

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – CAMPUS
BOTUCATU

**EFEITOS DA TERAPIA COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
MULTIPOTENTES EM CÃES COM ENCEFALOMIELITE PELO VÍRUS DA
CINMOSE**

SUELEN BERGER BALDOTTO

Botucatu/SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – CAMPUS
BOTUCATU

**EFEITOS DA TERAPIA COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
MULTIPOTENTES EM CÃES COM ENCEFALOMIELE PELO VÍRUS DA
CINOMOSE**

SUELEN BERGER BALDOTTO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Botucatu/SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Baldotto, Suelen Berger.

Efeitos da terapia com células estromais mesenquimais multipotentes em cães com encefalomielite pelo vírus da cinomose / Suelen Berger Baldotto. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501062

1. Morbillivírus. 2. Células-tronco. 3. Desmielinização. 4. Sistema nervoso central. 5. Cães - Doenças - Tratamento. 6. Terapia celular. 7. Cinomose.

Palavras-chave: Morbillivirus; células-tronco; desmielinização; sistema nervoso central; tratamento .

Nome do autor: Suelen Berger Baldotto

Título: EFEITOS DA TERAPIA COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
MULTIPOTENTES EM CÃES COM ENCEFALOMIELEITE PELO VÍRUS DA
CINOMOSE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Ana Liz Garcia Alves
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Jane Megid
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso Silva
Membro
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal
FMVA – UNESP - Araçatuba

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrosio
Membro
Departamento de Ciências Básicas
FZEA – USP - Pirassununga

Data da Defesa: 21 de fevereiro de 2019.

Dedico,

Primeiramente a Deus, por abençoar-me nesta trajetória na vida acadêmica,
dando força a cada etapa que cumpri.

Aos meus pais, Ilda e Pedro, que são o meu alicerce e apoio incondicional.

Ao meu irmão Henrique, pelo companheirismo, carinho e por fazer parte da
minha história.

“Se alguém te oferecer uma oportunidade incrível, mas você não tem certeza de que consegue fazer, diga sim – depois aprenda como fazer”.

- *Richard Branson*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu luz e força, que sempre se manifesta em minha vida de maneira maravilhosa e me permitiu ter experiências tão ricas como as que concluo com este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pela oportunidade, disponibilidade, conhecimentos e ensinamentos transmitidos; pelo incentivo e pela paciência durante esse período de Doutorado. O meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim Alvarenga, por toda a disposição, atenção e colaboração.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP que proporcionou a obtenção deste título.

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

Ao Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) e toda equipe, pelo aprendizado e disponibilização do banco de células possibilitando a realização do experimento.

Aos proprietários e residentes do Hospital Veterinário da Unesp de Botucatu, pela ajuda e pela gentileza de ceder os animais para a pesquisa. Em especial, Ana e Matilde da AAIPA de Itapeva- SP, pelo carinho e disposição com que cuidam dos animais.

Aos técnicos: Vanessa Cristina Pelícia, Clovis Reinaldo da Silva Fonseca e Wanderson Sirley Teixeira do Laboratório de Biologia Molecular da FMVZ, pela gentileza e carinho durante todo o percurso para a realização do trabalho.

A todos os professores do Doutorado, em especial à Profa. Dra. Jane Megid, Profa. Dra. Regina Kiomo Takahira e Profa. Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado, pela colaboração na realização dos exames laboratoriais.

Aos membros da banca examinadora da qualificação, professoras Doutoras Juliany Gomes Quitzan e Regina Kiomo Takahira por disponibilizarem seu tempo para correção, avaliação e diretrizes para o aprimoramento de nossa pesquisa.

Aos professores Doutores, Ana Liz Garcia Alves, Jane Megid, Tereza Cristina Cardoso Silva e Carlos Eduardo Ambrosio por aceitarem o convite para

serem membros da banca examinadora e pelas valiosas sugestões que serão a mim orientadas para realização final do presente estudo.

Aos colegas Alice, Maria Laura, Felipe, Mariana, Tábata e Daniele pela ajuda e colaboração durante os experimentos e formatação. Minha gratidão.

Aos amigos Giovana e Diego pela prontidão e ajuda em todas as etapas desta pesquisa e suas efetivas sugestões para a realização deste trabalho. Minha profunda gratidão. Obrigada pelo carinho e dedicação. Sem a ajuda de vocês este trabalho seria mais difícil.

Ao meu noivo, Pablo C. Marchesin, pela paciência e por me proporcionar tantos momentos agradáveis e felizes.

Aos meus pais, Ilda e Pedro, e ao meu irmão Henrique, pelo amor, apoio, incentivo e dedicação que sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Obrigada por muitas vezes abdicarem de tantas coisas, para me ajudar financeiramente em todas as etapas da realização desse sonho. Esse título é nosso! Essa conquista é nossa!

A minha família de coração, família Marchesin, não se trata de serem sangue do mesmo sangue ou de partilharem, em algum momento, a mesma casa. Fatores como esses não garantem carinho e estima por alguém. O motivo desse amor tão genuíno é a gratidão que cada um sente. É saber que em diversas ocasiões eles estiveram por perto, dando força, conselhos. Aqui deixo minha pequena homenagem e agradecimento, por todo carinho, cuidado e apoio incondicionais que sempre me disponibilizaram. Muito obrigada!

Aos meus amigos de Doutorado, Hudson, Luana, Marcelo, Ana Paula, Joshua, Marília, Campo, pelo carinho, conversas e risadas. Guardarei vocês no lado esquerdo do peito.

Ao meu amigo professor Antonio Fernando Castilho Gonçalves, por seu carinho e preocupação, por seu otimismo, força e boas energias. Lembro muito da sua preocupação comigo durante minhas “andanças na estrada”.

À professora Diretora da Sociedade Cultural e Educacional de Itapeva-FAIT, Dra Simone da Silva Gomes Cardoso, por sua ajuda e apoio que foram muito importantes para mim. Com carinho e de coração eu agradeço. Esse gesto jamais será esquecido. Muito Obrigada.

À professora Diretora do Hospital Veterinário FAIT Dra Sandra Regina Brunelli, meu respeito e consideração. Pela oportunidade e cooperação. Por conduzir nossa equipe de forma tão amável, gentil e sensata.

À minha aluna Mariluci, pela dedicação, interesse, pelo carinho, e por muito me auxiliar.

Aos meus amigos-irmãos: Fausto, Munize, Paula, Juliana, Josué e Erika pela companhia, pelo incentivo, pela amizade, por ajudas efetivas no trabalho de doutorado, por todos os momentos bons passados na nossa casa em Itapeva e em Paraguaçu Paulista. Amo vocês!!!!

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da FMVZ, em especial, Haroldo e Heraldo por toda a ajuda e gentileza durante o desenvolvimento da pesquisa.

E aqueles que sem querer eu esqueci,

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Informação específica dos <i>primers</i> utilizados para amplificação em qPCR.....	53
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resultado da análise de LCR de cada animal. Valores obtidos da análise de LCR, no momento M1 (antes do transplante) e no momento M2 (após o transplante), de quantidade de células expressas em células por microlitro (cél/ μ L), valores de proteína expressas em miligramas por decilitros (mg/dL) e em relação a presença ou ausência de pleiocitose e a classificação.....

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Modelo esquemático da estrutura do vírus da cinomose canina, demonstrando as seis proteínas estruturais (N, P, M, F, H e L) codificadas pelos seis genes que compõem o RNA viral envoltas pelo envelope lipoprotéico (E).....	5
FIGURA 2 – Momentos experimentais: Células estromais mesenquimais (MSCs); Transplante de células mesenquimais via (MSCs); Avaliação clínica e neurológica; Análise de hemograma; Análise de bioquímica sérica; Colheita e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR); Imagens de Ressonância Magnética (RM); Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).....	46
FIGURA 3 – Células estromais mesenquimais de tecido adiposo prontas para passagem, confluência 90%.....	48
FIGURA 4 – Escala de neurodeficiência.....	52
FIGURA 5 – Punção da cisterna magna para obtenção de amostras do LCR.....	55
FIGURA 6 – Punção da cisterna magna a aplicação lenta de 10×10^6 células diluídas em 0,5 mL de solução fosfato salino (PBS) por via intratecal.....	55
FIGURA 7 – Avaliação clínica. (A) Coxins plantares apresentando hiperqueratose antes da aplicação das MSCs. (B) Coxins palmares apresentando hiperqueratose antes da aplicação das MSCs. (C) Coxins plantares apresentando melhora visível do quadro de hiperqueratose 30 dias após a aplicação das MSCs. (D) Coxins palmares apresentando melhora visível do quadro de hiperqueratose 30 dias após a aplicação das MSCs.....	56
FIGURA 8 – Avaliação clínica. (A) Olho esquerdo com secreção mucoide antes da aplicação das MSCs. (B) Olho esquerdo apresentando melhora visível da secreção ocular 30 dias após a aplicação das MSCs.....	57
FIGURA 9 – Pontuação dos animais na Escala de Neurodeficiência no momento M0 (antes do transplante MSCs; barras pretas) e no momento M2 (30 dias após o transplante MSCs; barras brancas). Os números acima das barras representam a pontuação exata de cada animal no experimento.....	57
FIGURA 10 – Ressonância magnética do encéfalo antes do transplante intratecal de MSC do paciente 1. (A) tempo ponderado em T1; (B) tempo ponderado em T2; (C) FLAIR. Setas vermelhas indicam lesão no córtex occipital; setas azuis indicam lesão no cerebelo.....	65

- FIGURA 11** – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna tóracolombar do paciente 2, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Áreas de hiposinal intramedular em M1 e M2 (setas) (A, D). Áreas de hipersinal intramedular em M1 e M2 (setas) (B, C, E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2; C e F: sequências em Fast Flair..... 67
- FIGURA 12** – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 3, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no lobo temporal esquerdo em M1 (setas) (figuras B, C); diminuição do hipersinal em M2 (setas) (figura E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair..... 68
- FIGURA 13** – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 3, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Aumento do hipersinal, associado à atrofia cerebelar em M2 (seta) (B). Figuras A e B: sequências ponderadas em T2..... 69
- FIGURA 14** – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 4, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no córtex occipital em M1 (seta) (B, C); discreta diminuição do hipersinal do córtex occipital em M2 (seta) (E). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair..... 70
- FIGURA 15** – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 4, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no córtex occipital e no cerebelo em M1 (seta) (figura A); diminuição do hipersinal do córtex occipital e no cerebelo em M2 (seta) (figura B). Figuras A e B: sequências com tempo ponderado em T2..... 71
- FIGURA 16** – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna cervical do cão 5, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal intramedular em M1 (seta) (figura A); ausência do hipersinal em M2 (seta) (figura D). Hipersinal no canal central medular em M1 (seta) (figura B); diminuição do hipersinal no canal central medular em M2 (seta) (figura E). Hipersinal intramedular em M1 (seta) (figura C); ausência do hipersinal em M2 (seta) (figura F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2; C e F: sequências em Fast Flair..... 72

- FIGURA 17** – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna toraco-lombar do cão 6, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Não foram observadas alterações na medula espinhal toraco-lombar. Imagens ponderadas em T2 (A, C); imagens ponderadas em FLAIR (B, D)..... 73
- FIGURA 18** – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 7, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal cerebelar em M0 (seta) (B, C); diminuição do hipersinal em M2 (seta) (E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair..... 74
- FIGURA 19** – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 7, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal cerebelar em M0 (seta) (B); ausência do hipersinal em M2 (seta) (D). Figuras A e C: sequências com tempo ponderado em T1; B e D: sequências com tempo ponderado em T2..... 75
- FIGURA 20** – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna cervical do cão 8, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Áreas de hipersinal intramedular em M1 (setas) (A, B, C e D); diminuição do hipersinal intramedular em M2 (setas) (E, F, G e H). Figuras A e E: sequência ponderada em T1; B e F: sequência ponderada em T2; C e G: sequência Gradient Echo; D e H: sequência STIR..... 76
- FIGURA 21** – Imagens transversais e sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 9, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Permanência de hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M1 (setas) e M2 (A, D) - imagens ponderadas em T2; discreta diminuição do hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M2 (setas) (B, E) - imagens ponderadas em FLAIR. Diminuição do hipersinal no cortex frontal em M2 (setas) (C, F) - imagens sagitais ponderadas em T2..... 77
- FIGURA 22** – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 10, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no cerebelo em M2 (setas) (C, D). Figuras A e C: sequências ponderadas em T2; B e D: sequências Fast Flair..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS

AST: aspartato aminotransferase;
ALT: alanina aminotransferase;
CD: *cluster designation*;
CeMV: morbilivirus dos cetáceos;
Complexo RNP: complexo ribonucleoprotéico;
CT: células-tronco
CTA: células-tronco adultas
CTH: células-tronco hematopoiéticas
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium;
DMSO: Dimetilsulfóxido;
ELISA: Ensaio imunoenzimático;
EUA: Estados Unidos da América;
FA: fosfatase alcalina;
FeMV: morbilivírus dos felinos;
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia;
GGT: gama glutamil transferase;
HA: hemaglutinina;
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution;
IFD: Imunofluorescência direta;
IFI: Imunofluorescência indireta;
ISH: Hibridização *in situ*;
LANÇA: Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia de Células-Tronco;
LCR: Líquido cefalorraquidiano;
M0: momento 0;
M1: momento 1;
M2: momento 2
MeV: vírus do sarampo;
MHCI: complexo de histocompatibilidade de classe I;
mRNA: RNA mensageiro;
MSCs: células estromais mesenquimais multipotentes;

MSCs -TA: MSCs do tecido adiposo;
ASCs: Células estromais mesenquimais de tecido adiposo;
IT: intratecal;
NaCl: cloreto de sódio;
NP: nucleoproteína;
PBS: solução fosfato salino;
PCR: Reação em cadeia pela polimerase;
PDV: vírus da cinomose dos focídeos;
PPRV: vírus da peste dos pequenos ruminantes;
qPCR: Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativo;
RFP: reflexos fotopupilares;
RM: ressonância magnética;
RNA: ácido ribonucleico
RPV: vírus da peste bovina;
RT-PCR: reação em cadeia pela polimerase via transcriptase reversa;
SFB: soro fetal bovino;
SITC: Sociedade Internacional de Terapia Celular;
SNC: sistema nervoso central;
TC: tomografia computadorizada;
TLC: Teste Lacrimal de Schirmer;
Unesp: Universidade Estadual Paulista;
VCC: vírus da cinomose canina; (Morbillivírus canino)
CDV (canine distemper Vírus)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Cinomose.....	4
2.2 Etiologia.....	4
2.3 Epidemiologia.....	9
2.4 Patogenia.....	11
2.5 Imunopatogênese.....	13
2.6 Neuropatogenia e desmielinização.....	14
2.7 Sinais clínicos.....	18
2.8 Sinais do sistema nervoso.....	21
2.9 Diagnóstico.....	25
2.9.1 Diagnóstico clínico.....	26
2.9.2 Diagnóstico laboratorial.....	26
2.9.2.1 Hematologia.....	26
2.9.2.2 Bioquímica sérica.....	27
2.9.2.3 Pesquisa de inclusão viral.....	27
2.9.2.4 Isolamento viral.....	28
2.9.2.5 Análise do líquido cefalorraquidiano.....	28
2.9.2.6 Técnicas sorológicas.....	29
2.9.2.7 Diagnóstico molecular.....	30
2.9.2.7.1 Hibridização in situ (ISH).....	30
2.9.2.7.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	30
2.9.2.8 Diagnóstico histopatológico.....	31
2.9.2.9 Diagnóstico por imagem.....	32
2.9.2.9.1 Ressonância magnética.....	32
2.9.3 Tratamento.....	32
2.9.4 Profilaxia.....	34
2.9.4.1 Terapia celular.....	35
2.9.4.2 Tratamento de lesões no sistema nervoso com MSCs.....	41

3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Delineamento experimental.....	45
4.1.1 Seleção dos animais.....	45
4.1.2 Momentos experimentais.....	45
4.2 Cultivo e preparação das MSCs.....	46
4.2.1 Isolamento das MSCs derivadas do tecido adiposo.....	46
4.2.2 Cultivo das MSCs.....	47
4.2.3 Caracterização das células.....	48
4.2.4 Diferenciação <i>in vitro</i>	49
4.2.5 Viabilidade celular.....	50
4.2.6 Preparo de MSCs para o transplante.....	50
4.3 Avaliação clínica geral.....	50
4.4 Exame neurológico.....	51
4.5 PCR.....	53
4.6 Hemograma e bioquímica sérica.....	53
4.7 Ressonância magnética (RM).....	54
4.8 Colheita e análise do LCR.....	54
4.9 Transplantes de MSCs.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Avaliação clínica geral.....	56
5.2 Exame neurológico.....	57
5.3 Hemograma e bioquímica sérica.....	64
5.4 Ressonância magnética.....	64
5.5 Análise do LCR.....	78
6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÕES.....	88
8 REFERÊNCIAS.....	89
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	116
APÊNDICES	163

BALDOTTO, S. B. **Efeitos da terapia com células estromais mesenquimais multipotentes em cães com encefalomielite pelo vírus da cinomose.** Botucatu, 2019. 167p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

As células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) são células adultas que residem em diversos tecidos do corpo e possuem capacidade proliferativa, imunomoduladora, anti-inflamatória e neuroregenerativa representado pela secreção de citocinas e fatores neurotróficos. O tecido neural possui baixa capacidade regenerativa após lesões traumáticas, inflamatórias e degenerativas, sendo alvo de estudos com uso de MSCs devido ao seu potencial terapêutico. A cinomose é uma doença viral infectocontagiosa comum em cães que acomete o sistema nervoso central refletindo em sinais clínicos neurológicos causadas por lesões desmielinizantes, resultantes da replicação viral no interior dos oligodendrócitos e de células da microglia, pela regulação do complexo de histocompatibilidade de classe I e infiltração de células inflamatórias. Nesse sentido, com o intuito de reduzir os sinais clínicos neurológicos, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia terapêutica das MSCs derivadas do tecido adiposo canino pela via intratecal (IT) em cães com encefalomielite viral por cinomose. Foram utilizados 10 cães, sem raça definida, apresentando sinais neurológicos de início agudo e progressivo com diagnóstico positivo pelo teste de Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativo (qPCR). No momento 0 (M0), foi realizado exame neurológico, teste qPCR, hemograma e bioquímica sérica. No momento 1 (M1), os animais foram submetidos à anestesia para exame de ressonância magnética (RM), seguido da colheita do líquido cefalorraquiano (LCR), e então transplante de 10×10^6 MSCs pela via IT. Trinta dias após o transplante no momento 2 (M2), foram realizados o exame clínico, neurológico, hemograma, bioquímico, RM e análise do LCR. De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais descritas conclui-se que a via intratecal para o transplante das MSCs alogênicas em cães é viável e segura, pois demonstrou ser minimamente invasiva, rápida e permite transplantar um grande número de células no espaço subaracnóideo. As MSCs alogênicas por via intratecal demonstraram ser efetivas na melhora dos sinais clínicos.

Palavras-chave: células-tronco, *Morbillivirus*, sistema nervoso central, tratamento, sequelas

BALDOTTO, S. B. **Effects of multipotent mesenchymal stromal cells therapy in dogs with distemper virus encephalomyelitis**. Botucatu, 2019. 167p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are adult cells that reside in various tissues of the body and have proliferative, immunomodulatory, anti-inflammatory and neuroregenerative capacity represented by secretion of cytokines and neurotrophic factors. Neural tissue has low regenerative capacity after traumatic lesions, inflammatory and degenerative, being the target of studies with the use of MSCs due to its therapeutic potential. Distemper is a common viral disease, infectious and contagious of dogs that affects the central nervous system reflecting on clinical neurological signs caused by demyelinating lesions, resulting from viral replication within the oligodendrocytes and microglial cells, by regulation of the class I histocompatibility complex and infiltration of inflammatory cells. Thus, in order to reduce neurological clinical signs, the objective of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of MSCs derived from canine adipose tissue by the intrathecal route (IT) in dogs with viral encephalomyelitis due to distemper. Ten dogs were used, mixed breed, presenting neurological signs of acute and progressive onset with positive diagnosis by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). At time 0 (M0), neurological examination, qPCR test, blood count and serum biochemistry were performed. At the moment 1 (M1), the animals were submitted to anesthesia for magnetic resonance imaging (MRI), followed by cerebrospinal fluid (CSF) harvest, and then transplantation of 10×10^6 MSCs via the IT. Thirty days after transplantation at time 2 (M2), clinical, neurological, hemogram, biochemical, MRI and CSF analyzes were performed. According to results in the experimental conditions described, it is concluded that the via intrathecal for the transplantation of allogeneic ASCs in dogs is viable and safe as it has been shown to be minimally invasive, rapid and allows to transplant a large number of cells in the subarachnoid space. Intrathecal allogeneic ASCs have been shown to be effective in improving clinical signs.

Key words: stem cells, *Morbillivirus*, central nervous system, treatment, sequels

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Morbillivirus* canino, da família Paramyxoviridae, altamente contagioso (GREENE; APPEL, 2006; SILVA et al., 2007). Os cães infectados pelo VCC podem manifestar uma combinação de sinais clínicos, incluindo lesões no sistema respiratório, gastrintestinais, cutâneos e neurológicos que podem ocorrer em sequência ou simultaneamente (GRÖNE et al., 2003).

As alterações neurológicas são caracterizadas por lesões desmielinizantes do sistema nervoso central (SNC), por replicação viral no interior dos oligodendrócitos e de células da microglia, regulação do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHCI) e infiltração de células inflamatórias, essas alterações induzem os sinais clínicos neurológicos (GEBARA et al., 2004; MANGIA; PAES, 2008; SCHOBESBERGER et al., 2002; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

As manifestações neurológicas dependem da região do SNC afetada (SILVA, 2009; MARTELLA et al, 2008; AMUDE et al., 2006). Há diversas síndromes descritas entre elas, a *encefalite de cães idosos* e a *encefalite pós-vacinal* com prognóstico desfavorável (GREENE; APPLE, 2006).

O tratamento para cinomose é baseado apenas em terapia de suporte (PINHEIRO et al., 2016). Uma opção de tratamento é a terapia com células-tronco (BLACK et al., 2007 e 2008). Essa terapia foi utilizada no tratamento de esclerose múltipla humana, doença autoimune neurodegenerativa, com sequelas semelhantes às da cinomose canina (RIORDAN et al., 2009). As células-tronco mesenquimais (MSCs) geraram um grande interesse no campo da medicina regenerativa devido às suas propriedades biológicas (HOFFMAN; DOW 2016; BAJEK et al. 2016).

Além disso, a utilização de MSCs por via intravenosa, em animais com lesão neurológica, apresentou atenuação significativa dos sinais neurológicos (BRITO et al., 2010).

As MSCs são células adultas indiferenciadas, autorrenováveis e com alta capacidade de proliferação, originando células diferenciadas e funcionais (NARDI, 2007). As MSCs foram descritas principalmente derivadas da medula óssea (BMMSCs), mas, nos últimos anos, as MSCs derivadas do tecido adiposo

também têm sido amplamente estudadas, uma vez que podem ser facilmente obtidas em cultura com alta taxa de proliferação. (FRESE et al. 2016). Dentro dos principais mecanismos de ação se destacam a secreção de fatores solúveis que estimulam a migração, mitose e diferenciação das células-tronco locais, imunomodulação do microambiente, além da estimulação da angiogênese do, favorecendo a regeneração e o reparo tecidual (FU et al. 2017; KYURKCHIEV et al. 2014). Embora controverso, as MSCs possuem potencial de se diferenciarem em várias linhagens celulares podendo originar células musculares, neuronais e hepatócitos (CASTRO-SILVA et al., 2010). A Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) definiu critérios para a caracterização das MSCs humanas. Dentre os critérios estão incluídos aderência ao plástico em cultura celular e expressar ou não marcadores de superfície específicos *cluster designation* (CD), além da demonstração *in vitro* para diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica (DOMINICI et al., 2006).

Nos animais domésticos, assim como para seres humanos, lesões no sistema nervoso podem ser debilitantes e devido à capacidade regenerativa limitada do sistema neural, a MSCs tem sido estudadas em algumas doenças do sistema nervoso central (KARUSSIS et al., 2013). Com base em evidências experimentais de seus modelos pré-clínicos, Uccelli et al. (2011) sugerem que as MSCs constituem uma promissora abordagem na reparação e proteção neural. Foi evidenciado que MSCs adultas possuem a capacidade de migrar para áreas lesadas, como áreas de hipóxia, apoptóticas ou inflamadas (PAUL; ANISIMOV, 2013). A atenuação dos sinais clínicos neurológicos de diversas doenças deve-se ao fato das MSC serem imunomoduladoras sendo tróficos para fator de crescimento do epitélio vascular (VEGF) pois estimula a angiogênese, impede a liberação de citocinas pró-inflamatórias e permite a regeneração tecidual. Outros mecanismos terapêuticos baseiam-se em sua capacidade parácrina, neuro/axonioprotetiva, manipulação genética e modulação da apoptose (CAPLAN; DENNIS, 2006; PERONI; BORJESSON, 2011; SCHWINDT et al., 2005; STEWART, 2011).

O potencial das MSCs em melhorar a regeneração nervosa com recuperação morfológica e funcional, após lesões do SNC e periférico, tem sido evidenciado em diversas espécies, como roedores (WANG et al., 2012; SHEN et al., 2010), primatas não humanos (HU et al., 2013), suínos (CHO et al., 2010),

humanos (BRAGA-SILVA et al., 2008), porém, estudos são necessários para esclarecer o efeito terapêutico em cães.

Acredita-se que grande parte das células administradas pela via IV são retidas nos pulmões, gânglios linfáticos e outros tecidos, reduzindo o número de células disponíveis para o SNC (KARUSSIS et al., 2010). Desta forma, a via intratecal é uma alternativa promissora e tem se mostrado eficaz e segura para aplicação de MSCs autólogas (CHEN, B. K. et al., 2014; MAIA et al., 2015; SATTI et al., 2016; ZEIRA et al., 2015) e alogênicas (LIANG et al., 2009; VILLANOVA; BACH, 2015).

Sendo assim, a terapia celular ainda é um desafio no âmbito do sucesso da técnica, uma vez que o tipo de célula, a fase da doença e a via de aplicação podem influenciar na resposta da terapia. O interesse em terapia celular aumentou ao longo dos anos, pois tem como objetivo reparar o tecido lesionado pelas células-tronco transplantadas, estimular as células-tronco residentes e melhorar o microambiente por meio de efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Adicionalmente os cães são modelos interessantes para doenças do sistema nervoso em humanos como esclerose múltipla.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia terapêutica das MSCs derivadas do tecido adiposo canino pela via intratecal (IT) em cães com encefalomyelite viral cinomose

1 At the time M2 there was an improvement of the protein values in relation
2 to the moment in M1 of the animals (3, 4, 5, 6, 7, 8), and some animals (3, 5, 7
3 and 10) still had a slightly increased number of proteins. In animals 9 and 10 the
4 increase of proteins at time 2 with respect to moment 1 may be related to the
5 stage of the disease. and to the non-stimulation of cells.

6 In the present study, the animals evaluated showed a good clinical
7 evolution. Attestation of the efficacy of transplantation of mesenchymal stromal
8 cells derived from adipose tissue intrathecally as a treatment of
9 encephalomyelitis caused by canine distemper virus. However, the use of this
10 therapy to be employed in the clinical routine, can find some limiting points, such
11 as the cost of the raw material and the technical enhancement, limited financial
12 access for some slices of the population, besides the need for a professional,
13 who has knowledge and training for the exact execution of the technique.

14

15 **CONCLUSION**

16 According to the results obtained in the described experimental conditions
17 it is concluded that the intrathecal route for the transplantation of allogeneic MSCs
18 -TA in dogs is viable and safe, as it has been shown to be minimally invasive,
19 quick and allows to transplant a large number of cells in the subarachnoid space.

20 In the animals of the present study, a single transplantation of 10×10^6
21 allogeneic MTCs was performed intrathecally, which proved to be effective in
22 improving clinical signs. Of the ten animals observed in the neurological
23 evaluation, seven presented a considerable reduction in the degree of the
24 Neurodeficiency Scale. The reduction of the degree was evidenced by the clinical

1 improvement of the neurological signs presented in the Posture, March,
2 Coordination, Cranial Nerves and Epileptic Crises.

3 Magnetic resonance imaging analyzes demonstrated the evolution and
4 improvement of the lesions of the animals, as well as correlating them with
5 neurological clinical signs before and after transplantation. In addition, the
6 improvement can be detected by analyzing CSF that indicated a reduction of the
7 number of cells present comparing the two moments (M1 and M2), this reduction
8 can also be observed in relation to the amount of protein.

9 In the present study, the animals evaluated showed a good clinical
10 evolution. Attestation of the efficacy of transplantation of mesenchymal stromal
11 cells derived from adipose tissue intrathecally as a treatment of
12 encephalomyelitis caused by canine distemper virus. However, despite the good
13 results obtained, the success of this treatment method depends on the precise
14 identification of the mechanisms and molecules that control and measure the
15 differentiation of a certain cell line, as well as the physiological mechanism
16 involved in neurological demyelilization, besides the establishment of therapy
17 protocols cell, according to the type of stem cell used by this transplant route,
18 number of transplanted cells and frequency of application, aiming the treatment
19 of this disease.

20 **ACKNOWLEDGEMENT**

21 We would like to acknowledge the School of veterinary medicine and
22 Animal Science, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (FMVZ-
23 UNESP, Campus Botucatu).

24

25

1 **ETHICAL APPROVAL**

2 The ethics committee for animal research (CEUA), from Botucatu Medical
3 School, São Paulo State University (UNESP), Brazil (processo nº 0232/2017)
4 approved all procedures in this study.

5 **STATEMENT OF HUMAN AND ANIMAL RIGHTS**

6 All surgical procedures and postoperative care in this study were conducted in
7 accordance with institutional ethics committee for animal research (CEUA), from
8 Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP).

9 **STATEMENT OF INFORMED CONSENT**

10 There are no human subjects in this article and informed consent is not
11 applicable.

12 **CONFLICTING INTEREST**

13 The authors have no competing interests.

14 **REFERENCES**

- 15 1. Greene CE, Appel MJ. Canine distemper. In: Greene CE, editors.
16 Infectious diseases of the dog and cat. St. Louis (MO): Saunders Elsevier; 2006.
17 p.24-41- SILVA, M. C.; *et al.*; Aspectos clinicopatológico de 620 casos
18 neurológicos de cinomose em cães. *Pesqui. Vet. Bras.* 2007; 27 (5):215 – 220.
19
- 20 2. Gröne A, Engelhardt P, Zurbriggen A. Canine distemper vírus infection:
21 proliferation on canine footpad keratinocytes. *Vet. Pathol* 2003; 40: 574-578.
22
- 23 3. Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrão FJ, Oliveira DB, Beloni SNE, Alfieri
24 AA. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-
25 PCR em urina de cães com sinais clínicos da cinomose. *Arq. Bras. Med. Vet.*
26 *Zootec* 2004; 56 (4):480-487.
27
- 28 4. Mangia SH, Paes AC. Neuropatologia da cinomose. *Vet. e Zootec.* 2008;
29 15 (3):427-427
30
- 31 5. Schobesberger M, Zurbriggen A, Doherr MG, Weissenböck H,
32 Vandeveldel M, Lassmann H. Demyelination procedes oligodendrocytes loss in
33 canine distemper vírus-induced encephalitis. *Acta Neuropathol.* 2002; 103(1):11-
34 19.
35

- 1 6. Vandeveld M, Zurbruggen A. Demyelination in canine distemper virus
2 infection: A review. *Acta Neuropathol.* 2005; 109(1): 56-68.
- 3
- 4 7. Vandeveld M, Frankhauser R, Kristensen F, Kistensen B.
5 Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis: An
6 immunohistological study. *Acta Neuropathol.* 1981; 54(1): 31-41.
- 7
- 8 8. Summers BA, Appel MJG. Aspects of canine distemper virus and measles
9 virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994; 20(6): 525-534.
- 10
- 11 9. Seehusen F, Orlando EA, Wewetzer K, Baumgärtner W. Vimentin-positive
12 astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in
13 chronic demyelination lesion. *Acta Neuropathol.* 2007; 114:597-608.
- 14
- 15 10. Silva MC, Figuera RA, Mazzanti A, Brum JS, Pierezan F, Barros CSL.
16 Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesqui. Vet. Bras.*
17 2009; 643-352.
- 18
- 19 11. Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine Distemper Virus. *Vet Clin North*
20 *Am Small Anim Pract.* 2008;38(4):787-797
- 21
- 22 12. Amude AM, Alfieri AA, Alfieri AF. The nervous form of canine distemper.
23 *Vet. e Zootec.* 2006; 13(2): 125-136.
- 24
- 25 13. Black LL, Graynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S. Effect of
26 adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs
27 with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-
28 blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther.* 2007; 8: 272-284.
- 29
- 30 14. Black LL, Graynor J, Adams C, Dhupa S, Sams AE, Taylor R. Effect of
31 intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and
32 regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in
33 dogs. *Vet Ther.* 2008; 9: 192-200.
- 34
- 35 15. Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F. Nonexpanded adipose
36 stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2009;
37 7: 29.
- 38
- 39 16. Hoffman AM, Dow SW. Concise review: stem cell trials using companion
40 animal disease models. *Stem Cells.* 2016; 34(7): 1709-1729.
- 41
- 42 17. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T.
43 Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch. Immunol. Ther.*
44 *Exp.* 2016; 64(6):443-454.
- 45
- 46 18. Nardi NB. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genética na Escola.* 2007;
47 2(2): 25-29.
- 48
- 49 19. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in
50 regenerative medicine. *Transfus Med Hemother.* 2016; 43(4): 268-274.

- 1 20. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperier M. Trophic effects of
2 mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;
3 23(6): 515-528.
4
- 5 21. Kyurchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T,
6 Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by
7 mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014; 6(5): 552-570.
8
- 9 22. Castro-Silva II, Coutinho LACR, Granjeiro JM. Revisão sistemática sobre
10 o uso de células-tronco mesenquimais em terapias de perdas ósseas.
11 *Innovations Implant Journal.* 2010;5(3):29-34.
12
- 13 23. Dominici M, LeBlanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause
14 D. Minimal Criteria for defining multipotente mesenchymal stromal cells: The
15 International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*
16 2006;8(4):315-317.
17
- 18 24. Karussis D, Petrou P, Kassis I. Clinical Experience with stem cells and
19 other cell therapies in neurological diseases. *J Neurol Sci.* 2013;324(1-2):1-9.
20
- 21 25. Ucelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D, Neuroprotective features of
22 mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; 24(1): 59-64.
23
- 24 26. Paul G, Anisimov SV. The secretome of mesenchymal stem cells:
25 Potential implications for neuroregeneration. *Biochimie.* 2013; 95(12):2246-2256.
26
- 27 27. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J*
28 *Cell Biochem.* 2006;98(5):1076-1084.
29
- 30 28. Peroni JF, Borjesson DL. Anti-inflammatory and immunomodulatory
31 activities of stem cells. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011; 27.
32
- 33 29. Schwindt TT, Barnabé GF, Mello LEAM. Proliferar ou diferenciar?
34 Perspectivas de destino das células-tronco. *J. Bras. Neurocir.* 2005;16(1):13-19.
35
- 36 30. Stewart MC. Cell-based therapies: Current issues and future directions.
37 *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011; 27(2):393-399.
38
- 39 31. Wang Y, ZHAO Z, REN Z, ZHAO B, ZHANG L, CHEN J. Recellularized
40 nerve allograft with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral
41 nerve regeneration. *Neurosci. Lett.* 2012; 514:96-101.
42
- 43 32. Shen J, Duan XH, Cheng LN, Zhong XM, Guo RM, Zhang F. In vivo MR
44 imaging tracking of transplated mesenchymal stem cells in a rabbit modelo f
45 acute peripheral nerve traction injury. *J Magn Reson Imaging.* 2010. 32:1076-
46 1085.
47
- 48 33. Hu N, Wu H, Xue C, Gong Y, Wu J, Xiao Z. Long-term outcome of the
49 repair of 50mm long median nerve defects in rhesus monkeys with marrow

- 1 mesenchymal stem cells-containing, chitosan-based tissue engineered nerve
2 grafts. *Biomaterial*. 2013; 34:100-111.
- 3
- 4 34. Cho Y, Jang S, Lee SC, Jeong HS, Park JS, Han JY. Effect of neural-
5 induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve
6 regeneration in a acute nerve injury model. *Laryngoscope*. 2010; 120:907-913.
- 7
- 8 35. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa
9 DA. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome
10 from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Am*.
11 2008; 33:488-549.
- 12
- 13 36. Karussis D, Petrou P, Kassis I. Clinical Experience with stem cells and
14 other cell therapies in neurological diseases. *J Neurol Sci*. 2013;324(1-2):1-9.
- 15
- 16 37. Chen BK, Staff NP, Knight AM, Nesbitt JJ, Butler GW, Padley DJ. A safety
17 study on intrathecal delivery of autologous mesenchymal stromal cells in rabbits
18 directly supporting phase I human trials. *Transfusion*, 2014.
- 19
- 20 38. Maia L, Landim-Alvarenga FC, Taffarel MO, Moraes CN, Machado GF,
21 Melo GD. Feasibility and Safety of intrathecal transplantations of autologous bone
22 marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC Vet Res*. 2015;11(1):63.
- 23
- 24 39. Satti HS, Waheed A, Ahmed P, Ahmed K, Akram Z, Aziz T. Autologous
25 mesenchymal stromal cell transplantation for spinal cord injury: A phase I pilot
26 study. *Cytotherapy*. 2016;18(4):518-522.
- 27
- 28 40. Zeira O, Asiag N, Aralla M, Ghezzi E, Pettinari L, Martinelli L. Adult
29 autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious
30 inflammatory diseases of the canine central nervous system: Safety, feasibility
31 and preliminar clinical findings. *J Neuroinflammation*. 2015;12.
- 32
- 33 41. Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Wang J, Han Z. Allogeneic
34 mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Mult*.
35 *Scler. J*. 2009; 15(5):644-646.
- 36
- 37 42. Villanova M, Bach JR. Allogeneic Mesenchymal stem cell therapy
38 outcomes for three patients with spinal muscular atrophy type 1. *Am J Phys Med*
39 *Rehabil*. 2015;94(5):410-415.
- 40
- 41 43. Delahunta A, Glass E, Kent M. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical*
42 *Neurology*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2010.
- 43
- 44 44. An DJ, Kim TY, Song DS, Kang BK, Park BK. Na immunochromatography
45 assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine
46 distemper. *J Virol Methods*. 2008; 147:244-249.
- 47
- 48 45. Curti MC, Arias MVB, Zanutto MS. Avaliação de um kit imunoensaio
49 cromatográfico para detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com

- 1 sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. *Semina: Ciências Agrárias*.
2 2012;33(6):2383-2390.
3
- 4 46. Shin Y, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. Detection of canine
5 distemper vírus nucleocapsid protein gene in canine peripheal bblood
6 mononuclear cells by RTPCR. *J Vet Med Sci*. 1995;57(3):439-445.
7
- 8 47. Frisk AL, KONIG M, MORITZ A, Baumgärtner W. Detection of canine
9 distemper vírus nucleoprotein RNA by reverse transcription PCR using sérum,
10 whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol*.
11 1999;37(11):3634-3643.
12
- 13 48. Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E. Detection
14 of canine distemper vírus in dogs by real-time RT-PCT. *J Virol Methods*. 2006;
15 136(1):171-176.
16
- 17 49. Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente MS, Larocca V, Martella V.
18 Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J*
19 *Virol Methods*. 2015; 213:127-130.
20
- 21 50. Negrão FJ, Alfieri AA, Alfieri AF. Avaliação da urina e de leucócitos como
22 amostrar biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina
23 por RT-PCR em cães naturalmente infectados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*.
24 2007; 59(1):253-257.
25
- 26 51.]Alcalde R, Kogika MM, Fortunato VAB, Coelho BMP, Lopes LR, Paiva
27 PB, Durigon EL. Canine distemper vírus: detection of viral RNA by Nested RT-
28 PCR in dogs with clinical diagnosis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2013;50(1):74-
29 76.
30
- 31 52. Silva ING, Guedes MIF, Rocha MFG, Oliveira LC, Moreira OC, Teixeira
32 MFS. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de
33 cães com cinomose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2005;57(1):136-139.
34
- 35 53. Braz GF. Padronização e teste da Técnica de Imunofluorescência direta
36 para o diagnóstico da cinomose canina. Dissertação (mestrado) – Universidade
37 Federal de Minas Gerais, 2009; 43.
38
- 39 54. Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th ed. Ames:
40 Wiley Blackwell; 2010.
41
- 42 55. Greene CE, Vandeveld M. Canine Distemper In: Greene CE. *Infectious*
43 *Diseases of the dog and cat* 4th ed. St. Louis: Elsevier; 2012. p.25-41.
44
- 45 56. Breazile JF, Blaugh BS, Nail N. Experimental study of canine distemper
46 muoclonus. *Am J Vet Res*. 1966; 27(120):1375-1379.
47
- 48 57. Tipold A, Vandeveld M, Jaggy A. Neurological manifestations of canine
49 distemper vírus infection. *J Small Anim Pract*. 1992; 33:466-470.
50

- 1 58. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgaertner W, Lekkas S, Kontos V.
2 Relation of Clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper
3 encephalomyelitis. *J Comp Pathol.* 2002; 126:47-56.
4
- 5 59. Lorenz MD, Kornegay JN. *Neurologia Veterinária*, 4th ed. São
6 Paulo:Manole; 2006.
7
- 8 60. O'brien DP. Lead toxicity in a dog. *Am Anim Hosp Assoc.* 1981; 29:845-
9 847.
10
- 11 61. McCandlish IAP. Infecções específicas caninas. In: Dunn JK. *Tratado de*
12 *Medicina de Pequenos Animais.* São Paulo: ROCA, 2001. p.915-952.
13
- 14 62. Dias MBMC, Lima ER, Fukahori FLP, Silva VCL, Rêgo MSA. Cinomose
15 canina: revisão de literatura. *Medicina Veterinária.* 2012;4(6):32-40.
16
- 17 63. Beer J. Doenças Causadas por Vírus, infecções por clamídeas,
18 richettiase, micoplasmose. In: Beer J. *Doenças Infecciosas em Animais*
19 *Domésticos.* São Paulo: Roca; 1998.
20
- 21 64. Hoskins JD. Doenças Virais caninas. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado*
22 *de Medicina Interna Veterinária*, 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;
23 2004. p.440-446.
24
- 25 65. Shering RG. Cinomose Canina. In: Birchard SJ, Shering RG. *Manual*
26 *Sauders – Clínica de Pequenos Animais*, 3th ed. São Paulo: Roca; 2008. p.2048.
27
- 28 66. Martins DB, Lopes STDA, França RT. Cinomose canina: Revisão de
29 literatura. *Acta Veterinária Brasilica.* 2009; 3(2):68-78.
30
- 31 67. Nelson RW, Couto CG. *Medicina Interna de Pequenos Animais*, 4th ed.
32 Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
33
- 34 68. Flores-Figuero AE, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales
35 mesenquimales: historia, biologia y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin.* 2006;
36 58(5).
37
- 38 69. PÉREZ, B. F. Viabilidade e Segurança do Transplante Intratecal de
39 Células-Tronco Mesenquimais Autólogas e Alogênicas Provenientes da Medula
40 Óssea de Cães (lupus canis familiaris) Dissertação (Mestrado) - Universidade
41 Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
42 e Zootecnia, 2013
43
- 44 70. Enciso N, Ostronoff LLK, Mejías G, León LG, Fermín ML, Merino E. Stem
45 cell factor supports migration in canine mesenchymal stem cells. *VET RES*
46 *COMMUN.* 2018;42(1):29-38.
47
- 48 71. Karp JM, Leng TGS. Mesenchymal Stem Cell Homing: the devil is in the
49 details. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(3):206-216.
50

- 1 72. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and
2 tracking. *Stem Cells Int.* 2013; 2013:1-8.
3
- 4 73. Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L. Regulation of CXCR4 expression
5 in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing
6 efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica.* 2007;92(7):897-904.
7
- 8 74. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M.
9 Isolation, characterization and differentiation potential of canine adipose-derived
10 stem cells. *Cell Transplant.* 2010; 19:279-289.
11
- 12 75. De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever JD,
13 Waele M. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through
14 bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue
15 inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologia.* 2007;92(4):440-449.
16
- 17 76. Bakshi A, Barshinger A, Swanger S, Madhvani V, Shumsky J, Neuhuber
18 B, Fischer I. Lymbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord
19 contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation.
20 *JNeurotrauma.* 2006; 23(1):55-65.
21
- 22 77. Roisen FJ, Kluebber KM, Lu CL, Hatcher LM, Dozier A, Shields CB,
23 Maguire S. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res.* 2001; 890:11-22.
24
- 25 78. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz
26 SI, Laine GA, Cox CS. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous
27 stem cells delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*
28 2008;18(5):883-891.
29
- 30 79. Dahlgren LA. Stem Cell Therapy. In. Robinson NE, Sprayberry KA.
31 *Current Therapy in Equine Medicine.* St. Louis: Saunders; 2009. p. 908-911.
32
- 33 80. Omori Y, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Kocsis JD.
34 Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human
35 mesenchymal stem cell after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res* .
36 2008;1236:30-38.
37
- 38 81. Jung DI, Ha J, Kang BT, Kim JW, Quan FS, Lee JH, Woo EJ, Park HM. A
39 comparison of Autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal
40 stem cell transplantations in canine spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2009;285(1-
41 2):67-77.
42
- 43 82. MONTEIRO, B. A. Efeitos da terapia com células tronco mesenquimais
44 em afecções do sistema nervoso de cães. 2017 Tese (Doutorado) -Universidade
45 Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
46 e Zootecnia.
47
- 48 83. Jarocho D, Milczarek O, Wedrychowiz A, Kwiatkowski S, Maika M.
49 Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations
50 in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2015; 24:661-672.

- 1 84. Brito HFV, Santos MR, Gillioll R, Li L, Passos LAC, Lancellotti M, Ferreira
2 F, Corat MAF. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por
3 infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células
4 mononucleadas de medula óssea. *Medvet – Revista Científica de Medicina*
5 *Veterinária – Pequenos Animais*. 8(24):26-29.
6
- 7 85. Pinheiro AO, Cardoso MT, Vidane AD, Casals JB, Passarelli D, Alencar
8 ALF. Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute
9 phase of canine distemper disease. *Genet Mol Res*. 2016;15(2).
10
- 11 86. Li J, Chen L, Chen Q, Hu D, Lin J. Effect of Granulocyte colony-stimulating
12 fator mobilizing bone marrow mesenchymal stem cells homing to injury sites in
13 spinal cord injury of rats. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*.
14 2019;33(1):93-100.
15
- 16 87. Bathen-Noethen A, Stein VM, Puff C, Baumgaertner W, Tipold A. Magnetic
17 resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *J Small*
18 *Anim Pract*. 2008;49(9):460-467.
19
- 20 88. Griffin JF, Young BD, Levine JM. Imaging diagnosis – Chronic canine
21 distemper meningoencephalitis. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009;50(2):182-184.
22
- 23 89. Chrisman C, Mariani C, Platt S, Clemmons R. *Neurologia para o clínico de*
24 *pequenos animais*. São Paulo: Roca; 2005.
25
- 26 90. Abate O, Bollo E, Lotti D, Bo S. Cytological, immunocytochemical and
27 biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system
28 disorders of dogs. *J Vet Med*. 1998; 45:73-85.
29
- 30 91. Tipold A. Cerebrospinal Fluid. In: Vite CH, Braund KG. *Braund's clinical*
31 *neurology in small animals: Localization, diagnosis and treatment*. Ithaca:
32 *International Veterinary Information Service*; 2003.
33
- 34 92. Gama FGV, Nishimori CT, Sobreira MR, Santana AE. Caracteres físico-
35 químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose.
36 *Ciência Rural*. 2005; 35(3).
37
- 38 93. Vandeveld M, Spano JS. Cerebrospinal fluid cytology in canine
39 neurologic disease. *American Journal of Veterinary Research*. 1977;
40 38(11):1827-1832.
41
- 42 94. Coles EH. Cerebrospinal fluid. In: Coles EH. *Vet Clin Pathol*. Canadá:
43 *Saunders*; 1986.
44
- 45 95. Feitosa MM, Feitosa FLF, Kohayagawa A, Curi PR, Mogami SRK.
46 Avaliação física, citológica, conteúdo de proteínas e determinação qualitativa de
47 globulinas do liquor de cães com encefalite por cinomose. *Braz. J. Vet. Res.*
48 *Anim. Sci*. 1997;34(3):147-151.
49

- 1 96. Thomas WB, Sorjonen DC, Steiss JE. A retrospective evaluation of 38
2 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1993;
3 29:129-133.
4
- 5 97. Feldman BF. Cerebrospinal fluid. In: Kaneko JJ. *Clinical Biochemistry of*
6 *domestic animals*, 4th ed. San Diego: Academic; 1989. p. 835-865.
7
- 8 98. Fernandes RW. Determinação dos valores líquóricos normais de glicose,
9 proteína, globulina, uréia, creatinina fosfoquinase (CK), aspartato
10 aminotransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidez e coagulabilidade
11 em cães sadios. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 1990; 27(2):209-216.
12
- 13 99. DiTerlizzi R, Platt S. The function, composition and analysis of
14 cerebrospinal fluid in companion animals: part II – analysis. *Vet Journal.* 2009;
15 180(1):15-32.
16
- 17 100. Sorjonem DC. Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns
18 in cerebrospinal fluido f dogs with central nervous system disorders. *Am J Vet*
19 *Res.* 1987;48(2):301-305.
20
- 21 101. Braund KG. Distemper. In: Braund KG. *Clinical Syndromes in veterinary*
22 *neurology*, 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1994. p. 115-119.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52