTs de tecido adiposo cultivadas, foram propostos pela Federação Internacional de Terapia Adipogênica e pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (MARX et al., 2014).

CTs derivadas do tecido adiposo têm sido empregadas na medicina veterinária, principalmente para lesões ósseas, tendíneas, ligamentares e articulares. CTMs de cães isoladas de medula óssea, sangue do cordão umbilical, tecido adiposo e gelatina de Wharton têm sido caracterizadas ou testadas para potencial terapêutico em modelos utilizando cães (MARX et al., 2014).

No entanto, apesar do aumento no uso de células tronco na clínica veterinária, poucos estudos investigaram adequadamente a eficácia da terapia celular. Além disso, alguns assuntos deveriam ser mais explorados, como o uso de células frescas da FVE ou CTAs, número de células utilizadas e a via de administração (MARX et al., 2014).

As CTs são capazes de auto-regular os fatores da cascata da inflamação, incluindo as citocinas pró-inflamatórias interleucinas-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ . Estes efeitos anti-inflamatórios podem ter influências profundas no ambiente tecidual local e igualmente influenciar a habilidade de investigadores em utilizar CTs alogênicas sem induzir uma resposta imune do hospedeiro (KIM et al. 2005).

O padrão de expressão de citocinas e receptores para fatores de crescimento das CTMs é dinâmico e complexo, e sugere que os progenitores mesenquimais na medula óssea contribuem para a formação e função do microambiente estromal. As CTMs secretam uma série de citocinas e fatores de crescimento com atividades parácrinas e autócrinas, tais como Il-6, Il-7, Il-8, Il-11, Il-12, Il-14, Il-15, fator estimulador de colônias macrófágicas (M-CSF), ligante de Flt-3 e Fator de Células Tronco (SCF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) e fator estimulador de colônias granulocítica-macrófágicas (GM-CSF) (MAJUMDAR et al. 1998, KIM et al. 2005).

Os fatores secretados produzem uma série de respostas no microambiente medular e no sistema imune local, além de potencializar a angiogênese, e induzir a proliferação e diferenciação de CTs teciduais (CAPLAN & DENNIS 2006).

A proporção de CTs transplantadas, que são incorporadas ao tecido lesado e que se diferenciam, não justifica a melhora funcional observada. Dessa forma, a regeneração tecidual após a aplicação de CTs pode ser explicada pela liberação de citocinas e fatores

tróficos no local da lesão. As CTs possuem a capacidade de migrar e identificar o local lesado, devido principalmente aos fatores quimiotáticos liberados pelo tecido. Além disso, acredita-se que estas células possam liberar outras moléculas devido à resposta de estímulos recebidos (SCHWINDT et al., 2005).

Existem várias hipóteses para as supostas funções destes fatores na lesão, dentre elas a produção de moléculas que previnam a morte celular; recrutamento de células adjacentes ao próprio tecido, havendo posterior diferenciação; modulação do próprio sistema imune, devido à inflamação provocada pelo dano no tecido; e a presença de moléculas ou enzimas que auxiliem nos defeitos metabólicos (SCHWINDT et al., 2005).

2.2 Caracterização imunofenotípica das CTMs de tecido adiposo

A terapia com células tronco adultas na medicina veterinária é uma área emergente de pesquisa básica e clínica. Como na medicina humana, as CTMs na veterinária oferecem muitos benefícios potenciais terapêuticos. Desde 2003, veterinários têm utilizado comercialmente células tronco de tecido adiposo para tratar lesões de tendão e ligamentos e enfermidades articulares em equinos (MARX et al., 2014). A caracterização de CTMs de cães, no entanto, é pouco definida se comparada com CTMs humanas. Além disso, não existe consenso em relação à expressão de marcadores de superfície de CTMs de cães (SCREVEN et al., 2014).

A expressão de marcadores específicos de CTMs animais é assunto de diversas pesquisas no momento. Recentemente, o cão ganhou interesse como modelo clínico para terapias baseadas em CTs e as CTMs de cães têm sido isoladas e estudadas *in vitro*. Além disso, existe um interesse crescente no uso de CTMs para o tratamento de lesões e doenças na espécie canina (IVANOVSKA et al. 2017).

Dessa forma, Ivanovska *et al.* (2017) caracterizaram imunofenotipicamente CTMs de cães derivadas de tecido adiposo perivisceral e subcutâneo, por meio de um painel espécie-específico de anticorpos. Foram utilizados 7 marcadores específicos de cão, como CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 e MHC-II. Todos os anticorpos utilizados demonstraram reatividade esperada. Os resultados foram positivos para CD29, CD44, CD73, CD90 e negativos para CD34, CD45 e MHC-II. Não houve diferença estatística na expressão de antígenos de superfície entre os dois grupos de CTMs utilizados.

Outro estudo desenvolvido por Screven *et al.* (2014) investigaram características de CTMs de cães derivadas de tecido adiposo e MO. Por meio da citometria de fluxo, CTMs foram definidas por serem CD90+, CD44-, MCH I+, CD14-, CD34- e MHC II -. Tais células foram posteriormente caracterizadas utilizando PCR em tempo real como CD105+, CD73+, CD14-, CD29+, MHC II+ e CD45-.

Dentre estes marcadores, as CTMs de cães diferem de células mononucleares do sangue periférico pela ausência da expressão gênica de CD45. Comparado com CTMs humanas, existe pouco conhecimento sobre a imunofenotipagem das CTMs de espécies animais. O conhecimento limitado de marcadores de CTMs na veterinária é devido em partes, a falta de anticorpos monoclonais espécie-específico para muitos marcadores celulares (SCREVEN *et al.*, 2014).

Assim, anticorpos não validados de reação cruzada de outras espécies, como humana e camundongo são comumente utilizados. Essas limitações contribuem na incapacidade de estabelecer um painel coerente de marcadores celulares de superfície para caracterização de CTMs animais (SCREVEN *et al.*, 2014).

Lee *et al.* (2014) cultivaram CTMs de tecido adiposo de cães em diversas passagens. Marcadores de superfície (CD44, CD90 e CD105) e moléculas associadas com auto-renovação (Oct3/4, SOX-2, Nanog) foram expressas nas células nas passagens 1 a 6 por RT-PCR. Além disso, as CTMs demonstraram potencial de diferenciação nas linhagens condrogênica e adipogênica nas passagens 1, 3 e 6. Dessa forma, as CTMs foram positivas para CD44, CD54, CD61, CD80, CD90, CD105 mas negativas para CD29, CD34, CD117 e MHC II.

2.3 Trauma raquimedular

O trauma raquimedular (TRM) é uma enfermidade com efeitos adversos em cães, incluindo paresia ou paralisia e incontinência fecal ou urinária. O TRM é considerado como uma condição médica sem tratamento efetivo. Tais lesões são comumente relatadas na medicina veterinária, principalmente em cães, onde normalmente ocorrem em associação a traumas, os quais são induzidos por prolapso de disco intervertebral ou fontes exógenas como acidentes com veículos motores. Em humanos entre três a cinco pessoas a cada 100.000 são afetadas com TRM (SARMENTO *et al.*, 2014).

Da mesma forma, uma escala é utilizada para avaliar a severidade da doença. O diagnóstico por imagem tem se tornado primordial para avaliação do prognóstico e para determinar o tratamento na extrusão do disco intervertebral. Para cães, os aspectos temporais do início e duração dos sinais clínicos após a ocorrência de hérnia de disco intervertebral, têm sido utilizados como indicadores de prognóstico, sugerindo que a avaliação clínica é essencial após TRM (SARMENTO et al., 2014).

A recuperação funcional está altamente relacionada com o grau de dano da medula espinhal, o qual é determinado pela velocidade da extrusão do disco, massa do material extruído, proporção do canal espinhal e diâmetro da medula, duração dos déficits neurológicos, e existência da percepção da dor profunda. A ausência da percepção da dor profunda é o fator primário que causa pobre melhora clínica. Os caminhos da percepção da dor profunda estão localizados bilateralmente na parte profunda da medula espinhal. A não existência da percepção da dor profunda sugere que existe dano à medula espinhal, mas não indica pior prognóstico necessariamente (KIM et al., 2016).

As causas mais comuns de TRM em cães são acidente de carro, ocorrendo próximo ou na região toracolombar e produzindo paraplegia crônica e completa. O disco danificado pode protuir ou extruir, exercendo pressão na ME, interrompendo o suprimento sanguíneo local. O TRM é considerado uma afecção traumática que induz a uma variedade de eventos patológicos, geralmente resulta num permanente estado de perda sensorial e motora (PENHA et al., 2014).

O TRM pode causar déficits no sistema urinário e pode incluir condições que são tanto crônicas e que põem em risco a vida do animal e/ou do homem. Além disso, pode causar uma diminuição significativa na qualidade de vida do homem e dos animais de companhia (PENHA et al., 2014).

O TRM é uma das principais causas de deficiência em adultos. Devido a organização da ME, a qual transmite informação sensorial ascendente para o cérebro e informação motora descendente para o corpo, o TRM tem consequências devastadoras e sempre resulta na perda permanente da função motora ou sensorial no local da lesão (BAREYRE, 2008).

Traumas raquimedulares podem ser classificados funcionalmente em completo e incompleto. No caso de traumas incompletos, em que algum grau imprevisível da função motora ou sensorial permanece intacto, pode ocorrer recuperação funcional espontânea (BAREYRE, 2008).

Tratamentos com células tronco têm sido realizados em modelos de animais e humanos com TRM, com resultados promissores. Particularmente, o transplante de CTs tem demonstrado melhorar o resultado funcional de experimentos com ratos com TRM. (BAREYRE, 2008).

Sendo assim, num estudo piloto realizado por Sarmiento *et al.* (2014), em que células tronco de medula óssea foram utilizadas para tratar sete cães com TRM, observou-se melhora das funções locomotora e sensitiva 90 dias após cirurgia. Além disso, os animais apresentaram aumento dos movimentos dos membros pélvicos e se mantiveram em estação e executaram pequenos movimentos. Além disso, o tônus da cauda foi observado em todos os animais, bem como os reflexos de dor e de defecação em cinco animais.

O trauma da medula espinhal dos mamíferos frequentemente leva à paralisia dos membros e outros distúrbios de função motora, os quais estão relacionados com a lesão no nervo espinhal. Zaim *et al.* (2012) revelaram que após a lesão dos nervos espinais, poucas células nervosas são geradas por auto-reparo endógeno, sendo difícil iniciar a regeneração da função do axônio, o que dificulta a reabilitação tardia. Nos últimos anos, o transplante de CTs da medula óssea e o desenvolvimento da engenharia do tecido nervoso tem permitido uma nova alternativa para o tratamento do TRM (SONG *et al.*, 2014).

O trauma medular (TM) induz morte apoptótica de neurônios na substância cinzenta e oligodendrócitos na substância branca, resultando na desmielinização e, conseqüentemente, disfunção da medula espinhal. A inflamação é uma das principais respostas secundárias que agrava a patogênese do TRM, induzindo apoptose neuronal (SONG *et al.*, 2014).

A micróglia, célula endógena do sistema imunológico do SNC, desempenha um papel crucial na indução da resposta inflamatória por mediadores inflamatórios, expressando mediadores tais como: citocinas pró-inflamatórias, cicloxigenase (COX) - 2, óxido nítrico sintase (iNOS) induzível, fator de crescimento pró-nervo (proNGF) e espécies reativas de oxigênio (ROS), depois da ativação por vários estimuladores inflamatórios. Assim, contribui para processos neurodegenerativos após a lesão (SONG *et al.*, 2014).

Dessa forma, RYU *et al.*, (2012) isolaram CTMs derivadas de gordura, medula óssea, gelatina de Wharton e sangue do cordão umbilical (SCU) de cães. Tais células

foram positivas para marcadores de CTMs e negativas para marcadores de células hematopoiéticas. Seus efeitos sobre a regeneração de TRM foram comparados.

As CTMs têm demonstrado sobreviver, proliferar, migrar e se diferenciar em fenótipos neuronais no cérebro danificado e ME (PENHA et al., 2014). Sendo assim, sugere-se que o transplante de CTMs promove a recuperação funcional após TRM. Além disso, a aplicação de CTMs do SCU levou a uma maior regeneração do nervo, neuroproteção e menos inflamação em comparação com outras fontes de CTMs (RYU et al., 2012).

Vários modelos experimentais vêm sendo utilizados pra o tratamento de LME. No entanto, nenhum método simples obteve um efeito curativo satisfatório. O transplante de células tem se tornado uma estratégia experimental amplamente utilizada. Uma variedade de tipos celulares, como CTs neurais, células de Schwann, células do bulbo olfatório e CTMs, são utilizadas como terapia (YAN et al., 2011).

Serigano *et al.* (2010) transplantaram CTMs autólogas da medula óssea em 30 cães da raça Beagle. CTMs foram transplantadas em discos degenerados numa concentração de 10^5 , 10^6 e 10^7 células por disco. Após avaliação radiográfica, microscópica e por ressonância magnética, foi observada a preservação da altura do disco e da estrutura anular nos grupos de transplante de células comparado com o grupo controle.

Além disso, as CTMs transplantadas na concentração de 10^6 células apresentaram número de células transplantadas remanescentes, taxa de sobrevivência das células do núcleo pulposo (NP) bem como as células apoptóticas do NP tanto um microambiente estrutural como matriz extracelular abundante mantidos quando comparadas com as outras concentrações (SERIGANO et al., 2010).

Num outro estudo desenvolvido por Jung et al. (2009) no qual foram utilizados cães da raça Beagle para comparar os efeitos do transplante de CTMs alogênicas e autólogas, CTMs foram aplicadas por via intratecal na coluna lombar, numa concentração de 1×10^7 células 7 dias após TRM. Tanto os sinais neurológicos, quanto o score de Olby, os resultados de RNM e exames histopatológicos apresentaram melhores resultados nos grupos autólogo e alogênico quando comparados com o grupo controle. Com relação às análises de imunofluorescência e mRNA para fatores neurotróficos, tanto as CTMs autólogas quanto as alogênicas demonstraram melhores resultados do que o grupo controle. Apesar das CTMs autólogas demonstrarem mais efeitos benéficos do que as

alogênicas, o transplante de CTMs alogênicas também foi capaz de promover recuperação funcional após TRM.

Em um estudo desenvolvido por Penha *et al.* (2014) em que foi avaliado o efeito do transplante terapêutico de CTMs autólogas derivadas da MO em quatro cães com TRM traumático, CTs foram aplicadas cirurgicamente no local da lesão. Sendo assim, os animais foram avaliados clinicamente e examinados por RNM. Os animais avaliados após o procedimento cirúrgico e transplante de CTMs apresentaram recuperação progressiva do reflexo de panículo e diminuição da resposta à dor profunda e superficial. Além disso, cada animal demonstrou uma melhora nesses parâmetros ao longo do tempo, bem como a recuperação do reflexo de consciência simultaneamente com a melhora da função da bexiga urinária e do intestino em dois dos quatro cães.

Adicionalmente, no 18º mês do acompanhamento clínico foi observada uma considerável evolução clínica, acompanhada pela melhora do movimento dos MPs em três dos quatro cães. No entanto, nenhuma melhora clínica foi associada com alterações na RNM.

Um estudo experimental revelou que a reparação total da área lesionada da medula espinhal para recuperação funcional pode não ser necessário para permitir a caminhada; apenas reparando 10-15% da conexão na medula espinhal pode ser suficiente. Uma melhor compreensão da fisiopatologia do TRM no início dos anos 80 com a neuroproteção, que se procedeu na década de 1990 e, eventualmente, o processo regenerativo tornou-se o foco principal dos pesquisadores (BESALTI *et al.*, 2015).

O progresso na compreensão da fisiopatologia, traumatologia, cirurgia intervencionista, instrumentação espinhal, reabilitação e medicina regenerativa entraram num nível crucial para a lesão medular. Este compromisso encoraja os investigadores a procurarem formas adequadas para curar esta doença devastadora que tem impacto no bem-estar emocional e físico dos indivíduos afetados e na sociedade (BESALTI *et al.*, 2015).

2.4 Lesão do sistema nervoso central e cinomose

A cinomose canina é uma enfermidade causada por uma infecção do RNA morbilivirus de cadeia simples pertencente à família Paramixoviridae. A infecção pelo vírus da cinomose causa doença sistêmica em diversas espécies de carnívoros e pode

envolver os tratos respiratório e gastrointestinal, assim como o SNC (SUMMERS et al., 1984; KRAKOWKA et al, 1987; MARTELLA et al., 2008; SPTIZBARTH et al. 2012).

O vírus da cinomose canina (VCC) é um gênero Morbillivirus, sendo um único vírus RNA de cadeia não-segmentado, conhecido por causar uma variedade de distúrbios em cães incluindo leucoencefalite desmielinizante (LED) (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; LEMPP et al., 2014).

A cinomose é considerada uma doença de duas fases: uma fase inicial (aguda e subaguda) e uma fase crônica (SPTIZBARTH et al. 2012), sendo considerada uma doença sistêmica que atinge os cães, caracterizada por vários sinais, incluindo febre, sinais respiratórios e entéricos e, ainda, desordens neurológicas. A doença clínica causada por VCC é descrita há anos inequivocadamente em livros do século XVII, relatando grandes epidemias em toda Europa (MARTELLA et al., 2008).

Krakowka *et al.* (1987) foram os primeiros autores a descrever a forma de propagação do VCC no SNC. Conforme observado pelos autores, a infecção endotelial do SNC é um evento regular e inicial, em que a subsequente transferência de infecção viral para glia e neurônios é precedida pelo extravasamento de leucócitos do sangue periférico por diversos dias.

A infecção pelo VCC em cães possui grande valor por servir como modelo para infecção de morbillivirus do homem, como por exemplo vírus do sarampo. Para ambos os vírus, os distúrbios associados à infecção do SNC são ocorrências regulares. Embora seja difícil de documentar, é provável que o envolvimento subclínico dos tecidos do SNC durante a infecção aguda por vcc se aproxime de 100% em cães jovens (KRAKOWKA et al, 1987).

O VCC é geralmente transmitido como uma infecção por aerossol que atinge o trato respiratório superior. A replicação primária do vírus ocorre nos tecidos linfáticos. A infecção destes tecidos está associada com imunossupressão grave de longa duração, que foi investigada extensivamente por KRAKOWKA et al., (1980) e KRAKOWKA (1982). Por volta de 10 dias após a infecção, VCC começa a se espalhar a partir de locais de replicação primário, para vários tecidos epiteliais e do SNC (LEMPP et al., 2014).

A capacidade do morbilivírus de invadir o SNC depende da magnitude e da duração da viremia e também das formas hematogênicas do vírus infeccioso. Para os tecidos que não pertencem ao SNC, a troca livre de substâncias sanguíneas entre os compartimentos

extravasculares, como parte do processo circulatório normal expõe o tecido parenquimatoso ao vírus infeccioso. Em contraste, a barreira hematoencefálica no SNC serve como impedimento à invasão do cérebro pelo vírus (KRAKOWKA et al, 1987).

A encefalomielite canina (EMC) é uma manifestação comum de infecção pelo VCC no cão. As expressões clínicas da cinomose muitas vezes se correlacionam negativamente com a natureza da lesão do SNC. Os achados neuropatológicos podem variar desde lesão neuronal aguda à alteração desmielinizante subaguda e encefalite esclerosante (KRAKOWKA et al, 1987).

A base para este amplo espectro clínico e patológico na encefalomielite canina não é clara. Krakowka e Koestner (1976) demonstraram uma influência relacionada à idade, refletindo o desenvolvimento e competência do sistema imunológico. Infecções experimentais em filhotes com menos de uma semana de idade provocaram morte em 85% dos cães destinatários enquanto que os desmamados (4 a 8 semanas de idade) eram muito mais resistentes (28,5% de mortalidade) (SUMMERS et al., 1984).

A doença neurológica pode manifestar-se como poliencefalite ou leucoencefalite, com uma incidência maior da última. Essa manifestação explícita de cinomose canina, referida como cinomose leucoencefálica, é acompanhada de desmielinização. Além disso, a cinomose compartilha muitas semelhanças com esclerose múltipla em humanos (SPTIZBARTH et al. 2012).

Eventos inflamatórios acompanhados de alterações moleculares na sinalização celular desempenham um papel chave na compreensão da patogenia da doença, bem como pode ser útil para elucidar o processo da desmielinização primária imunomediada (SPTIZBARTH et al. 2012).

O tratamento convencional para cinomose é baseado na terapia de suporte e tratamento convencional, os quais não têm demonstrado serem muito efetivos. Diversas drogas antivirais usadas em estudos *in vitro* e *in vivo* se mostraram ineficazes até o presente momento, não sendo relatado um tratamento antiviral efetivo e seguro em cães com VCC (PINHEIRO et al. 2016).

Não obstante, a incidência do VCC relacionado à doença em populações de cães ao redor do mundo, parece ter aumentado nas últimas décadas e diversos episódios da doença em animais vacinados têm sido relatados (MARTELLA et al., 2008).

Pinheiro *et al.* (2016) caracterizaram CTs derivadas do epitélio olfatório fetal de cães e avaliaram a resposta sistêmica de animais infectados com VCC, com terapia sintomática e tratamento com CTMs.

Sendo assim, as CTMs resultaram numa melhora não significativa quando aplicadas na fase aguda da cinomose canina, relacionada com os sinais clínicos agudos e neurológicos e a severidade da doença (PINHEIRO *et al.* 2016).

Nos últimos anos, foram feitos progressos significativos na compreensão dos mecanismos patogênicos da leucoencefalite desmielinizante (LED). Investigações *in vivo* e *in vitro* forneceram novos conhecimentos sobre sua patogênese com ênfase especial na interação axônio glia-mielina, nos potenciais mecanismos endógenos de regeneração, e na plasticidade astrócito-glia (LEMPP *et al.*, 2014).

LED é caracterizada pela presença de lesões com um grau variável de desmielinização e inflamação mononuclear, acompanhado por um conjunto de citocinas, bem como as metaloproteinases da matriz e seus inibidores. Apesar de décadas de investigação, vários novos aspectos da neuropatogênese da LED foram descritas apenas recentemente (LEMPP *et al.*, 2014).

A lesão axonal precoce é representada como uma lesão inicial e progressiva em LED, que curiosamente ocorre antes da desmielinização. Axoniopatia pode, assim, funcionar como um gatilho potencial para interações axônio-glia-mielina-subsequentes. Em particular, a detecção precoce de dano axonal sugere que a desmielinização é pelo menos em parte, um evento secundário em LED, desafiando assim o estigma da cinomose canina como uma doença desmielinizante puramente primária (LEMPP *et al.*, 2014).

Na maioria das cinomoses espontâneas, bem como nos estudos experimentais com as chamadas cepas de desmielinização, o vírus provoca lesões multifocais na substância cinzenta, bem como na substância branca do SNC. Na substância cinzenta, o VCC afeta neurônios, que pode levar à necrose neuronal e até mesmo polioencefalomalacia (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

O cérebro e a medula espinhal não podem substituir neurônios ou células da glia, que são perdidas por doença ou lesão traumática. Em estudos pré-clínico, no entanto, o transplante de CTs neurais e progenitoras podem promover recuperação funcional. Assim, o SNC é uma fonte reparadora competente, mas não possui recursos endógenos de CTs (TSO & MCKINNON, 2015).

Desmielinização não inflamatória inicial na infecção pelo VCC se desenvolve contra uma grave imunossupressão e é dessa forma considerada como induzida por vírus. No entanto foi observada uma invasão marcada de células T ao longo do SNC em cães com cinomose aguda apesar do grave dano ao sistema imune (TIPOLD et al, 2001).

Dessa forma, esse paradoxo foi investigado por meio da imunofenotipagem de linfócitos, seguido de desafio experimental com VCC em cães vacinados e não vacinados. Ao contrário dos infectados com o VCC, cães vacinados não se tornaram imunodeprimidos e exibiram uma forte resposta imune antiviral, seguido do desafio com VCC virulento. Em cães desprotegidos, uma rápida e drástica linfopenia foi relacionada com diminuição das células T (TIPOLD et al, 2001)

Uma estratégia para gerar células de pacientes-específicas seria a reprogramação de células autólogas, tais como fibroblastos em CTs pluripotentes, que podem, então, serem diferenciadas, em enxertos de células necessários (TSO & McKINNON, 2015).

Uma extensão recente desta tecnologia reprograma diretamente os fibroblastos em CTs finais sem utilizar uma CT pluripotente induzida (iPS). Para ambos os tipos de reprogramação, a eficiência de conversão é muito baixa, resultando na necessidade de amplificar as células em cultivo que podem levar à instabilidade cromossômica e neoplasia. Assim, para fazer a reprogramação biológica clinicamente viável, temos que melhorar a eficiência (TSO & McKINNON, 2015).

O maior desafio para o sucesso do tratamento da lesão medular é a capacidade regenerativa limitada do SNC e sua incapacidade para substituir neurônios e axônios perdidos após a lesão. Transplantes de células neurais derivadas de tecido do SNC fetal ou células tronco embrionárias (CTEs) são considerados uma terapia promissora, por meio da diferenciação em neurônios e células gliais, as quais têm o potencial de formar filamentos neuronais funcionais em todos os segmentos lesionados da medula espinhal (LEE-KUBLI & LU, 2015)

As doenças inflamatórias não-infecciosas do SNC do cão são desordens idiopáticas comuns, classificadas como meningoencefalomielite de origem desconhecida (MEOD). *Ante mortem* o diagnóstico é feito por meio da avaliação dos sinais clínicos, ressonância magnética, e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), mas o diagnóstico definitivo deve ser o exame histopatológico. MEOD são na maior parte consideradas doenças

auto-ímmunes do SNC, de modo que suprimir a reação imune é o melhor método de tratamento para os pacientes (ZEIRA et al., 2015).

CTMs estão sendo utilizadas para o tratamento de doenças auto-ímmunes e degenerativas, devido à sua capacidade imunomoduladora e suas propriedades regenerativas. Sendo assim, Zeira *et al.* (2015) verificaram a segurança, viabilidade e eficácia do tratamento com CTMs em doenças auto-ímmunes inflamatórias idiopáticas do SNC de cães. Para isso, foram utilizados oito cães que apresentavam início agudo e progressão rápida de sinais neurológicos multifocais (ZEIRA et al., 2015).

Dessa forma, o uso de CTMs autólogas em cães com MEOD, foi considerado seguro. Não foram observados efeitos adversos nem a curto ou longo prazo. Todos os cães apresentaram melhora inicial nas condições neurológicas gerais, principalmente da dor cervical (ZEIRA et al., 2015).

2.5 Discopatia

2.5.1 Patogenia e sinais clínicos

A função do disco intervertebral (DIV) é proporcionar estabilidade, mobilidade e flexibilidade para a coluna vertebral, absorver choque e dispersar pressão. O núcleo pulposo central altamente especializado é a parte dinâmica e funcional do disco, devido ao fato da água permitir que ele atue como uma almofada hidráulica, enquanto o ânulo externo fibroso de colágeno fornece a maioria da força e tenacidade do disco (ROSENBLATT et al., 2014).

A doença do disco intervertebral (DDIV) é um endurecimento prematuro do centro do disco associado a uma disfunção da parte externa ou ânulo, o qual torna-se fraco. Com a fraqueza do ânulo, este rompe-se e o núcleo pulposo extrui contra a medula espinhal. A dor e os sinais neurológicos atribuídos à DDIV são relacionados provavelmente tanto à compressão quanto à inflamação da medula espinhal (JOAQUIM et al., 2010).

A DDIV é uma doença neurológica onde os discos intervertebrais tornam-se doentes e comprimem a ME, levando a dor, fraqueza e, em alguns casos, paralisia. A DDIV afeta muitas raças, mas é um grande problema nas raças dachshund, principalmente. Dachshunds possuem um risco 10-12 vezes maior do que outras raças, e estima-se que 19 a 24% dos dachshunds mostram sinais de DDIV durante sua vida (PACKER et al., 2016). Durante os últimos 60 anos, DDIV tem sido o foco de pesquisas significativas

com o objetivo de descrever e compreender esta condição debilitante e para melhorar diagnósticos de imagem e opções terapêuticas para pacientes clínicos (BRISSON, 2010).

A degeneração do DIV é comum em cães. Apesar de frequentemente não causar sinais clínicos da doença, a degeneração do DIV pode levar à herniação do DIV cervical, espondilomielopatia e estenose degenerativa lombossacra. Diferentes fatores etiológicos têm sido relatados, como origem genética, trauma, nutrição inadequada, envelhecimento fisiológico e histórico de peso (BERGKNUT et al. 2013).

As enfermidades do disco intervertebral são doenças neurológicas frequentemente encontradas na prática clínica. A compreensão das alterações patológicas associadas à discopatias, ainda não é completa. A opção pelo tratamento clínico ou cirúrgico varia com os achados clínicos e a experiência do médico veterinário (JOAQUIM, 2008).

Alterações degenerativas em DIV são geralmente referidas como condrodistróficas e não-condrodistróficas ou ainda como metaplasia condróide e metaplasia fibrosa, respectivamente (BRISSON, 2010).

A degeneração do DIV é um processo complexo e autoperpetuante. Muitos aspectos vistos em cães condrodistróficos, como o dachshund variam daqueles que ocorrem em raças não-condrodistróficas. A metaplasia condróide começa tipicamente em uma idade muito jovem, e é caracterizada por maturação rápida, em que as células recentemente formadas tendem a ser semelhantes à condrocitos ao invés de serem originadas da notocorda nativa. Ao atingir um ano de idade a maioria do NP gelatinoso formado anteriormente pode consistir em cartilagem hialina (ROSENBLATT et al., 2014).

O NP endurecido e, muitas vezes calcificado, está agora predisposto à ruptura através do AF sob estresse mínimo, com deslocamento dorsal explosivo do material do disco para o canal vertebral (doença do disco Hansen tipo I) (ROSENBLATT et al., 2014).

A nutrição dos discos ocorre por difusão, sendo assim a movimentação das vértebras e consequentemente dos animais, contribuem para a sua nutrição. Desta forma, as calcificações estão relacionadas à fisiopatologia da DDIV, já que esta é caracterizada por perda de água, de glicosaminoglicanos, de hexosaminas, ácido siálico, proteína não colágena e galactosamina (GARIBALDI, 2003; SHEALY *et al.*, 2004).

Sendo assim, a compressão discal é um fator inicializador e não uma causa em si de reações dolorosas, sendo necessário utilizar-se de técnicas de tratamento que não visem

descomprimir o disco sobre as raízes nervosas, mas sim modular o processo inflamatório e vascular envolvidos (JOAQUIM et al., 2010).

A DDIV afeta a maioria das raças de cães condrodistróficas, com a maior incidência em cães com três a seis anos de idade. Nestas raças, mais de 85% dos cães têm envolvimento da região do disco vertebral entre T11-T12 (vértebras torácicas 11 a 12), L2-L3 (vértebras lombares dois a três) e 50% tem envolvimento da região entre T12-T13 e T13-L1 (JOAQUIM et al., 2010).

Os sinais clínicos primários incluem dor na região vertebral, déficits somatossensoriais e motores dos membros pélvicos e disfunção genitourinária. A DDIV pode afetar diversas áreas da coluna vertebral e os sinais clínicos variam de acordo com a área da coluna vertebral e o segmento da medula espinhal afetados (JOAQUIM et al., 2010).

A prevalência estimada de DDIV ao longo da vida da população canina é de 2-3,5%. A prevalência é muito maior em certas raças, entretanto, dachshund é de longe a de maior prevalência. Espera-se que 19 a 25% dos dachshunds apresentem sinais clínicos de DDIV em sua vida, com um risco relativo de doença 9,9-12,6 vezes maior do que a população geral de cães. Além disso, dachshunds com DDIV constituem 45-84,6% de todos os casos agudos de DDIV atendidos na clínica veterinária. O pico de manifestação da doença ocorre entre três e 7 anos em raças condrodistróficas, e o pico em dachshunds entre quatro e 6 anos de idade (ROSENBLATT et al., 2014).

As evidências histológicas de mineralizações de disco, que podem resultar em DDIV, foram relatadas em 46-48% do DIV de dachshunds. O aumento do risco de DDIV em dachshunds foi atribuído principalmente à conformação condrodistrófica 'longa e baixa', com o exagero destas proporções comprimento-altura associado ao maior risco de extrusão de disco (PACKER et al., 2016).

A condrodistrofia está associada à expressão de um retrogene que codifica o fator 4 de crescimento de fibroblastos (FGF4) localizado no cromossomo 18. Contudo, um espectro de degeneração de disco e IVDE / IVDP é visto entre as raças condrodistróficas, sugerindo uma etiologia multifatorial envolvendo efeitos de vários genes e interações ambientais (PACKER et al., 2016).

O prognóstico para a recuperação funcional da DDIV toracolombar está altamente relacionada à lesão interna da medula espinhal. Extrusões agudas de disco de alta velocidade geralmente têm um prognóstico mais reservado do que extrusões de disco

mais leves. O pobre resultado clínico está associado a déficits neurológicos graves, especialmente à perda da percepção da dor profunda e na duração da sua ausência nos membros posteriores. A doença que ocorre naturalmente é uma doença crucial para a medicina translacional para o ser humano (BESALTI et al., 2015).

Um estudo relatou que cães ambulatoriais com dor na coluna e sem déficits neurológicos podem ter considerável compressão da ME, com resultado geralmente favorável após hemilaminectomia. Olby *et al.*, 2014 relataram que um subconjunto de cães ambulatoriais que passaram por hemilaminectomia notadamente melhoraram os *scores* neurológicos nas primeiras semanas após cirurgia, apesar da recuperação total ter levado até 12 semanas em alguns cães, com alguns apresentando ataxia contínua ao término do estudo (INGRAM et al., 2013).

Enquanto os cães com presença de dor profunda são mais susceptíveis de recuperar a ambulação seguida ou não de tratamento cirúrgico, a perda da dor profunda é comumente associada com prognóstico reservado ou pobre, particularmente quando esta se manteve por mais de 48 h antes da cirurgia (CHAMISHA et al., 2015).

No entanto, é observada uma taxa de recuperação neurológica significativamente mais elevada em cães que permaneceram com a dor profunda duas semanas após a cirurgia, em comparação com cães que permaneceram com dor profunda ausente, tornando assim a recuperação da dor profunda dentro de duas semanas no pós-operatório uma ferramenta prognóstica útil para a recuperação neurológica (CHAMISHA et al., 2015).

Mesmo assim, as taxas de recuperação nesses casos ainda variam consideravelmente entre 0% e 76%. Por esta razão, indicadores prognósticos mais precisos são necessários nesses cães (CHAMISHA et al., 2015).

Laitinen *et al.* (2005) revisaram casos de 46 cães com DDIIV toracolombar com perda da percepção da dor profunda antes da cirurgia descompressiva. Destes casos, 19 cães (41,3%) se recuperaram com um período médio de acompanhamento de 12,5 meses. A recuperação foi definida como uma paraparesia ambulatória, ou melhor, com continência urinária e fecal.

Sendo assim, foi observada uma melhora em cães com perda de dor profunda menos de 24 horas antes da cirurgia (19/41; 46,3% recuperados) do que em cães sem percepção de dor profunda por mais de 24 horas (0/5; 0% recuperado). Cães com percepção de dor profunda presente duas semanas após a cirurgia obtiveram uma taxa

de sucesso significativamente maior (8/12, 66,7% recuperados) do que em cães sem percepção de dor profunda neste período de tempo (1/10; 10,0% recuperado). O retorno da percepção da dor em duas semanas pós-operatória pode ser considerado segundo os autores um indicador prognóstico positivo útil (LAITNEN et al., 2005).

Um diagnóstico presuntivo da DDIV baseado nos sinais clínicos, histórico e exame neurológico podem ser confirmados por técnicas de imagem e/ou cirurgia.

Diversas técnicas de diagnóstico por imagem estão disponíveis para diagnosticar e localizar a DDIV. A mielografia foi utilizada durante muito tempo como a principal técnica, no entanto é altamente invasiva, com comprovados efeitos colaterais pela infusão intratecal de material de contraste neurotóxico. A tomografia computadorizada permite melhor resolução de contraste, capacidade de reformatação de imagem e período curto de realização do exame, além de remover problemas com superposição (ROSENBLATT et al., 2014).

A mais recente técnica de diagnóstico por imagem é a ressonância magnética, a qual é considerada uma técnica não invasiva, segura e acurada para diagnóstica da DDIV canina. Quando esta está disponível é considerada a melhor modalidade para visualizar a medula, pois a ressonância oferece contraste superior do tecido e capacidade de imagem multiplanar, assim como visualização direta das lesões que afetam o parênquima da ME (ROSENBLATT et al., 2014).

Dessa forma, Manunta *et al.* (2015) realizaram tratamento conservativo e cirúrgico em 7 cães de raças variadas com extrusão de núcleo pulposo hidratado (ENPH), em que relataram os sinais clínicos, os achados de ressonância magnética (RNM), o tratamento e o acompanhamento dos cães. Todos os cães tiveram tetraparesia ou tetraplegia.

A RNM revelou presença de material extradural homogêneo hiperintenso comprimindo o canal da medula espinhal cervical. Após tratamento conservador (cinco cães) ou descompressão cirúrgica (dois cães), todos os cães retornaram a função ambulatoria dentro de um mês. A RNM de seguimento em cães tratados de forma conservadora revelou desaparecimento do material extrudido, assim como os exames histopatológicos dos animais submetidos à cirurgia, confirmaram a presença de núcleo pulposo extrudido com evidência de degeneração precoce (MANUNTA et al., 2015).

O prognóstico para cães com DDIV é influenciado por diversos fatores, especialmente o grau da perda sensorial e motora na apresentação (perda ou ausência de nocicepção profunda é considerada o indicador de prognóstico mais importante). Raças

pequenas ou condrodistróficas não ambulatórias, que mantiveram a nocicepção profunda apresentam taxas de recuperação em torno de 86-96% após cirurgia descompressiva, comparados com 50% de cães paraplégicos com perda da nocicepção profunda (ROSENBLATT et al., 2014).

Além disso, enquanto muitos cães voltam a andar após a cirurgia um número significativo (20-25% dos cães condrodistróficos) mantêm a marcha e déficits neurológicos, incluindo incontinência urinária e fecal e auto-mutilação (ROSENBLATT et al., 2014).

Sendo assim, aproximadamente 15% dos cães não alcançam melhora funcional após cirurgia descompressiva. Nos casos mais crônicos a DDIV leva à diminuição da duração e qualidade de vida de vários cães afetados pela doença, mesmo após intervenção cirúrgica custosa. Além do mais, nem todos os proprietários prosseguem com o tratamento dos seus cães devido à restrições financeiras ou pela impossibilidade de cuidar do animal à longo prazo. Quase sempre o mesmo apresenta déficits neurológicos e acaba sendo eutanasiado devido à sua condição (ROSENBLATT et al., 2014).

Dor lombar é um sintoma extremamente comum, que afeta até $\frac{3}{4}$ da população humana em algum momento da vida. Uma vez que a hérnia de disco é considerada uma extensão de uma degeneração progressiva, que coincide com o processo de envelhecimento normal, buscar uma terapia eficaz que evite a degeneração do disco tem sido considerada uma tentativa lógica para reduzir os sintomas da dor lombar (HOHAUS et al., 2008).

Apesar de vários estudos terem descrito características histológicas de degeneração do DIV canino, sua patogenia não está totalmente esclarecida. Tratamentos atuais para doença degenerativa do DIV em cães incluem tratamento conservador (repouso, antiinflamatórios e analgésicos) e cirurgia com descompressão do tecido neuronal, associado com estabilização do segmento espinhal quando necessário (BERGKNUT et al. 2013).

Como nenhuma dessas abordagens restabelecem a função biomecânica do segmento espinhal afetado, é provável que a degeneração do DIV, o que pode levar à rigidez do mesmo, e ao aumento do risco de doença no segmento adjacente. Tratamentos regenerativos que restabelecem a função biomecânica normal do DIV iria eliminar o risco de afetar o segmento adjacente e seria um tratamento de eleição para desordens degenerativas do DIV (BERGKNUT et al. 2013).

Opções de tratamentos são baseadas na experiência clínica do veterinário e não em dados de literatura. A recuperação da função neurológica pode ser alcançada com tratamento cirúrgico ou não. O tratamento não cirúrgico envolve descanso num espaço confinado e uso de anti-inflamatórios e analgésicos. O principal método de tratamento é a descompressão cirúrgica, no entanto, equipamentos precisos de diagnóstico por imagem são necessários, bem como um cirurgião especialista, no caso de uma intervenção cirúrgica de emergência (JOAQUIM et al., 2010).

Além disso, é altamente recomendado a realização de intervenção cirúrgica o mais rápido possível após o início dos sinais neurológicos, uma vez que a taxa de sucesso é reduzida quando a cirurgia é adiada por mais de 48 horas, quando não há percepção dos sinais clínicos (JOAQUIM et al., 2010).

Dessa forma, Hohaus *et al.* (2008) desenvolveram um modelo experimental com cães para investigar a hipótese de transplante de condrocitos derivados do disco, em discos intervertebrais degenerados (HOHAUS et al., 2008). Tais autores demonstraram que as células do disco permaneceram viáveis após transplante, além das células transplantadas no disco produzirem matriz extracelular que continham componentes similares a tecidos normais do DIV (HOHAUS et al., 2008)

Sendo assim, dos pacientes que receberam transplante de células autólogas do disco tiveram maior redução da dor em dois anos, quando comparados com os pacientes que não receberam células, seguida de cirurgia de discotomia. Já os discos de pacientes que receberam células demonstraram uma diferença significativa, assim como o grupo tratado quando comparado com o controle (HOHAUS et al., 2008)

Células autólogas derivadas do disco são consideradas tecnicamente viáveis e biologicamente relevantes para reparo e retardo na degeneração e danos causados no DIV.

Kim *et al.* (2016) trataram 34 cães sem percepção de dor profunda devido à DDIV toracolombar aguda, os quais foram submetidos à cirurgia de descompressão uma semana após diagnóstico. Todos os cães foram submetidos à hemilaminectomia. As CTMs derivadas de adiposo (CTMs-TA) foram transplantadas para o parênquima da ME dos cães. O resultado à longo prazo foi avaliado no final do período de acompanhamento (6 meses). O tratamento associado com CTMs-TA mostrou melhores resultados de recuperação em comparação com a cirurgia de descompressão isoladamente. Esses resultados indicam que a terapia celular é uma estratégia

terapêutica potencial para superar as limitações do tratamento para lesão medular em clínica médica veterinária.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste experimento foi avaliar os efeitos da aplicação de células tronco mesenquimais alogênicas, provenientes do tecido adiposo em lesões de trauma raquimedular, discopatia e sequela de cinomose de cães. Para tanto os seguintes objetivos específicos foram avaliados:

1. Avaliar a resposta terapêutica da administração de CTMs alogênicas do tecido adiposo em cães atendidos com sequela de cinomose, discopatia e trauma raquimedular;
2. Avaliar a eficiência na utilização de um banco de células, visando agilidade na aplicação terapêutica;
3. Avaliar a evolução dos animais submetido ao tratamento com CTMs;
4. Avaliar os possíveis efeitos adversos nos animais submetidos ao tratamento com terapia celular;
5. Verificar se a melhora clínica está relacionada com a quantidade de tratamentos utilizados.

REFERÊNCIAS

AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, v.82, p.416–422, 2007.

BAREYRE, F.M. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 265, p.63–72, 2008.

BERGKNUT, N.; MEIJ, B.P.; HAGMAN, R.; DE NIES, K.S.; RUTGES, J.P.; SMOLDERS, L.A.; CREEMERS, L.B.; LAGERSTEDT, A.S.; H.A.W.; HAZEWINKEL, H.A.W.; GRINWIS, G.C.M. Intervertebral disc disease in dogs – Part 1: A new histological grading scheme for classification of intervertebral disc degeneration in dogs. **The Veterinary Journal**, v.195, p. 156-163, 2013.

BESALTI, O.; CAN, P.; AKPINAR, E.; AKTAS, Z.; ELCIN, A.E.; ELCIN, Y.M. Intraspinal Transplantation of Autologous Neurogenically-Induced Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Paraplegic Dogs without Deep Pain Perception Secondary to Intervertebral Disk Disease. **Turkish Neurosurgery**, v. 25, n°.4, p.625-632, 2015.

BLACK, L.L.; GAYNOR, J.; ADAMS, C.; DHUPA, S.; SAMS, A.E.; TAYLOR, R.; HARMAN, S.; GINGERICH, D.; HARMAN. Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Clinical Signs of Chronic Osteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. **Veterinary Therapeutics**, v. 9, n°. 3, 2008.

BRISSON, B.A. Intervertebral Disc Disease in Dogs. **Veterinary Clinics of Small Animals**, v.40, p.829–858, 2010.

CHAMISHA, Y.; AROCH, I.; KUZU, S.; SRUGO, I.; BDOLAH-ABRAM, T.; CHAI, O.; CHRISTOPHER, M. M.; MERBL, Y.; ROTHWELL, K.; SHAMIR, M.H. The prognostic value of cerebrospinal fluid characteristics in dogs without deep pain perception due to thoracolumbar disc herniation. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p.189–196, 2015.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.98, n°.5, p. 1076-1084, 2006.

CHOI, D.C.; LEE, J.Y.; MOON, Y.J.; SHIN W. KIM, S.W.; OH ,T.H.; YUNE,T.Y. Acupuncture-mediated inhibition of inflammation facilitates significant functional recovery after spinal cord injury. **Neurobiology of Disease**, v.39, p. 272–282, 2010.

DOMINICI M., LE BLANC K., MUELLER I., SLAPER-CORTENBACH L, MARINI F.C., KRAUSE D.S., DEANS R.J., KEATING A., PORKCOP D.J. & HOWITZ E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stroma cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 8, p.315-317.

GARIBALDI, L. Afecciones En La Cauda Equina, Medula Espinal y Raices Espinales. In: PELLEGRINO, F., SURANITI, A., GARIBALDI, L. (Eds). **El Libro de Neurología para La practica clinica**. Buenos Aires: Inter-Medica Editorial, 2003. cap.06, p.123-160.

HEADLEY, S.A.; SOARES, I.C.; GRAÇA, D.L. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)-immunoreactive Astrocytes in Dogs Infected with Canine Distemper Virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p.90–97, 2001.

HOHAUS, C.; GANEY, T.M.; MEISEL, H.J. Cell transplantation in spine disc degeneration disease. **European Spine Journal**, v.17, p.492-503, 2008.

INGRAM, E.A.; KALE, D.C.; BALFOUR, R.J. Hemilaminectomy for Thoracolumbar Hansen Type I Intervertebral Disk Disease in Ambulatory Dogs With or Without Neurologic Deficits: 39 cases (2008–2010). **Veterinary Surgery**, v.42, p.924–931, 2013.

JOAQUIM, J.G.F.; LUNA, S.P.L.; BRONDANI, J.T.; TORELLI, S.R.; RAHAL, C.S.; FREITAS, F.P. Comparison of decompressive surgery, electroacupuncture, and decompressive surgery followed by electroacupuncture for the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe neurologic deficits. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 236, p.1225-1229, 2010.

JUNG,D.,I.; HA, J.; KANG, B.T.; KIM, J.W.; QUAN, F.S.; LEE, J.H.; WOO, E.J.; PARK, H.M. A Comparison Of Autologous And Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation In Canine Spinal Cord Injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 285, p.67–77, 2009.

KIM, D.H.; YOO, K.H.; CHOI, K.S.; CHOI J.; CHOI, S.Y.; YANG, S.E.; YANG, Y.S.; IM, H.J.; KIM, K.H.; JUNG, H.L.; SUNG, K.W.; KOO, H.H. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. **Cytokine**, v.31, n°.2, p.119-26, 2005.

KIM, Y.; LEE, S.H.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, p.123-126, 2016.

KRAKOWKA, S.; CORK, L.C.; WINKELSTEIN; J.A.; AXTHELMS. M.K. Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.17, p. 471-482, 1987.

KRAKOWKA, S.; XTHELM; M.K.A.; GORHAM, J.R. Effects of induced thrombocytopenia on viral invasion of the central nervous system in canine distemper virus infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 97, 1987.

LAIM, A.; JAGGY, A.; FORTERRE, F.; DOHERR, M.; AESCHBACHER, G.;GLARDON, O. Effects of adjunct electroacupuncture on severity of postoperative pain in dogs undergoing hemilaminectomy because of acute thoracolumbar

intervertebral disk disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 234, p.1141-1146, 2009.

LAITINEN, O.M.; PUERTO D.A. Surgical Decompression in Dogs with Thoracolumbar Intervertebral Disc Disease and Loss of Deep Pain Perception: A Retrospective Study of 46 Cases. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n°. 1-2, 2005.

LEE, S.K.; KANG, H.W.; LEE, H.T.; KIM, H.J.; KIM, C.L.; JAE-YOUNG SONG, J.Y.; LEE, K.W.; CHA, H. Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Research in Veterinary Science**, v.96, p.267-275, 2014.

LEE-KUBLI, C.A.; LU, P. Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell therapies for spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v.10, 2015.

LEMPP, C.; SPITZBARTH, I.; PUFF, C.; CANA, A.; KEGLER, K.; TECHANGAMSUWAN, S.; BAUMGÄRTNER, W.; SEEHUSEN, F. New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. **Viruses**, v.6, p.2571-2601, 2014.

LIM, J.Y.; JEONG, C.H.; JUN, J.A.; KIM, S.M.; RYU, C.H.; HOU, Y.; OH, W.; CHANG, J.W.; JEUN, S.S. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. **Stem Cell Research & Therapy**, v.2, 2011.

MAJUMDAR, M.K.; THIEDE, M.A.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.; GERSON, S. L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.176, n.1, p. 57-66, 1998.

MANUNTA, M.L.; M.A. EVANGELISTI, M.A.; N. BERGKNUT, N.; GRINWIS, G.C.M.; I. BALLOCCO, I.; MEIJ, B.P. Hydrated nucleus pulposus herniation in seven dogs. **The Veterinary Journal**, v.203, p.342-344, 2015

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper virus. **Veterinary Clinics Small Animals**, v.38, p.787-797, 2008.

MARX, C.; SILVEIRA, M.D.; ISABEL SELBACH, I.; SILVA, A.S. BRAGA, L.M.G.M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N.B. Acupoint Injection of Autologous Stromal Vascular Fraction and Allogeneic Adipose-Derived Stem Cells to Treat Hip Dysplasia in Dogs. **Stem Cells International**, v. 2014, 6p, 2014.

PENHA, E.M.; MEIRA, C.S.; GUIMARÃES, E.G.; MENDONÇA, M.V.P.; GRAVELY, F.A.; PINHEIRO, C.M.B.; PINHEIRO, T.M.B.; BARROUIN-MELO, S.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B.P. Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. **Stem Cells International**, v. 2014, 8 p, 2014.

PINHEIRO, A.O.; CARDOSO, M.T.; VIDANE, A.S.; CASALS, J.B.; PASSARELLI, D.; ALENCAR, A.L.F.; SOUSA, R.L.M.; FANTINATO-NETO, P.; OLIVEIRA,

V.C.; LARA, V.M. ;AMBRÓSIO, C.E. Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute phase of canine distemper disease. **Genetics and Molecular Research**, v.15, 2016

RYU, H.H.; KANG, B.J.; PARK, S.S.; KIM, Y.S.; SUNG, G.J.; WOO, H.M.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.74, p.1617–1630, 2012.

SANTOS, B. P. C. R. Efeito da acupuntura no tratamento de animais com sequelas neurológicas decorrentes de cinomose. 2013. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

SARMENTO, C.A.P.; RODRIGUES,M.N.; BOCABELLO,R.Z.; ANDREA MARIA MESS, A.M. MARIA MIGLINO, M.A. Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. **Regenerative Medicine Research**, v.2, n°.9, 2014.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n°.1, p. 13-19, 2005.

SERIGANO, K.; SAKAI, D.; HIYAMA, A.; TAMURA,F.; MASAHIRO TANAKA, M.; MOCHIDA, J. Effect of Cell Number on Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Canine Disc Degeneration Model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.28, p. 1267-1275, 2010.

SHEALY, P.; THOMAS, W.B.; IMMEL, L. Neurologic Conditions and Physical Rehabilitation of the Neurologic Patient. In: MILLIS, D.L.; LEVINE, D.; TAYLOR, R.A. **Canine Rehabilitation & Physical Therapy**. St. Louis: Saunders, 2004. Chap. 22, p.388-403.

SONG,Q.; XU, R.; ZHANG,Q.; MA,M.; ZHAO, X. Therapeutic effect of transplanting bone mesenchymal stem cells on the hind limbs' motor function of rats with acute spinal cord injury. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, p.262-267, 2014.

SPITZBARTH, W. BAUMGÄRTNER, A. BEINEKE. The role of pro- and anti inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.147, p. 6– 24, 2012.

SUMMERS, B.A.; GREISEN, H.A.; APPEL, M.J.G. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. **Journal of Comparative Pathology**, v.94, p-65-75, 1984.

TSO, D.; McKINNON, R.D. Cell replacement therapy for central nervous system disease. **Neural Regeneration Research**, v. 10, p.1356-1358, 2015.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v.44, 1995.

YAN, Q.; RUAN , J.W.; DING , Y.; LI , W.J.; LI, Y.; ZENG, Y.S. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.63, p.151–156, 2011.

ZAIM M, KARAMAN S, CETIN G, ISIK S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Ann Hematol**, v.91, p.1175-86, 2012.

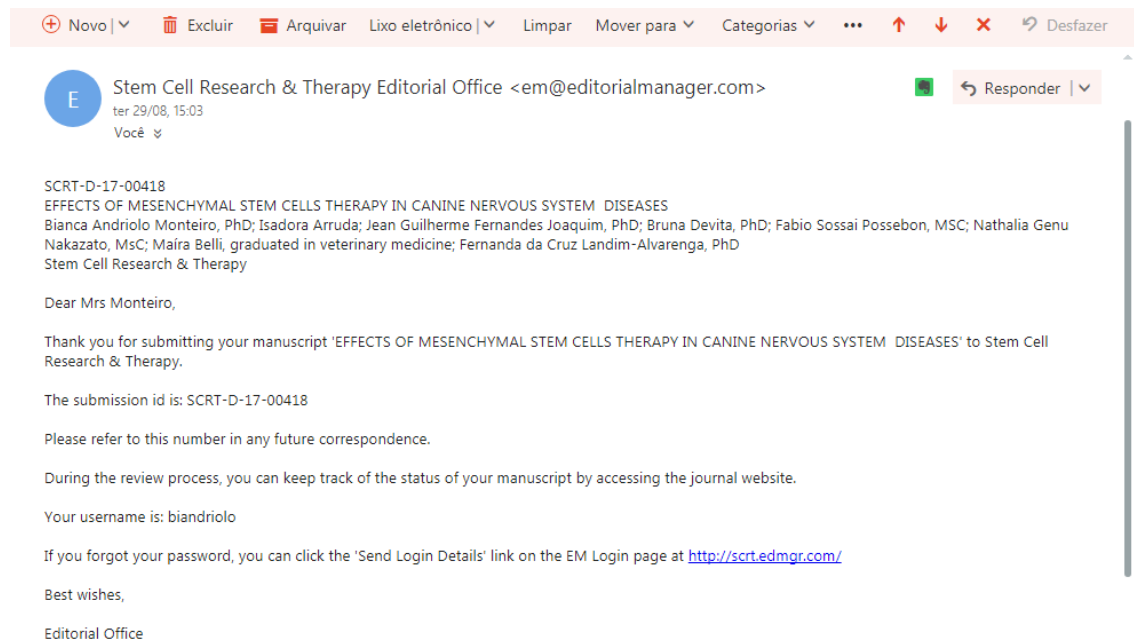
ZEIRA, O.; ASIAG, N.; ARALLA, M.; GHEZZI, E.; PETTINARI, L.; MARTINELLI, L.; ZAHIRPOUR, D.; DUMA.; SCACCIA, S.; MARTIN KONAR, M.; CANTILE, C. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. **Journal of Neuroinflammation**, v.12, 2015.

WANG, X.; WANG,YU.; WENLONG, G.; QIANG, L.; JIANG, P.; SHIBI, L. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. **International Orthopaedics**, v. 37, p.2491–2498, 2013.

WANG-LEANDRO, A.; SIEDENBURG , J.S.; HOBERT, M.K.; DZIALLAS, P.; ROHN, K.; V.M. STEIN, V.M.; TIPOLD, A. Comparison of Preoperative Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Clinical Assessment of Deep Pain Perception as Prognostic Tools for Early Recovery of Motor Function in Paraplegic Dogs with Intervertebral Disk Herniations. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2017

CAPÍTULO 2

Artigo enviado para a Revista “ Stem Cells Research and Therapy” intitulado “Effects Of Mesenchymal Stem Cells Therapy In Canine Nervous System Diseases” (SCRT-D-17-00418).



Novo | Excluir | Arquivar | Lixo eletrônico | Limpar | Mover para | Categorias | Responder

E Stem Cell Research & Therapy Editorial Office <em@editorialmanager.com>
ter 29/08, 15:03
Você

SCRT-D-17-00418
EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELLS THERAPY IN CANINE NERVOUS SYSTEM DISEASES
Bianca Andriolo Monteiro, PhD; Isadora Arruda; Jean Guilherme Fernandes Joaquim, PhD; Bruna Devita, PhD; Fabio Sossai Possebon, MSC; Nathalia Genu Nakazato, MsC; Maira Belli, graduated in veterinary medicine; Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, PhD
Stem Cell Research & Therapy

Dear Mrs Monteiro,

Thank you for submitting your manuscript 'EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELLS THERAPY IN CANINE NERVOUS SYSTEM DISEASES' to Stem Cell Research & Therapy.

The submission id is: SCRT-D-17-00418

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal website.

Your username is: biandriolo

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <http://s crt.edmgr.com/>

Best wishes,
Editorial Office

EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELLS THERAPY IN CANINE NERVOUS SYSTEM DISEASES

Bianca Andriolo Monteiro¹, Isadora Arruda¹, Jean Guilherme Fernandes Joaquim², Bruna Devita¹, Fabio Sossai Possebon², Nathália Genú Nakazato¹, Maíra Belli³, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga¹

1 Sao Paulo State University – Botucatu, College of Veterinay Medicine and Animal Science, Sao Paulo, Brazil, Departament of Animal Reproduction and Veterinary Radiology

2 Sao Paulo State University –Botucatu, College of Veterinay Medicine and Animal Science, Sao Paulo, Brazil, Departament of Veterinary Hygiene and Public Health

3 Sao Paulo State University –Botucatu, College of Veterinay Medicine and Animal Science, Sao Paulo, Brazil, Departament of Veterinary Surgery, Service of Acupuncture and Cronic Pain

ABSTRACT

Background: Spinal cord injury, intervertebral disc disease, and distemper are common disorders that affect dogs and are characterized by neurological signs, which are often difficult to treat. In this context, mesenchymal stem cells-based therapy seeks to minimize clinical signs and neurological sequelae as a consequence of the injuries, in order to improve patients' life quality. The aim of this study was to evaluate the results of treatment with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue in spinal cord injury, distemper and intervertebral disc disease injuries in dogs. **Methods:** Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue were used from a cell bank, which were immunophenotypically characterized by flow cytometry (CD34, MHC II, CD44, CD90, CD105) and differentiated into the three mesenchymal lineages, adipogenic, osteogenic and chondrogenic. Sixty-two animals were used, 14 of them with spinal cord injury, 18 with intervertebral disc disease and 30 with distemper sequelae, all submitted

to previous neurological examination followed by cell therapy. The comparison between grades before and after treatment with allogenic MSCs of adipose tissue for each type of lesion was performed using the Mann-Whitney test for repeated measures. The comparison of the medians for each type of lesion, and the comparison between the medians of the number of treatments in relation to each degree of improvement observed (0, 1 or 2) were performed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunns. **Results:** A difference was observed between the medians referring to the severity degree of the diseases treated. In the case of distemper sequelae, 43.3% (13/30) of the animals treated improved the neurological signs with a decrease in injury grade. In animals with spinal cord injury, a decrease in the injury degree was observed in 50% of the cases (7/14), and 66.7% of the animals (12/18) with intervertebral disc disease had also shown smaller injury degree. **Conclusions:** It was concluded that the MSCs applications in animals with neurological disorders of spinal cord injury, intervertebral disc disease and distemper sequelae decreased the injury degree.

Key words: dogs; cell therapy; spinal cord injury; intervertebral disc disease; distemper

BACKGROUND

Spinal cord injury (SCI), intervertebral disc disease, and distemper are disorders characterized by neurological signs, which are often difficult to recover. Cell therapy seeks to minimize neurological signs and sequelae acquired by diseases, with the aim of improving patients' life quality.

Intervertebral disc disease (IVDD) is common in dogs, especially those of middle-aged chondrodystrophic breeds. Clinical signs range from mild pain to paraplegia. Neurological dysfunction is classified in degrees from I to V, corresponding to the level of spinal cord damage [1]. Previous studies have indicated that dogs with Grades I to IV

have good improvement after surgical treatment, and dogs with Grade V without deep pain, and with spinal cord injury have shown improvement after surgical treatment. Approximately 60% of decompression surgery is successful, but there is little evidence of therapeutic success with medical treatment [1].

The current treatment for dogs with spinal cord injury (SCI) is focused on eliminating the source of the primary mechanical damage and consists of surgical decompression of the spinal cord. However, shortly after primary damage, a complex and dynamic cascade of cellular processes including inflammation, edema, ischemia, oxidative stress, excitotoxicity and microglial and astrocytic activation occur. This type of response is known as "secondary damage" and occurs from seconds to weeks after primary damage [2].

Canine distemper is a disease caused by an infection of single stranded RNA *Morbilivirus* belonging to the family *Paramixoviridae*. Infection with the canine distemper virus causes systemic disease in several species of carnivores and may involve the respiratory and gastrointestinal tract, as well as the central nervous system [3]; [4]; [5]; [6].

Because of their immunomodulatory ability and trophic activity, as well as their ability to regenerate damaged tissues, MSCs are an alternative for the treatment of various diseases. In addition, they represent a heterogenous and highly proliferative cell population, with characteristics of self-renewal and multiple in vitro differentiation capacity.

Adult stem cells-based therapy has recently been used as a therapeutic modality in SCI. The result of these studies indicated that MSCs produce several neurotrophic factors and are differentiated into several neural cells. In addition, these findings have demonstrated the improvement in motor function in animal models with SCI [1].

Despite the positive results obtained in experimental models using a variety of animal species and recent progress in cell transplantation, the development of powerful strategies to treat SCI remains a major clinical challenge [7].

The aim of this study was to evaluate the application effects of allogeneic mesenchymal stem cells derived from adipose tissue in nervous system disorders in dogs attended at the Acupuncture and Chronic Pain Service of Sao Paulo State University from January 2014 to April 2017.

METHODS

A cross-sectional study was performed with a total of 62 animals, among which there were 30 cases of distemper, 18 cases of IVDD and 14 cases of SCI. This way, the injury degree before and after the treatment and the number of treatments was evaluated. As inclusion criteria, animals with IVDD, SCI and distemper sequelae were used, which were submitted to at least four MSCs applications.

Each animal was evaluated at thirty days intervals after the first application, being evaluated at least four months after the first MSCs application. A sample of MSCs from bank cell was used over the thirty day period, in order to avoid using the same cell donor in the same animal.

All animals were submitted to cell therapy, with MSCs derived from adipose tissue, which were cultured, characterized and differentiated at the Advanced Reproduction Stem Cell Therapy Laboratory, situated at the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, also located at the Veterinary Medicine and Animal Science College, at Sao Paulo State University - Botucatu, Sao Paulo.

Cell culture

MSCs derived from adipose tissue from four female dogs were obtained from the bank cell of the Advanced Reproduction and Stem Cell Therapy Laboratory (LANCA).

The MSCs were obtained from four animals submitted to elective ovariohysterectomy surgery from the Surgical Center of the Department of Animal Reproduction Department. To assure the use of a safe source of MSCs, PCR tests for canine *Adenovirus* type I, *Erlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Leptospira spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Morbilivirus* were carried out in a private laboratory. All samples were obtained from healthy animals and were up to three years old.

After adipose tissue harvesting, it was mechanically separated and then subjected to enzymatic digestion using a 0.04% solution of collagenase Type 1 (Sigma, Merck, USA), after 30 minutes was filtered at 70 µm (BD, USA) filter and washed with culture medium, containing DMEM low-glucose / F12, (1/1), 20% fetal calf serum (FCS) 100 µg / ml streptomycin, 3 µg / ml amphotericin B (all from Gibco, Life Technologies, USA). The pellet cell was centrifuged at 340 XG twice and resuspended in culture medium.

For cell culture, the cells were plated in 25 cm² culture plates and grown in culture medium, culture conditions were incubated with 5% CO₂ at 37.5 ° C, and the culture medium was changed after 48 hours.

When the culture plate showed approximately 90% of confluency, the first passage of the MSCs was performed using Trypsin (Tryple Express®, Gibco, Life Techonologies, USA) at 37 ° for six minutes.

MSCs Cryopreservation

For cryopreservation, MSCs were used in the second passage (P2), the pellets were slowly resuspended with cryopreservation medium containing 90% of FCS, 10% of DMSO (Sigma), 100 IU / ml penicillin / 100 µg / ml streptomycin and 3 µg / ml amphotericin B. Subsequently, MSCs were distributed in cryotubes and stored in a freezing container (Sigma®, Nalgene, Mr Frosty) and kept in a -80° C freezer for 24 hours, and then stored in a liquid nitrogen canister until thawed. For each cryotube the 4×10^6 cells concentration was used.

Flow Cytometry

The MSCs lineage was confirmed by surface markers after cryopreservation in the third passage (P3) using a BD® LSR Fortessa (BD, USA) flow cytometer. The following markers were evaluated: CD44 (ABd Serotec®, Anti-Dog Rat: Alexa Fluor® 488-MCA1041A488) CD90 (eBioscience, anti-Canine: PE-Clone: YKIX337217), CD 105 (Biorbyt, anti Rabbit: FITC- Polyclonal-orb102264), CD34 (ABd Serotec®, Mouse anti-Canine: FITC-MCA2411F) and MHC II (ABd Serotec®, Rat anti-Dog: FITC-MCA1044F). Non-conjugated primary markers were IgG-FITC goat anti-mouse secondary antibody.

Negative control of cells was done with a tube containing cells without antibody, and in the case of non-conjugated antibody, a secondary antibody was used.

After one-hour-incubation period the cells were washed in two ml of HBSS, centrifuged at 940XG for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant was withdrawn until the tube mark and an additional 400ul of HBBS was added.

Osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs

After cryopreservation a MSCs aliquot in the third passage (P3) was digested with Trypsin and packed in 24 wells plates for osteogenic and adipogenic differentiation, using a concentration of 3×10^4 cells per well. For this, the STEMPRO adipogenic and osteogenic differentiation kit (Gibco, Life Technologies, USA) was used, and the medium was changed every 2 to 3 days. For the differentiation analysis, the histological stains used were: Alizarin red, showing deposition of the calcium matrix and Oil red, showing intracytoplasmatic presence of adipose droplets, evaluated by microscopy. For adipogenic differentiation the test lasted 14 days and for osteogenic differentiation 21 days.

Chondrogenic differentiation

After cryopreservation and culture (P3) MSCs were digested with Trypsin and pellet containing 1×10^6 MSCs was placed in a 15 ml Falcon tube (BD, Bioscience, USA) cultured with DMEM / F12 medium maintained in an incubator (Thermo Fisher), for 24 hours. After this period the culture medium was changed by chondrogenic differentiation medium, using the STEMPRO Kit (Gibco, Life Technologies, USA), which was changed every three days. For this, the MSCs were centrifuged at 340 XG for 10 minutes, maintained in an incubator for 21 days, with a semi-open lid at a temperature of 37.5°C at 5% of CO_2 .

After this period the pellet was fixed in 10% of formoldehyde for 2 minutes. It was processed by the paraffin inclusion technique. Alcian Blue, Hematoxylin-eosin and Toluidine Blue were used for staining.

Preparing MSCs for application

The MSCs at P3 were centrifuged at 340 XG for 10 minutes, the pellet resuspended with HBSS until completion of three washes. After counting the total number of cells, they were aspirated with a 30x8 mm needle in a 1 ml sterile syringe. The MSCs total concentration ranged from 5 to 10×10^6 cells, according to the number obtained during the culture.

Distemper

Cases of distemper were clinically diagnosed. The animals whose clinical signs were characterized by neurological sequelae resulting from this viral disease, with multifocal signs such as paresis, ataxia, vestibular and cerebellar signs, cranial nerve alterations, myoclonus and signs of seizures, were included.

Patients with neurological signs stabilization and blood count normalization were included at least one month before starting treatment with MSCs. To evaluate the patients and to verify if the treatment was successful, the neurological evaluation scale for distemper recommended by SANTOS (2013) was used, as shown in Table 1.

Table 1: Scale for neurological sequelae classification in distemper proposed by Santos (2013)

<i>Paralysis/Tetraparalysis</i>	<i>Classification</i>
Grade I	Functional deambulation
Grade II	Ataxic animal: walk with incoordination
Grade III	Paretic animal: stand up, but do not walk
Grade IV	Do not stand up or get up
Grade V	Without deep pain and with signs of Grade IV

SCI and IVDD

Dogs with SCI and IVDD were classified according to the degree injury proposed by [8] as shown in Table 2.

Table 2 – Graduation of spinal cord injuries used to determine appropriate treatment for patients with IVDD and SCI

<i>Grade</i>	<i>Clinical Signs</i>
I	Mild, moderate or severe low back pain without neurological deficits
II	Discrete incoordination, ability to support own weight, recurrent episodes of pain, proprioception deficit, normal or raised spinal reflexes
III	Intense incoordination, loss of ability to support own weight, lack of proprioception, normal or raised spinal reflexes
IV	Loss of motor function, proprioception absence, Normal or raised spinal reflexes, deep pain perception maintained
V	Grade IV signs added to loss of urinary control and deep pain perception

Statistical Analysis

The comparison among grades before and after treatment with allogenic adipose tissue MSCs for each type of injury was performed using the Mann-Whitney test for repeated measures. The "improvement" variable was obtained by subtracting the final grade of the initial grade. The comparison of medians of improvement for each type of injury, and the comparison among the medians of the number of treatments regarding to each degree of improvement observed (0, 1 or 2) were performed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunns. For all analyzes, statistical difference was considered when $p < 0.05$. All analyzes were performed using Graphpad Prism 5.0 software (GraphPad, 2007).

RESULTS

Immunophenotypic Characterization

Samples obtained from adipose tissue in elective ovariectomy surgeries were evaluated after cryopreservation at P3. Flow cytometry was performed for the following antibodies: CD 34, MHC II, CD 44, CD 90, CD 105. Non-expression was considered when results were $\leq 3\%$, as shown in Table 3 with the values described in percentage, followed by the mean and standard deviation of the surface markers expression, for the four samples of adipose tissue MSCs.

Table 3: Mean and standard deviation of immunophenotypically characterized MSCs by flow cytometry.

<i>Markers</i>	<i>CD 34</i>	<i>CD 44</i>	<i>CD 90</i>	<i>CD 105</i>	<i>MHC II</i>
Sample 1	4.7%	83.8%	89.3%	13%	8.8%
Sample 2	4.6%	99.8%	99.1%	17.3%	7.1%
Sample 3	5.9%	99.8%	97.7%	12.4%	6.5%
Sample 4	9.3%	96.7%	99.7%	1.6%	0.9%
Mean and Standard Deviation	6.12±2.19	95.02±7.62	96.45±4.83	11.07±6.68	5.82±3.42

Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation

All samples of adipose tissue showed morphological cellular changes and presence of calcium extracellular matrix in the osteogenic differentiation, intracytoplasmatic presence of adipose droplets in the adipogenic differentiation, and presence of glycosaminoglycan matrix in the chondrogenic differentiation, as shown in FIGURE 1- (A) Adipogenic control, (c) Adipogenic differentiation, observing

intracytoplasmatic lipid droplets, stained with Oil Red; D - Osteogenic differentiation, deposition of extracellular calcium, stained with Oil Red. (FIGURE 2: Chondrogenic differentiation of canine adipose tissue MSCs A- Hematoxylin & Eosin staining: Continuous arrow indicates presence of chondrocyte-like cells: dashed arrow indicates presence of differentiated proteoglycans matrix. B-Alcian Blue staining: continuous arrow shows presence of immature proteoglycans matrix and dashed arrow shows differentiated matrix of proteoglycans).

Clinical Utilization

The degree of severity of the animal's affections treated and the degree of improvement after the application of the MSCs is shown in Table 4 and Figure 3 (Distribution of the number of treatments with adipose tissue MSCs performed for each improvement degree, letters different from B indicate statistical difference, $p < 0.05$).

It can be observed that the injury damage in the SCI reduced from Grade V to Grade IV, with some animals reaching grade III. In the IVDD case, treatment with MSCs also resulted in a significant decrease since, although the median injury degree did not change, a greater number of animals reached grade III and II.

In this group, the low variability between treated animals influenced the results obtained.

Table 4: Assessment of injury degree of neurological disorders before and after treatment with MSCs.

Injury	Before	After	P Value
Distemper	V(IV- V)	IV (III- V)	0,01
IVDD	IV (III- V)	IV (II- V)	0,001
SCI	V (IV- V)	IV (III -V)	0,01

Median (min-max) of lesion grades before and after treatment with allogeneic MSCs from adipose tissue.

P <0.05 indicates that there was statistical difference.

According to the tables below it is possible to evaluate the animal's profile, as to the degree of spinal cord injury, for SCI and IVDD, before and after treatment with MSCs, as well as the percentage of improvement after treatment.

Out of the 14 animals examined with SCI, 57.14% presented Grade V injury and 42.8% Grade IV. After treatment of the animals evaluated as grade V, 37.5% (n = 3) remained in Grade V, 50% (n = 4) reduced to Grade IV and 12.5% (n = 1) were evaluated as Grade III. Out of the animals evaluated as Grade IV 66.6% remained in the same Grade (n = 4) and 33.3% reduced to Grade III (n = 2).

Table 5 - Comparison of the injury degree before and after treatment with MSCs in cases of SCI (%)

		<i>Grade injury before treatment</i>		<i>Grade injury after treatment</i>	
<i>SCI</i> <i>N = 14</i>	Grade V	57.2%	Grade V	37.5%	
	Grade V	57.2%	Grade IV	50%	
	Grade V	57.2%	Grade III	12.5%	
	Grade IV	42.8%	Grade IV	66.6%	
	Grade IV	42.8%	Grade III	33.3%	

In the injuries caused by IVDD the results were similar (Table 6). Among the total of 18 animals examined, 11.1% had grade III injury (n = 2) and after treatment with MSCs decreased to Grade II. Furthermore, 44.4% of the animals were classified as Grade IV (n = 8) and 44.4% as Grade V (n = 8). After treatment 25% (n = 2) of Grade V animals remained Grade V without clinical improvement, 62.5% (n = 5) reduced to Grade IV and 12.5% (n = 1) reached Grade III. From Grade IV animals, 50% reached Grade III (n = 4) and 50% remained Grade IV (n = 4).

Table 6 - Comparison of the injury degree before and after treatment with MSCs in cases of IVDD (%)

		<i>Grade injury before treatment</i>		<i>Grade injury after treatment</i>	
IVDD N=18	Grade V	44.4%	Grade IV	62.5%	
	Grade V	44.4%	Grade V	25%	
	Grade V	44.4%	Grade III	12.5%	
	Grade IV	44.4%	Grade IV	50%	
		44,4%	Grade III	50%	
	Grade III	5,5%	Grade II	100%	

Thirty cases of distemper were evaluated, 28 animals (93.3%) with Grade V and 2 (6.7%) with Grade IV of paralysis and tetraparalysis (Table 7).

Table 7 - Comparison of injury degree before and after treatment with MSCs in distemper cases (%)

<i>Grade injury before Treatment</i>	<i>Grade injury after Treatment</i>
Grade V	Grade V 57.14% (n=16)
Grade V	Grade IV 25% (n = 7)
Grade V	Grade III 17.85% (n = 5)
Grade IV	Grade IV 50% (n = 1)
Grade IV	Grade III 50% (n = 1)

DISCUSSION

MSCs obtained from adipose tissue can be considered an abundant source of stem cells, with high regenerative capacity and low immunogenicity. In the present study, MSCs obtained from canine adipose tissue presented characteristics similar to the minimum criteria required by the International Society of Cell Therapy, such as plastic

adherence, mesenchymal stem cells surface markers expression and non-expression of MHC II, as well as differentiation in the three mesenchymal lineages [9]; [10].

Thus, these cells were suitable for bank storage, allowing availability and agility at the time of cells application. The bank formation also allowed registration and identification of the therapeutic donors profile, besides avoiding the application of the same donor cells in the same animal at the time of the treatment.

For many years it was believed that the CNS would not be able to regenerate. This theory can now be questioned by the regenerative therapies development. Despite this, a major challenge for human and veterinary medicines is the treatment of nervous system injuries, where many cases are discredited by doctors and veterinarians. In several situations, there is no truly effective and promising therapy in the treatment of neurological injuries, leading many clinicians to opt for animals euthanasia. In this sense, several studies prove the efficacy of SCI treatment with stem cells [11]; [12]; [13]; [14]; [7]; [15] which allows emphasizing the importance of the therapy, without excluding the need for further research in the area.

In this study, MSCs were applied via epidural, in the lumbosacral space. This pathway was effective and safe and did not cause adverse effects in the animals submitted to the therapeutic treatment. Similar results were obtained by [11] who demonstrated that the intrathecal application of MSCs for SCI treatment in dogs was effective, avoiding the dispersion of cells to undesired areas.

In the present study, 30 cases of animals with distemper-related sequelae were treated and the results demonstrated that the cellular therapy allowed the injury grade decrease in 43.3% of treated animals. However, many animals remained without deep pain and with paralysis and tetraparalysis, still classified as Grade V. According to [17] canine distemper is an infectious disease that affects domestic species and wild

carnivores. The high mortality rate of canine distemper virus infected animals treated with currently available therapies, has stimulated the search for new treatments. In this sense, according to the results of this study, MSC-based therapy may be a promising therapeutic option for many infectious diseases such as distemper.

In the present study 18 dogs were treated with IVDD, most of which were classified as Grade IV or V by the classification proposed by [8]. Again the injury treated presented a high damage degree with substantial impairment of the animals' quality of life. Under these conditions, the results of the present study showed that the MSC-based therapy can be considered a therapeutic alternative, since the treatment decreased to a lower injury degree.

IVDD is considered a condition with progressive degeneration. Thus the search for an effective therapy that prevents disc degeneration has been considered a logical attempt to reduce the symptoms of low back pain [18]. In this sense, the MSC-based therapy has led to a decrease in the progression of the inflammatory process.

Traumatic injuries involving the spinal cord are common in veterinary medicine leading to devastating sequelae, such as partial or complete loss of motor, sensitive and visceral functions [19]. Treatment remains a challenge for both human and veterinary medicine and the prognosis is poor, for functional recovery after fracture or vertebral luxation with loss of deep pain perception [20].

In the present study, the cases of spinal cord injury showed a decrease in injury degrees after treatment with cell therapy. Despite this, the restriction of available therapeutic methods for the injury treatment makes cell therapy an option that should be examined in greater detail. Previous studies have shown that both autologous and allogeneic MSC transplantation have been effective in improving motor injuries caused by SCI in Beagle dogs [11].

Although there is no direct evidence, the authors of the present study assume that transplanted cells improved nerve function through neuronal repair. Many mechanisms involved in stem cell biogenesis are not yet fully understood, despite the scientific evidence on the therapeutic use of these cells. According to [16] the proportion of transplanted cells, which are incorporated into the damaged tissue and that differentiate, does not justify the functional improvement observed.

Thus, tissue regeneration after the MSC application can be explained by the release of cytokines and trophic factors at the injury site. Thus, the therapeutic potential as well as the regenerative capacity of the MSCs can be explained by the ability to self-regulate inflammation cascade factors without inducing an immune response in the host [1].

Moreover, success in cell therapy can be explained in part by the release of growth factors and cytokines in the injury region that would lead to the prevention of apoptosis; recruitment of adjacent cells from the tissue itself and angiogenesis [16].

As to the nervous system, after transplantation, the MSCs interact with the injured tissue and can control the gene expression of genes related to inflammation and apoptosis, as well as stimulating the neuroprotective effect of gene expression [21]. In addition, these cells produce an extracellular matrix and neurotrophic factors such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) that modify the injury microenvironment and accelerate the repair of neural tissue [22]; [23].

CONCLUSIONS

Canine adipose tissue MSCs were easily isolated, cultured and properly characterized resulting in the establishment of allogeneic cell bank developed for cell therapy. The epidural via may be considered safe since no adverse reactions have occurred. MSCs

applications in animals with nervous system diseases were able to reduce the animals grade injury with spinal cord injury, intervertebral disc disease and distemper, thus representing another therapeutic opportunity to be used.

LIST OF ABBREVIATIONS

BDNF= Brain-derived neurotrophic factor

CD= Cluster differentiation

CNS= Central nervous system

DMEM= Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO= Dimethyl Sulfoxide

FCS= Fetal calf serum

FITC= Fluorescein isothiocyanate

HBSS= Hank's Balanced Salted Solution

IgG= Immunoglobulin G

IVDD= Intervertebral disc disease

MHC= Major histocompatibility complex

MSCs= Mesenchymal stem cells

NGF= Nerve growth factor

PCR= Polymerase Chain Reaction

RNA= Ribonucleic Acid

SCI= Spinal cord injury

VEGF= Vascular endothelial growth factor

DECLARATIONS

Ethical approval and consent to participate

This study was approved by Sao Paulo State University Ethics Committee from September 2016, protocol number 153/16.

Consent to participate

Not applicable

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Funding

The authors declare that they have no funding resources

Author's Contributions

BA is the corresponding author, she collected the data, cultured the mesenchymal stem cells and wrote the paper. IA, BD, ML and NG helped with the stem cells culture, characterization and differentiation. FS analyzed the data and performed the statistical analyses. MB helped with the stem cells clinical applications. JG was responsible for the stem cells applications, neurological exams and for writing the paper. FC is the supervisor responsible for the research and also wrote and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors acknowledge Dr Danielle Jaqueta Barberini for supporting the stem cells clinical applications and the neurological exams.

REFERENCES

- [1] KIM, Y.; LEE, S.H.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. *Jou Vet Sci*, 2016; doi:10.4142/jvs.2016.17.1.123
- [2] WANG-LEANDRO, A.; SIEDENBURG, J.S.; HOBERT, M.K.; DZIALLAS, P.; ROHN, K.; V.M. STEIN, V.M.; TIPOLD, A. Comparison of Preoperative Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Clinical Assessment of Deep Pain Perception as Prognostic Tools for Early Recovery of Motor Function in Paraplegic Dogs with Intervertebral Disk Herniations. *Jou Vet Int Med*, 2017; doi: 10.11111/jvim.14715.
- [3] SUMMERS, B.A.; GREISEN, H.A.; APPEL, M.J.G. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. *Jou Comp Path*, 1984;94:65-75.
- [4] KRAKOWKA, S.; CORK, L.C.; WINKELSTEIN; J.A.; AXTHELMS. M.K. Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of

the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Vet Immun Immunop*, 1987;17: 471-482.

[5] MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper virus. *Vet Clin Sma Ani*, 2008;doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.007.

[6] SPITZBARTH, W. BAUMGÄRTNER, A. BEINEKE. The role of pro- and anti inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012;doi:10.1016/j.vetimm.2012.04.005.

[7] PENHA, E.M.; MEIRA, C.S.; GUIMARÃES, E.G.; MENDONÇA, M.V.P.; GRAVELY, F.A.; PINHEIRO, C.M.B.; PINHEIRO, T.M.B.; BARROUIN-MELO, S.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B.P. Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. *Stem Cell Inter*, 2014;doi:10.1155/2014/437521.

[8] JOAQUIM, J.G.F.; LUNA, S.P.L.; BRONDANI, J.T.; TORELLI, S.R.; RAHAL, C.S.; FREITAS, F.P. Comparison of decompressive surgery, electroacupuncture, and decompressive surgery followed by electroacupuncture for the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe neurologic deficits. *Jou Amer Vet Med Assoc*, 2010;doi:10.2460/javma.236.11.1225.

[9] DOMINICI M., LE BLANC K., MUELLER I., SLAPER-CORTENBACH L, MARINI F.C., KRAUSE D.S., DEANS R.J., KEATING A., PORKCOP D.J. & HOWITZ E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stroma cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cyt*, 2006; doi:10.1080/14653240600855905.

[10] MARX, C.; SILVEIRA, M.D.; ISABEL SELBACH, I.; SILVA, A.S. BRAGA, L.M.G.M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N.B. Acupoint Injection of Autologous Stromal Vascular Fraction and Allogeneic Adipose-Derived Stem Cells to Treat Hip Dysplasia in Dogs, *Stem Cell Inter*, 2014; doi 10.1155/2014/391274.

[11] JUNG, D.,I.; HA, J.; KANG, B.T.; KIM, J.W.; QUAN, F.S.; LEE, J.H.; WOO, E.J.; PARK, H.M. A Comparison Of Autologous And Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation In Canine Spinal Cord Injury. *J Neurol Sci*, 2009; doi 10.1016/j.jns.2009.05.027.

[12] SERIGANO, K.; SAKAI, D.; HIYAMA, A.; TAMURA,F.; MASAHIRO TANAKA, M.; MOCHIDA, J. Effect of Cell Number on Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Canine Disc Degeneration Model. *J Orthop Res*, 2010; doi10.1002/jor.21147.

[13] RYU, H.H.; KANG, B.J.; PARK, S.S.; KIM, Y.S.; SUNG, G.J.; WOO, H.M.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs. *J Vet Med Sci*, 2012; doi10.1292/jvms.12-0065.

- [14] ZAIM M, KARAMAN S, CETIN G, ISIK S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol*, 2012; doi: 10.1007/s00277-012-1438-x.
- [15] SARMENTO, C.A.P.; RODRIGUES,M.N.; BOCABELLO,R.Z.; ANDREA MARIA MESS, A.M. MARIA MIGLINO, M.A. Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. *Reg Med Res*, 2014; doi: 10.1186/2050-490-X-2-9.
- [16] SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neuro*. 2005; 16: 13-19.
- [17] PINHEIRO, A.O.; CARDOSO, M.T.; VIDANE, A.S.; CASALS, J.B.; PASSARELLI, D.; ALENCAR, A.L.F.; SOUSA, R.L.M.; FANTINATO-NETO, P.; OLIVEIRA, V.C.; LARA, V.M. ;AMBRÓSIO, C.E. Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute phase of canine distemper disease. *Gen Mol Res*, 2016;doi:10.4238/gmr.15028310.
- [18] HOHAUS, C.; GANEY, T.M.; MEISEL, H.J. Cell transplantation in spine disc degeneration disease. *Eur Spi Jou*. 2008; doi:10.1007/s00586-008-00750-6.
- [19] BERGMAN R. 2000. Spinal cord injury. *Vet. Med*. 95:845.
- [20] GRASMUECK S. & STEFFEN F. 2004. Survival rates and outcomes in cats with thoracic and lumbar spinal cord injuries due to external trauma. *J. Small Anim. Pract*. 45:284-288.
- [21] OLIVERI, R.S., BELLO, S., BIERING-SORENSEN, F., 2014. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol. Dis*. 62, 338–353.
- [22] DE FEO, D., MERLINI, A., LATERZA, C., MARTINO, G., 2012. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. *Curr. Opin. Neurol*. 25 (3), 322–333.
- [23] DALOUS, J., LARGHERO, J., BAUD, O., 2012. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives. *Pediatr. Res*. 71 (2–4), 482–490.

Figure 1

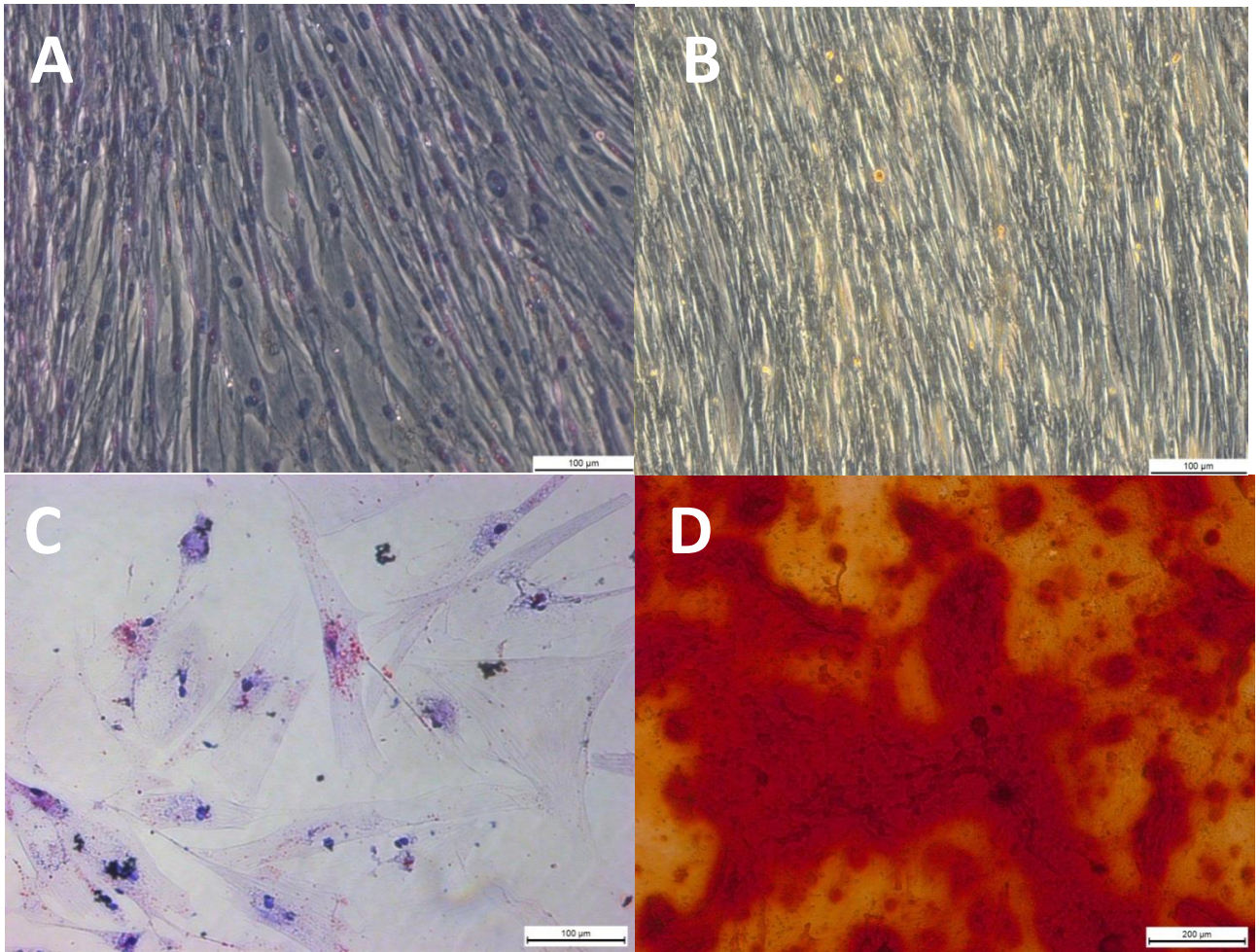


Figure 2

