

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES NO
TRATAMENTO DA ENCEFALOMIELEITE CAUSADA PELO VÍRUS DA CINOMOSE
EM CÃES**

THIAGO TOURINHO PEREIRA

Botucatu - SP
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES NO
TRATAMENTO DA ENCEFALOMIELEITE CAUSADA PELO VÍRUS DA CINOMOSE
EM CÃES**

THIAGO TOURINHO PEREIRA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, para obtenção do título de mestre em Medicina veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Botucatu - SP
2025

P436u Pereira, Thiago Tourinho
Uso de células estromais mesenquimais multipotentes no
tratamento da encefalomyelitis causada pelo vírus da cinomose
em cães. / Thiago Tourinho Pereira. Botucatu, 2025
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Botucatu,
Orientador: Rogério Martins Amorim

1. Terapia Celular. 2. Neuroinflamação. 3.
Desmielinização. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Título da Dissertação – Uso de células estromais mesenquimais multipotentes no tratamento da encefalomielite causada pelo vírus da cinomose em cães.

Impacto científico esperado: Avaliação da eficácia de uma modalidade terapêutica para sequelas neurológicas derivadas da cinomose canina, uma doença comum, que impacta negativamente a qualidade de vida de cães afetados.

Impacto social: A confirmação da eficácia do tratamento para as sequelas neurológicas derivadas da cinomose, melhorando a qualidade de vida dos cães afetados, reduz o impacto emocional e financeiro sobre tutores, que por forte vínculo afetivo com seus animais, buscam alternativas terapêuticas para os sinais neurológicos.

Impacto econômico: Ao desenvolver um protocolo eficaz de terapia celular, esta pesquisa pode minimizar os gastos com terapias adjuvantes pouco efetivas.

Potential impact of this research

Dissertation Title – Use of multipotent mesenchymal stromal cells in the treatment of encephalomyelitis caused by the distemper virus in dogs.

Expected Scientific Impact: Evaluation of the efficacy of a therapeutic modality for neurological sequelae resulting from canine distemper, a common disease that negatively impacts the quality of life of affected dogs.

Social Impact: Confirming the efficacy of treatment for neurological sequelae resulting from canine distemper, by improving the quality of life of affected dogs, reduces the emotional and financial burden on caregivers, who, due to a strong emotional bond with their animals, seek therapeutic alternatives for neurological signs.

Economic Impact: By developing an effective cell therapy protocol, this research may help minimize expenses associated with less effective adjuvant therapies.

Nome do autor: Thiago Tourinho Pereira

Título: USO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES NO TRATAMENTO DA ENCEFALOMIELEITE CAUSADA PELO VÍRUS DA CINOMOSE EM CÃES.

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Harald Fernando Vicente de Brito
Membro
Instituto Brasileiro de Pós-graduação em Medicina Veterinária
QUALITTAS – São Paulo

Profª. Drª. Camila Michele Appolinário
Membro
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 22 de abril de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Francis por todo apoio incondicional, ao longo da jornada acadêmica, desde a primeira vinda a Botucatu para iniciar a residência até a decisão da realização do mestrado em busca dos meus objetivos ao aprimoramento na área da Neurologia Veterinária.

Ao meu pai, também por todo apoio incondicional durante essa trajetória, incentivos ao comparecimento de cursos extensivos e congressos voltados ao meu aprimoramento na área durante a permanência em Botucatu.

Ao meu irmão por todas as conversas, troca de experiências e distrações em meio a todas as dificuldades enfrentadas ao longo desses anos, devido a desgastante trajetória de uma residência seguida de mestrado longe de todos os familiares.

A minha namorada, por compreensão e paciência nos meus momentos de ausência para total foco a pesquisa. Sua companhia e constante incentivo foram fundamentais para que mesmo nos dias mais difíceis, um foco de alegria e esperança surgia, recarregando minhas forças e vontade de seguir em frente com essa jornada.

Aos meus amigos Alisson e Vinicius por todo apoio, presença constante, companheirismo. Suas amizades tornaram os dias especiais e além de tornarem tudo mais leve, com eles pude contar com uma segunda família.

Ao meu orientador, Rogério Martins Amorim, expresse minha gratidão por todos os ensinamentos e oportunidades durante essa trajetória acadêmica, e toda sua confiança depositada em mim para execução deste trabalho.

Aos residentes do hospital veterinário da UNESP de Botucatu, em especial os da Clínica Médica, Júlio, Samara, André, Amanda, Beatriz, Alana, Júlia, agradeço por compartilharem de suas rotinas, e espaço para que o projeto fosse realizado. Aos do laboratório clínico, Elisa, Giovanna, Cintia, Fauane, Gabriel, William, e os residentes da anestesia, agradeço a parceria e todo o cuidado com os pacientes do projeto.

Ao técnico Heraldo, agradeço por toda troca de experiência durante os exames de ressonância magnética.

Ao laboratório Ourofino Saúde Animal pela parceria e fornecimento do tratamento do projeto.

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

PEREIRA, T.T. **Uso de células estromais mesenquimais multipotentes no tratamento da encefalomielite causada pelo vírus da cinomose em cães.** Botucatu, 2025. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A cinomose canina é uma grave doença viral que causa sinais sistêmicos variados, incluindo sinais neurológicos. Não apresenta predisposição para raça, idade ou sexo, podendo ocorrer em qualquer cão que seja exposto ao vírus com ausência de histórico vacinal, imunização inadequada ou imunidade comprometida. Seus sinais neurológicos são decorrentes de lesões direta da replicação do vírus em tecido nervoso e mecanismos de desmielinização, devido lesões crônicas do sistema nervoso dos animais infectados. As opções de tratamentos para a doença são escassas e até o momento nenhum tratamento eficaz foi descrito. Devido às suas propriedades imunomoduladoras e neuroregenerativas, as células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) são de grande interesse no tratamento de animais com lesões neurológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da terapia celular utilizando as células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de tecido adiposo canino (cAT-MSCs) por via intravenosa na dose de 6×10^6 em animais com sequelas neurológicas de cinomose. Ao todo foram tratados sete animais, totalizando três transplantes com intervalos de 30 dias. Uma escala de neurodeficiência foi utilizada para avaliar a condição neurológica de cada animal, além da análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) e imagens de ressonância magnética (RM) no início e final do tratamento. Os animais apresentaram evolução clínica positiva com média de 51% de melhora dos sinais neurológicos, principalmente após o segundo e terceiro transplante de cAT-MSCs, porém sem mudanças significativas na análise de LCR e no exame de RM. Nosso estudo demonstrou que o transplante de cAT-MSCs por via intravenosa em cães acometidos por sequelas neurológicas, apresenta potencial terapêutico a fim de atenuar o quadro clínico e fornecer melhora na qualidade de vida dos animais afetados.

Palavras-chave: Desmielinização; Neuroinflamação; Terapia Celular.

PEREIRA, T.T. **Use of multipotent mesenchymal stromal cells in the treatment of encephalomyelitis caused by the distemper virus in dogs.** Botucatu, 2025. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Canine distemper is a severe viral disease that affects dogs regardless of breed, age, or sex, leading to systemic and neurological signs, particularly in unvaccinated or immunocompromised animals. Neurological manifestations result from direct viral replication in nervous tissue and demyelination due to chronic lesions in the central nervous system. Effective treatment options remain limited. Owing to their immunomodulatory and neuroregenerative properties, multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) have emerged as a promising therapeutic alternative. This study aimed to evaluate the efficacy of intravenous therapy using canine adipose tissue-derived MSCs (cAT-MSCs) at a dose of 6×10^6 in dogs with neurological sequelae of distemper. Seven animals underwent three cell transplants at 30-day intervals. Neurological status was assessed using a neurodeficiency scale, cerebrospinal fluid (CSF) analysis, and magnetic resonance imaging (MRI) at baseline and after treatment. Clinical improvement was observed in all animals, with an average of 51% reduction in neurological signs, particularly after the second and third transplants, despite no significant changes in CSF or MRI findings. These results suggest that intravenous cAT-MSC transplantation holds therapeutic potential for improving clinical outcomes and quality of life in dogs affected by neurological sequelae of distemper.

Keywords: Cell therapy; Demyelination; Neuroinflammation.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Escala de Neurodeficiência.....	24
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão dos escores de neurodeficiência dos cães (n=7) submetidos ao transplante com células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino (cAT-MSCs), avaliados nos momentos, M1 (0 dias), M2 (30 dias), M3 (60 dias), M4 (90 dias) e M5 (120 dias).	37
Tabela 2. Resultados individuais da análise de líquido cefalorraquidiano dos cães (n=7) submetidos aos transplantes com células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino, nos momentos M2 (30 dias - antes do primeiro transplante) e momento M5 (30 dias após o terceiro transplante).	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização do genoma viral do CDV.	15
Figura 2. Momentos Experimentais.	21
Figura 3. Preparação das cAT-MSCs.	22
Figura 4. Animal 2 apresentando hiperqueratose dos coxins em momento M3 e melhora significativa em momento M4.	28
Figura 5. Animal 3 apresentando hiperqueratose dos coxins em momento M4 e melhora discreta em momento M5.	28
Figura 6. Animal 3 apresentando hiperqueratose de focinho com melhora gradual a cada tratamento com cAT-MSCs.	29
Figura 7. Escore de neurodeficiência.	30
Figura 8. Ressonância magnética de medula espinhal cervical do animal 5 em momento M2 antes do transplante de cAT-MSCs.	39
Figura 9. Ressonância magnética de medula espinhal cervical do animal 7.	40

LISTA DE SIGLA E ABREVIACÕES

cAT-MSCs – Culas estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino

CD – Cluster *of differentiation*

CDV – Virus da cinomose canina

CSF – Cerebrospinal fluid

LCR – Lido cefalorraquidiano

MHC – Complexo de histocompatibilidade

MRI – Magnetic resonance imaging

MSCs – Culas estromais mesenquimais multipotentes

RM – Ressonância magnética

Treg – Linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 CINOMOSE	14
2.2 NEUROPTOGENIA E DESMIELINIZAÇÃO	16
2.3 CARACTERIZAÇÃO DE MSCs E IMUNOMODULAÇÃO	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
4.1.1 Seleção dos animais	20
4.1.2 Momentos Experimentais	20
4.2 PREPARAÇÃO DAS cAT-MSCs	21
4.3 TRANSPLANTE INTRAVENOSO DE cAT-MSCs	22
4.4 ANAMNESE E EXAME FÍSICO GERAL	23
4.5 EXAME NEUROLÓGICO	23
4.6 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	26
4.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (RM)	26
4.8 COLETA E ANÁLISE DO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)	26
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5. RESULTADOS	27
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA GERAL	27
5.2 EXAME NEUROLÓGICO	29
5.3 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	38
5.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	38
5.5 ANÁLISE DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	47
ARTIGO CIENTÍFICO	51

1. INTRODUÇÃO

A cinomose canina é uma grave doença infectocontagiosa, causada por um vírus do gênero *Morbillivirus*, da família Paramyxoviridae. Suas manifestações clínicas podem ser subclínicas, agudas ou crônicas, caracterizadas por sinais clínicos cutâneos, gastrointestinais, respiratórios e neurológicos (MARTELLA et al., 2008; MANGIA & PAES, 2016). A difusão viral depende da resposta imunológica do hospedeiro assim como virulência da cepa infectante, estes fatores influenciam para que a doença sistêmica progrida para sua fase neurológica (MANGIA & PAES, 2016; SYKES & VANDEVELDE, 2022).

As alterações neurológicas são resultado de diferentes lesões desmielinizantes, que variam de acordo com a fase da doença. Lesões agudas ocorrem por lesões virais diretas devido a replicação viral nas células da glia, principalmente nos astrócitos e oligodendrócitos, conseqüentemente, há um aumento na produção de TNF-alfa, que leva a mais destruição de oligodendrócitos e perda de mielina. As lesões de forma crônica são expressas por aumento difuso da regulação do complexo de histocompatibilidade (MHC), formação de radicais livres de oxigênio e infiltração de células inflamatórias, sendo o antígeno restrito nesta fase (SUMMERS & APPEL, 1987; VANVEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; SCHOBESBERGER et al., 2002; VANVEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; MANGIA & PAES, 2016).

O tratamento para cinomose consiste em terapia de suporte (MARTELLA et al., 2008; PINHEIRO et al., 2016). Considerando as características inflamatórias da fase crônica da doença, a terapia com células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) é uma alternativa para o tratamento (PINHEIRO et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019; ZHANG et al. 2022).

As MSCs exercem duas principais funções, recuperação de tecidos lesionados e atividade imunomoduladora. Essas funções são mediadas após identificação de um microambiente lesionado, através de mecanismos parácrinos resultados da liberação de fatores solúveis como as citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, além de efeitos antiapoptótico e antioxidantes (FRESE et al., 2016).

O efeito regulatório das MSCs sobre linfócitos e macrófagos também é crucial na modulação da resposta imunológica, através da inibição de linfócitos T e promovendo a diferenciação dos linfócitos T reguladores (Treg). Enquanto nos

macrófagos influencia na polarização para o fenótipo M2, acentuando a função anti-inflamatória da terapia (BRAZA et al., 2016; CARTY et al., 2017).

A terapia com MSCs por via intravenosa é investigada, principalmente, a respeito de sua segurança e eficácia em diferentes doenças neurológicas, a sua utilização em casos de animais com lesões neurológicas decorrentes da cinomose tem apresentado redução significativa dos sinais neurológicos (BRITO et al., 2010; KARUSSIS et al., 2013).

Considerando o potencial terapêutico das MSCs na neuro-regeneração e a ausência de terapias definitivas para desmielinização desencadeados pela cinomose canina, a hipótese desse estudo é de que a terapia com as células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de tecido adiposo canino (cAT-MSCs), por meio de múltiplos transplantes intravenosos em cães portadores de sequelas neurológicas secundárias a cinomose, melhore o quadro neurológico desses animais progressivamente, atenuando o quadro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CINOMOSE

A cinomose canina é causada por um vírus RNA de fita simples do gênero *Morbillivirus*, e família *Paramyxoviridae* (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995). Sendo extremamente contagioso, o vírus da cinomose (CDV) afeta principalmente cães domésticos, porém a infecção também é descrita em espécies de vida selvagem, como grandes felinos, mustelídeos e mamíferos aquáticos (KAPIL & YEARY, 2011; GIACINTI et al., 2022).

Contendo 15.690 nucleotídeos, o genoma do CDV codifica 8 proteínas, sendo 6 dessas envolvidas na estrutura viral. As proteínas hemaglutinina (H), proteína de fusão (F) e proteína de matriz (M) são proteínas de superfície da membrana do CDV, enquanto as proteínas nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P) e proteína de grande polimerase (L) então internamente envolvidas na formação do complexo ribonucleoproteico (RNP) (Figura 1) (KOLAKOFSKY, 2016; FREITAS et al., 2019; RENDON-MARIN et al., 2019).

Cada proteína tem uma função específica para o funcionamento e replicação viral, a proteína N é responsável por encapsular o RNA viral, enquanto as proteínas P e L participam da replicação e transcrição do RNA viral. A proteína M tem importante função na montagem e desenvolvimento viral, conectando as proteínas de superfície H, que apresentam função de fixação do vírus nas células hospedeiras, enquanto a proteína F media a fusão entre o vírus e a célula infectada (DA FONTOURA BUDASZEWSKI & VON MESSLING, 2016; FREITAS et al., 2019; RENDON-MARIN et al., 2019). As proteínas não estruturais C e V são codificadas através da proteína P por uma sobreposição na fase de leitura aberta, sendo responsáveis pela modulação da resposta imune e patogenia do vírus, assim como função de evasão do sistema imune do hospedeiro (DA FONTOURA BUDASZEWSKI & VON MESSLING, 2016; RENDON-MARIN et al., 2019).

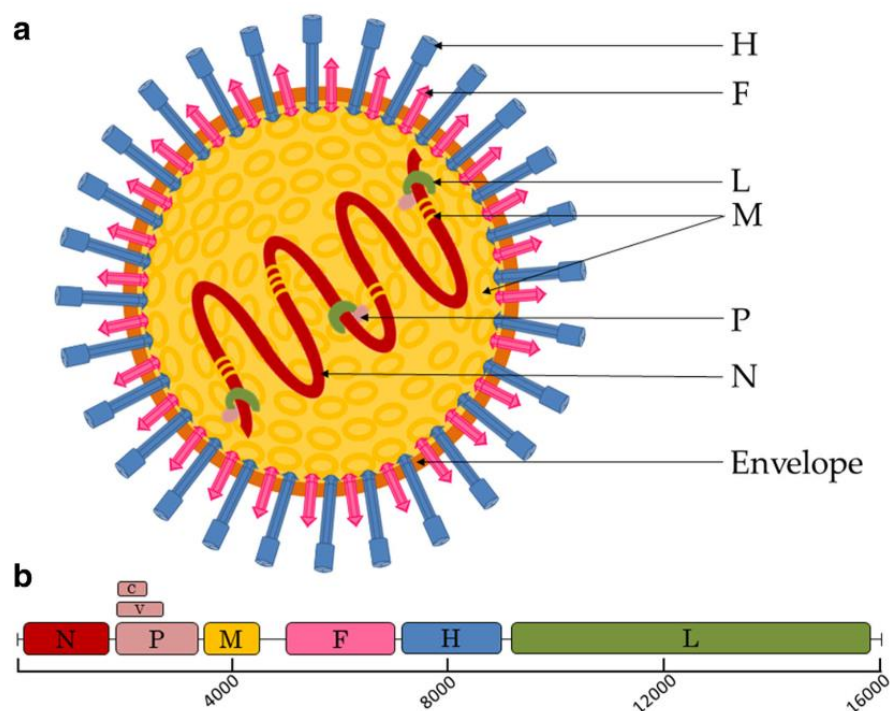


Figura 1. Organização do genoma viral do CDV. **a.** Diagrama esquemático das partículas do CDV, N: nucleocapsídeo, P: fosfoproteína, M: proteína matriz, F: proteína de fusão, H: hemaglutinina, L: proteína grande de polimerase. **b.** Mapa do genoma do RNA, representando separadamente cada mRNA codificado, e sobreposição das proteínas C e V originadas da proteína P. Fonte: Rendon-Marin et al., (2019).

Podendo afetar cães de qualquer idade, raça ou sexo, a cinomose é mais frequente, principalmente, em animais jovens e sem histórico de vacinação, resultante de falha imunológica (SILVA et al., 2007; KAPIL & YEARY, 2011).

Os sinais clínicos da cinomose são variados e afetam diferentes sistemas do organismo, sua gravidade está relacionada a virulência da cepa (LOOTS et al., 2017; SHRESTHA et al., 2021). Inicialmente, são observados sinais sistêmicos gerais como febre, inapetência, letargia, progredindo para sinais de trato respiratório como secreções nasais purulentas e pneumonia, sinais oculares como secreção ocular e conjuntivite, gastrointestinais como vômitos e diarreia, e dermatológicos marcados por pústulas abdominais e presença de hiperqueratose de coxins e focinho (MARTELLA et al., 2008; SHRESTHA et al., 2021; MANANDHAR et al., 2023). A presença de hipoplasia de esmalte dentário também pode ser observada (MARTELLA et al., 2008).

As alterações neurológicas causadas pelo CDV variam de acordo com a área do sistema nervoso central (SNC) afetada. Secundárias a polioencefalite aguda e leucoencefalomielite desmielinizantes, os sinais neurológicos observados variam entre crises epiléticas, paresias, plegias, mioclonias, ataxia, mudanças de comportamento, lateralização e inclinação da cabeça (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995, 2005; MARTELLA et al., 2008; ARECO et al., 2021).

2.2 NEUROPATOGENIA E DESMIELINIZAÇÃO

A via principal de infecção é por aerossóis, sua replicação primária ocorre em tecido linfóide do trato respiratório, tendo como alvo, as células mononucleares (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; MARTELLA et al., 2008; SHRESTHA et al., 2021). A entrada do CDV no SNC pode ocorrer por diferentes vias, sendo as duas mais comuns a passagem de células infectadas da corrente sanguínea ao cérebro através da barreira hematoencefálica, ou a passagem direta do vírus ao líquido cefalorraquidiano, levando a infecção de células endoteliais (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995, 2005). Embora não seja um mecanismo totalmente elucidado, o transporte axonal retrogrado é discutido como possibilidade de infecção do SNC por doenças virais (RACANIELLO, 2006).

O processo de desmielinização por infecção pelo CDV ocorre através de diferentes mecanismos, estando presente em todas as fases da doença. Na fase aguda o processo de desmielinização é induzido pelo vírus, resultando em acúmulo de antígenos no SNC causando vacuolização da substância branca e edema da mielina, secundário a infecção dos astrócitos (SUMMERS & APPEL, 1987;

SCHOBESBERGER et al., 2002; ULRICH et al., 2014). Embora os oligodendrócitos sejam os responsáveis pela produção da bainha de mielina, não há evidência de infecção direta dessas células pelo CDV ou de apoptose dessas (SUMMERS & APPEL, 1987; SCHOBESBERGER et al., 2002).

A desmielinização é resultado de diferentes mecanismos, como a liberação, por células da micróglia e macrófagos lesionados, de espécie reativas de oxigênio (ROS) que causa danos a mielina, liberação de matriz metaloproteinase e fator de necrose tumoral α (TNF α) (ULRICH et al., 2014). Embora não sejam observadas alterações morfológicas, um importante “down-regulation” de proteína de mielina ocorre nos oligodendrócitos (SCHOBESBERGER et al., 2002).

Em quadros crônicos, as lesões são caracterizadas por padrão inflamatório, contendo presença de leucócitos perivasculares, desmielinização difusa e, eventualmente, malácia (SCHOBESBERGER et al., 2002). Os linfócitos T estão envolvidos tanto na fase aguda quanto crônica da doença, sendo predominante a presença de CD8+ em todos os subtipos da cinomose canina, enquanto a presença de CD4+ é observada na fase crônica, promovendo inflamação (WÜSCHMANN et al., 1999; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; ULRICH et al., 2014).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE MSCs E IMUNOMODULAÇÃO

As MSCs são células progenitoras oriundas do isolamento de diferentes tecidos adultos ou fetais (MERIMI et al., 2021). São chamadas de multipotentes devido a sua habilidade de diferenciação em diferentes linhagens como, osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas e células musculares (MINTEER et al., 2013; FRESE et al., 2016).

Para que uma célula seja reconhecida como MSC, alguns critérios devem ser observados *in vitro*: aderência ao plástico, potencial de diferenciação nas diferentes linhagens e apresentar morfologia fibroblastóide (MERIMI et al., 2021). Além disso as MSCs devem apresentar expressão imunofenotípica de CD105, CD73 e CD90, além de ausência de CD34, CD45, CD14 ou CD11, CD19 ou CD79, HLA-DR e MHC-II (MINTEER et al., 2013; FRESE et al., 2016; JIANG & XU, 2020; MERIMI et al., 2021).

Em estágios iniciais da inflamação as MSCs têm capacidade de promover efeito pro-inflamatório, promovendo o recrutamento, principalmente, de linfócitos T através da secreção de quimiocinas como, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1), CCL5, CXCL9 e CXCL10 (JIANG & XU, 2020). As interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), TNF α , interferon-gama (IFN- γ), participam do recrutamento e promoção da inflamação (JIANG & XU, 2020; MERIMI et al., 2021). A elevada expressão de fatores pro-inflamatórios leva a posterior secreção de fatores anti-inflamatórios como interleucina-10 (IL-10), prostaglandina E2 (PGE2), fator de transformação do crescimento β (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e indoleamina 2,3 deoxigenase (IDO), que promovem a regulação do ambiente inflamatório pela redução da proliferação de linfócitos T e promovendo a indução de Treg (KYURKCHIEV, 2014; JIANG & XU, 2020; MERIMI et al., 2021).

A utilização de MSCs promove a secreção de fatores neurotróficos como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento nervoso (NGF), aumentando a neurogênese do tecido lesionado (UCCELLI et al., 2011).

A administração de MSCs por via intravenosa, é alvo de diferentes estudos. Por ser uma fácil via de aplicação, seu potencial terapêutico, doses recomendadas, e segurança são investigados em diferentes doenças neurológicas (KARUSSIS et al., 2013). A utilização de MSCs no tratamento de doenças desmielinizantes, incluindo a cinomose, tem demonstrado resultados variados, de acordo com a fase das doenças (PINHEIRO et al., 2016; HANSMANN et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019). A administração de MSCs em fases iniciais de doenças desmielinizantes promoveu piora no quadro de desmielinização devido a estimulação e aumento de macrófagos na micróglia (PINHEIRO et al., 2016; HANSMANN et al., 2018). Porém quando utilizada em fase crônica, demonstrou potencial na redução de lesão axonal, devido ao seu potencial de imunomodulação, promovendo melhora das alterações neurológicas (HANSMANN et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019; ZHANG et al., 2022).

A transplante de MSCs por via intravenosa, embora seja uma técnica mais simples, demanda um maior volume de MSCs devido a retenção de células em pulmões, baço e fígado (PINHEIRO et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018; HANSMANN et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do transplante de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de tecido adiposo canino (cAT-MSCs) por via intravenosa em cães com sequelas neurológicas derivadas da cinomose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar clinicamente a viabilidade, segurança e eficácia do transplante intravenoso de células estromais mesenquimais alogênicas derivadas de tecido adiposo canino no tratamento das alterações neurológicas ocasionadas pela cinomose canina;
- Avaliar o escore de neurodeficiência de cães com sequelas neurológicas pré e pós transplante de cAT-MSCs por meio de exames neurológicos seriados;
- Avaliar alterações no líquido cefalorraquidiano de cães pré e pós transplante de cAT-MSCs.
- Avaliar alterações nas imagens de ressonância magnética de cães pré e pós transplante de cAT-MSCs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu/SP, processo nº 000.114. Os tutores dos animais utilizados nesta pesquisa foram informados a respeito dos procedimentos a serem realizados e assinaram um termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Seleção dos animais

Foram utilizados sete cães, sendo, seis sem raça definida e um pitbull, adultos com idade entre um e quatro anos, três machos e quatro fêmeas, faixa de peso entre 10 a 18kg, provenientes dos serviços de Moléstias Infecciosas do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP/Botucatu, Neurologia Veterinária do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP/Botucatu, e de clínicas particulares. A seleção dos animais foi feita mediante exame clínico, utilizando-se como critérios de inclusão a presença de diagnóstico molecular positivo (PCR) de urina ou LCR para cinomose, teste rápido imunocromatográfico para detecção de antígeno de pool de secreções, com presença de sinais clínicos neurológicos (ataxia, paresia, paralisia, mioclonias, convulsão), e com mínimo de 3 meses de alterações neurológicas, sem apresentar melhora do quadro neurológico com terapias anteriores e sem histórico prévio de terapia celular. Foram excluídos da seleção, animais que apresentaram alterações neurológicas sem teste positivo para cinomose, animais com teste positivo para cinomose, porém sem alterações neurológicas, animais que apresentaram evolução positiva do quadro sem tratamento específico nos três primeiros meses de evolução, animais com histórico prévio de tratamento com AT-MSCs. Durante o período do estudo, foram suspensos todos e qualquer tratamento realizados nos animais, como fisioterapia, acupuntura, e suplementação ou utilização de medicações, com exceção de terapias voltadas ao controle de crises epiléticas como fenobarbital, levetiracetam, brometo de potássio.

4.1.2 Momentos Experimentais

Momento 1 (M1) Dia 0 – Seleção dos animais com sinais clínicos neurológicos indicativos de um quadro crônico progressivo de cinomose, com exame prévio de PCR de urina positivo para o vírus da cinomose, ou teste rápido imunocromatográfico; Realização de exame físico geral, exame neurológico, hemograma e bioquímica sérica;

Momento 2 (M2) Dia 30 – Repetição de exame físico geral e exame neurológico seguido de Indução anestésica para exame de RM, seguido da coleta do LCR, e transplante das AT-MSCs de forma intravenosa na dose de 6×10^6 de

células/animal pré determinada de acordo com o peso dos animais, pelo laboratório fornecedor das células, após recuperação anestésica;

Momento 3 (M3) Dia 60 – Repetição de exame físico geral e exame neurológico após 30 dias do transplante das AT-MSCs, e uma nova sessão (2ª) de transplante por forma intravenosa;

Momento 4 (M4) Dia 90 – Repetição de exame físico geral e exame neurológico após 30 dias do transplante das AT-MSCs, uma nova sessão (3ª) de transplante por forma intravenosa, e coleta de sangue para hemograma e bioquímica sérica;

Momento 5 (M5) Dia 120 – Após 30 dias do 3º transplante, reavaliação do quadro neurológico, novo exame de RM e nova coleta de LCR;

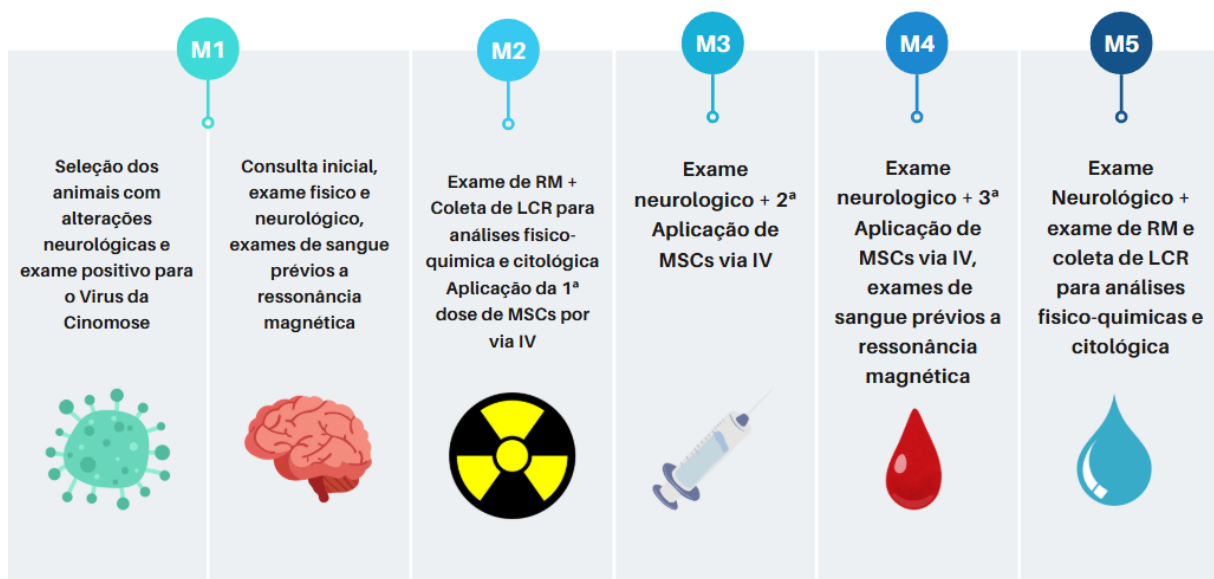


Figura 2. Momentos Experimentais: Exame de ressonância magnética (RM); Coleta e análises físico-químicas e citológica de líquido cefalorraquidiano (LCR); Transplante de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino (cAT-MSCs) por via intravenosa (IV).

4.2 PREPARAÇÃO DAS cAT-MSCs

As CAT-MSCs utilizadas neste estudo foram provenientes do laboratório Ourofino Saúde Animal, sob patente NeoStem®. As células foram armazenadas em -196°C em nitrogênio líquido passando por procedimento de preparação das células para transplante, utilizando kit de descongelamento fornecido pela própria empresa. O kit contém 3 tubos falcons, sendo um preenchido por 3 ml de meio de cultivo celular,

identificado como solução de descongelamento, e dois tubos contendo 3 ml de solução salina tamponada com fosfato (DPBS) identificados como solução de lavagem 1 e 2 (Figura 3). Os criotubos contendo as células foram descongelados em banho-maria a 37°C durante 2 minutos (Figura 3), seguido da transferência imediata do conteúdo dos criotubos a um tubo falcon de descongelamento, sendo homogeneizado todo o conteúdo do tubo, e centrifugado a 1200 RPM durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a solução de lavagem adicionada para ressuspensão do precipitado celular, homogeneizando todo o conteúdo novamente, e submetido a nova centrifugação, totalizando 2 lavagens (Figura 3). Após a lavagem, o conteúdo precipitado foi preparado em soro fisiológico para aplicação nos animais do estudo.



Figura 3. Preparação das cAT-MSCs. A. Separação de seringa, agulha, solução fisiológica e pipetas do kit NeoStem. B. Criotubos contendo 2 milhões de células cada, kit NeoStem com solução de descongelamento e soluções de lavagem. C. Descongelamento das cAT-MSCs em banho maria e aquecimento das soluções. D. Comparação de tubo contendo cAT-MSCs ressuspensas (esquerda, tubo turvo) em solução de lavagem, solução de lavagem sem células (direita, translúcido). (FMVZ – UNESP Botucatu, Serviço de Neurologia)

4.3 TRANSPLANTE INTRAVENOSO DE cAT-MSCs

Os transplantes de cAT-MSCs foram realizados por via intravenosa, de forma lenta, respeitando as orientações do fabricante, sendo utilizado o volume de ressuspensão para aplicação de 2,5ml de solução fisiológica e quantidade de células de 6×10^6 devido à faixa de peso dos animais estarem em 9 a 20 Kg, sendo pré

determinada a dose de acordo com recomendações do fabricante (Laboratório OuroFino, produto NeoStem®). O procedimento foi realizado três vezes, em 30, 60, 90 dias dos atendimentos.

4.4 ANAMNESE E EXAME FÍSICO GERAL

Foi realizada anamnese dos animais no momento M1, sendo coletadas informações sobre o estado de saúde geral dos animais, início da doença, e possíveis alterações que tiveram ao longo do tempo, como, alterações gastrointestinais, oculares, nasais, tegumentares previamente as alterações neurológicas. Durante o exame físico foram registradas as seguintes informações: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, coloração das mucosas, tempo de preenchimento capilar, palpação dos linfonodos, pulso femoral, grau de hidratação, alterações tegumentares como hiperqueratose de coxins e focinho.

4.5 EXAME NEUROLÓGICO

A avaliação neurológica foi realizada pré-transplante das cAT-MSCs e repetida antes de cada sessão com intervalo de 30 dias, nos dias de atendimento 0, 30, 60, 90 e 120.

Para tanto, foi utilizada a escala de neurodeficiência desenvolvida por BALDOTTO, (2019) (Quadro 1), e adaptada de acordo com as necessidades do projeto. Para acompanhamento da evolução das sequelas neurológicas, foram avaliados o estado mental (nível de consciência), comportamento, postura e coordenação da cabeça e do tronco, marcha, nervos cranianos, reações posturais, propriocepção, reflexos espinhais segmentares, reflexo cutâneo do tronco, nocicepção e palpação epaxial.

Para classificação de forma objetiva a escala utiliza uma pontuação de 0 a 4 de acordo com a severidade dos sinais neurológicos apresentados. Aos animais com exame neurológico normal, era atribuída a nota 0, animais com déficits leves a nota 1, com déficits moderados a nota 2, com déficits graves a nota 3 e muito graves a nota 4.

QUADRO 1. Escala de Neurodeficiência

FUNÇÃO E SINAIS CLÍNICOS	PONTUAÇÃO	TOTAL
1. ESTADO MENTAL		
Sem alteração	0	
Deprimido	1	
Delírio/desorientação	2	
Semicomatoso	3	
Comatoso	4	
1.1 COMPORTAMENTO		
Comportamento normal	0	
Comportamento anormal	2	
2. CRISES EPILÉPTICAS		
Ausente	0	
Focais	1	
Generalizadas ou focais com generalização	2	
Seriadas	3	
Status Epilepticus	4	
3. POSTURA DA CABEÇA E CORPO		
Normal	0	
Inclinação da Cabeça	1	
Desvio da Cabeça	1	
Pleurotótono	2	
Opistótono	2	
Postura de Schiff-sherrington	2	
Rigidez de descerebelação	3	
Rigidez de descerebração	4	
4. MARCHA		
Normal	0	
Hemi/paraparesia deambulatória; monoparesia	1	
Hemi/paraparesia não deambulatória; tetraparesia ambulatoria ou monoplegia	2	
Hemi/paraplegia ou tetraparesia não deambulatória	3	
Tetraplegia	4	
Sem ataxia	0	
Ataxia leve (hemi/para/mono)	1	
Ataxia moderada (hemi/para/mono) e tetrataxia leve	2	
Ataxia grave (hemi/para/mono) e tetrataxia moderada	3	
Tetrataxia grave	4	
5. NERVOS CRANIANOS		
Normal	0	
Lesão em NC II ou III	Unil. 1 Bil. 2	
Lesão em NC IV ou V	Unil. 2 Bil. 3	
Lesão em NC VI - XII	Unil. 3 Bil. 4	
6. FUNÇÃO CEREBELAR		
Normal	0	

Ampla base	1	
Dismetria	2	
Tremor de intenção	3	
7. REFLEXOS SEGMENTARES E TÔNUS MUSCULAR		
Normais com marcha normal	0	
Normais com marcha alterada	1	
Diminuído em membros torácicos e/ou pélvicos	2	
Aumentados em membros torácicos e/ou pélvicos	2	
Ausente em membros torácicos e/ou pélvicos	3	
Perineal diminuído/ausente	2	
Tônus Normal	0	
Tônus Diminuído	1	
Tônus Aumentado	2	
8. NOCICEPÇÃO		
Normal	0	
Sensibilidade Superficial Diminuída (hemi/para/mono/tetra)	1	
Sensibilidade Superficial Ausente (hemi/para/mono/tetra)	2	
Sensibilidade Profunda Diminuída (hemi/para/mono/tetra)	3	
Sensibilidade Profunda Ausente (hemi/para/mono/tetra)	4	
Alodinia	1	
9. FUNÇÃO URINÁRIA		
Normal	0	
Incontinência/retenção urinária intermitente	1	
Incontinência/retenção urinária constante (compressão vesical)	2	
Incontinência/retenção urinária com necessidade de cateterização permanente	3	
10. DISTÚRBIOS DO MOVIMENTO		
Normal	0	
Movimentos involuntários leves	1	
Movimentos involuntários moderados	2	
Movimentos involuntários graves	3	
11. PROPRIOCEPÇÃO		
Propriocepção Normal	0	
Propriocepção Diminuída em MP	1	
Propriocepção Ausente em MP/Diminuída 4 membros	2/3	
Propriocepção Ausente nos 4 membros	4	
12. OUTROS		
Movimento de Cauda presente	0	
Movimento de Cauda Diminuído	1	
Movimento de Cauda Ausente	2	
Atrofia Muscular Leve	1	
Atrofia Muscular Severa	2	
Somatória:		0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

No início e no final do tratamento, foi realizada uma triagem laboratorial, incluindo hemograma, realizado em contador eletrônico (Cell Tack – Nihon Kodhen®) com conferência em lâmina e exame diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo, além de exames bioquímicos para dosagens séricas de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), proteína total e albumina, realizados em equipamento de bioquímica automatizado (BS-200 – Mindray®).

4.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (RM)

Previamente ao exame de ressonância magnética foram realizadas, medicação pré anestésica com midazolam (0,1 – 0,3 mg/kg) intramuscular, seguido de indução anestésica com propofol (3 – 5 mg/kg) via intravenosa, intubação endotraqueal e manutenção com isoflurano, realizando o posicionamento para continuidade do exame.

As imagens de ressonância magnética foram realizadas nas regiões de encéfalo e/ou medula espinhal, de acordo com localização da lesão com base no exame neurológico de cada animal nos momentos M2 – Dia 30 (dia do primeiro transplante) e M5 – Dia 120 (30 dias após o terceiro transplante).

As RM foram em tempos ponderados em T1 e T2 e na sequência de inversão-recuperação atenuante de fluido (*Fluid Attenuated Inversion Recovery* - FLAIR), com a administração de contraste. Obtendo as imagens em cortes dorsal, sagital e transversal, em um equipamento aberto de baixo campo (Vet-MR Grande, 0.25 Tesla, Esaote, Itália) As imagens foram analisadas em um sistema de imagem digital médica (PACS, Synapse, Fuji Medical System, Tóquio, Japão).

4.8 COLETA E ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

Após o exame de RM nos dias 30 e 120, sob permanência do protocolo anestésico individual de cada paciente, foi instituída a coleta do LCR. Para a coleta foi realizada a palpação da região atranto-occipital para a localização da cisterna-magna, em seguida, realizada ampla tricotomia em região atlanto-occipital utilizando uma

máquina tosadora elétrica, seguida de antissepsia copiosa com solução de clorexidina degermante a 2%, seguida de solução de clorexidina alcoólica a 0,5% no local a ser realizada a coleta. Para a coleta de LCR através da cisterna magna, foram utilizadas agulhas hipodérmicas ou catéteres de tamanho variado de acordo com cada animal, após a introdução da agulha, o LCR foi coletado por gotejamento em 3 tubos secos diferentes, devidamente identificados com os números 1, 2, 3 para posterior análise físico-química, e tubo eppendorf para armazenamento. O volume coletado foi de 1ml a cada 5kg de peso vivo, por animal. O LCR foi submetido a análise físico-química e citológica, imediatamente após a coleta, no laboratório Clínico Veterinário da FMVZ-UNESP Botucatu, sendo avaliados os seguintes parâmetros: aspecto, cor, densidade, pH, coagulação, proteína total, globulinas (teste de Pandy), glicose, contagem global e contagem diferencial de células. Uma vez obtidos, os dados foram tabulados para análise.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis da soma do escore de neurodeficiência foram distribuídas nos momentos M1 (0 dias), M2 (30 dias), M3 (60 dias), M4 (90 dias) e M5 (120 dias), apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk), e poder de teste 1,00. Foi utilizada a análise de medidas repetidas de uma via entre os momentos ($P < 0,05$) com a somatória dos escores da escala de neurodeficiência. Para a comparação das médias foi realizado o teste de Tukey ($P < 0,05$). Foi utilizado o software sigmastat 3.5.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA GERAL

Na avaliação do estado clínico geral dos animais, tanto no dia 0 como nos momentos experimentais subsequentes (30, 60, 90 e 120 dias), os parâmetros aferidos (temperatura corporal, coloração das mucosas, tempo de preenchimento capilar, palpação de linfonodos, grau de hidratação, frequência cardíaca e respiratória) estavam dentro dos valores normais para a espécie. Animais que apresentaram hiperqueratose de coxim no dia 0 demonstraram melhora, principalmente, nos dias 90 e 120 após o terceiro transplante de cAT-MSCs (Figuras 4 e 5) e aos que

apresentaram hiperqueratose de focinho a melhora também foi notada gradualmente entre cada sessão de transplante das cAT-MSCs (Figura 6).

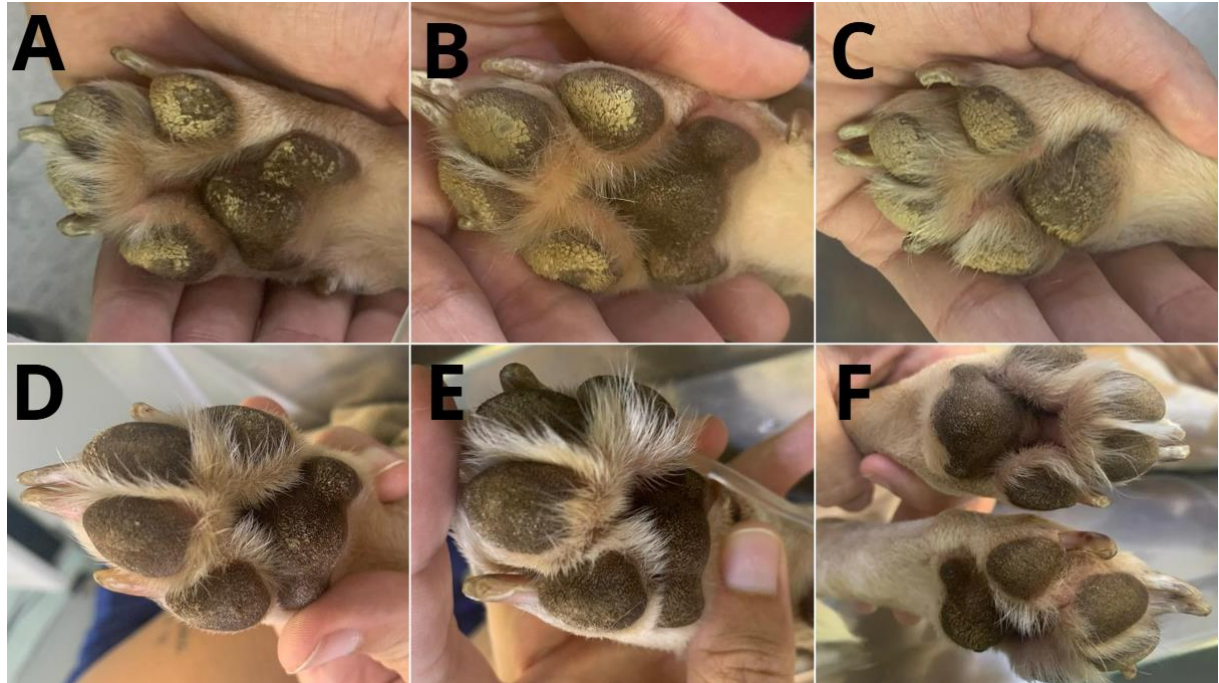


Figura 4. Animal 2 apresentando hiperqueratose dos coxins em momento M3 e melhora significativa em momento M4. A e B. Coxins palmares com hiperqueratose em M3. C. Coxim plantar apresentando hiperqueratose em M3. D e E. Coxins palmares com melhora da hiperqueratose em M4. F. Coxins plantares com melhora da hiperqueratose em M4. (FMVZ – UNESP Botucatu, Serviço de Neurologia)

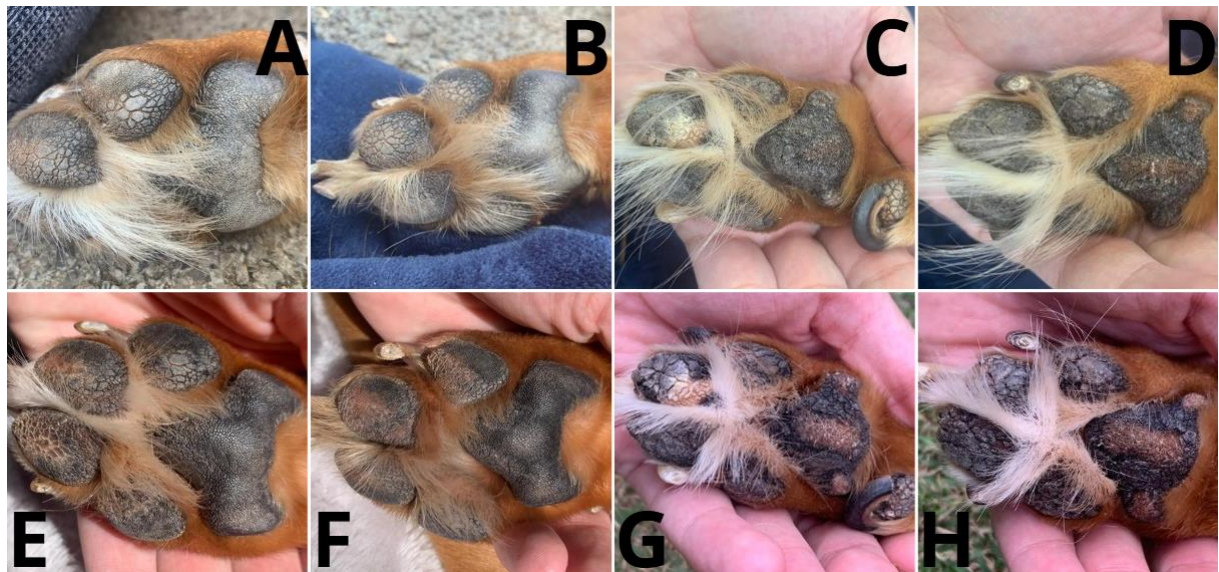


Figura 5. Animal 3 apresentando hiperqueratose dos coxins em momento M4 e melhora discreta em momento M5. A e B. Coxins palmares com hiperqueratose em M4. C e D. Coxins plantares apresentando hiperqueratose em M4. E e F. Coxins palmares com melhora da hiperqueratose em M5. G e H. Coxins plantares apresentando descamação do quadro de hiperqueratose M5. (FMVZ – UNESP Botucatu, Serviço de Neurologia)

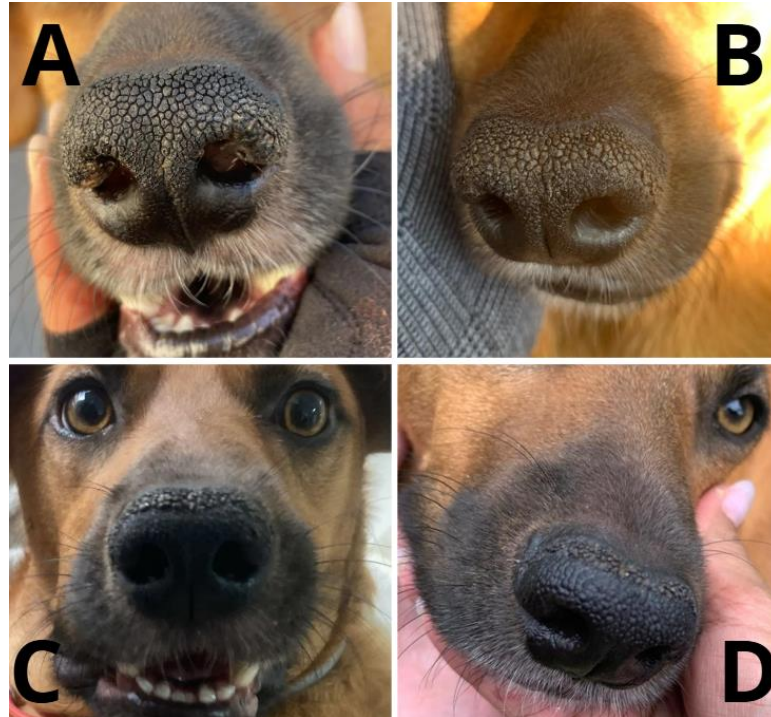


Figura 6. Animal 3 apresentando hiperqueratose de focinho com melhora gradual a cada tratamento com cAT-MSCs. A. Focinho do animal em M2. B. Focinho em M3. C. Focinho em M4 nota-se mudança na porção rostral do focinho com troca do tecido. D. Focinho em M5 com uma pequena camada de tecido com hiperqueratose com quase melhora total. (FMVZ – UNESP Botucatu, Serviço de Neurologia)

5.2 EXAME NEUROLÓGICO

A avaliação neurológica foi realizada previamente nos dias (0, 30, 60, 90 e 120) com intervalos de 30 dias, sendo as alterações neurológicas pontuadas de acordo com a escala de neurodeficiência (Figura 7).

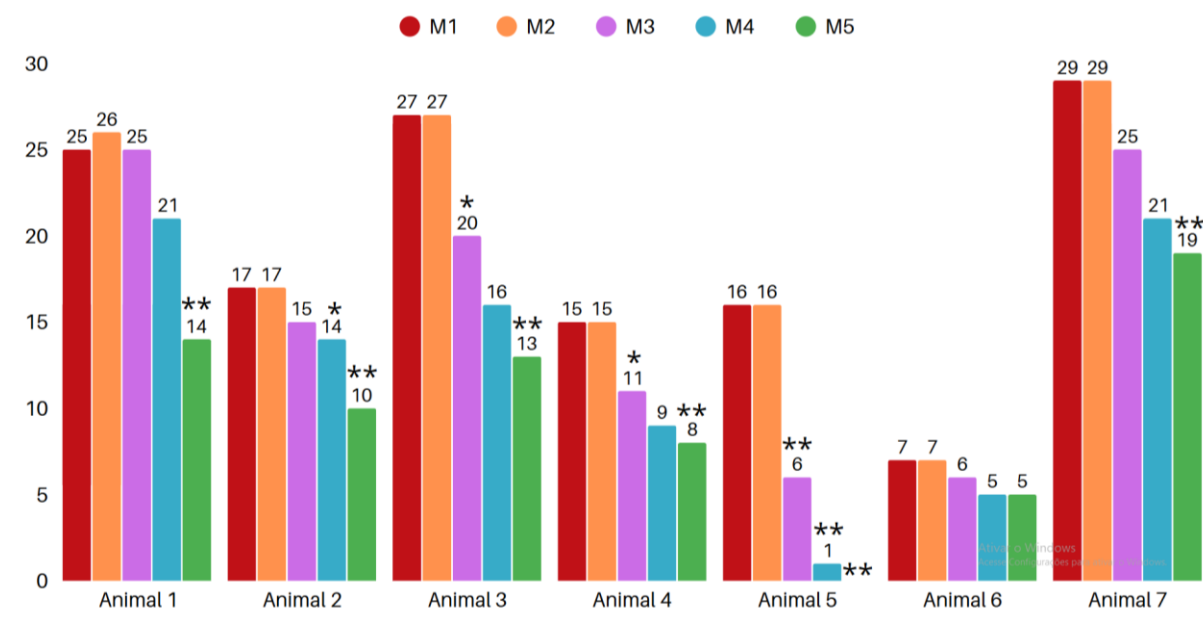


Figura 7. Escore de neurodeficiência nos momentos 0 dias (M1), 30 dias (M2), 60 dias (M3), 90 dias (M4), 120 dias (M5). O número em cima das barras representa a pontuação de cada animal no experimento em diferentes momentos experimentais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

O acompanhamento dos animais foi realizado de forma mensal com intervalos de 30 dias entre cada visita ao hospital veterinário. A avaliação neurológica foi realizada a partir da semiologia do sistema nervoso para realização da neurolocalização, sendo esta fundamental para a localização da lesão e direcionamento do local avaliado no exame de ressonância magnética.

No exame neurológico foram avaliados estado mental, comportamento, postura, coordenação da cabeça e do tronco, nervos cranianos, marcha, reações posturais, propriocepção, reflexos espinhais segmentares, nocicepção e palpação epaxial. Além destes, parâmetros como função da vesícula urinária, presença de alterações cerebelares (ampla base de sustentação, dismetrias, tremores de intenção), presença e intensidade de mioclonias, atrofia muscular, movimento da cauda e presença de crises epiléticas foram considerados para a pontuação na escala de neurodeficiência.

Nenhum animal apresentou alterações de consciência, comportamento ou dor em palpação epaxial. Entre os dias 0 (M1) e dia 30 (M2), não foram observadas diferenças significativas dos escores de neurodeficiência. Segue a relação de alterações de cada animal em relação do dia 0 (M1) ao dia 120 (M5).

A informação relacionada a peso, idade, sexo e raça de cada animal se encontra no (Apêndice 1).

Animal 1: No momento inicial (dia 0), o animal apresentava estado de consciência preservado e comportamento normal, embora em decúbito lateral contínuo devido a tetraparesia não deambulatória, sem tentativa de locomoção. A avaliação neurológica revelou ausência da reação à ameaça no olho esquerdo, associada à diminuição do reflexo palpebral e da sensibilidade nasal ipsilateral, sem sinais de comprometimento cerebelar.

Foram observados déficits proprioceptivos em todos os membros, hipertonia generalizada e discreta atrofia muscular dos membros pélvicos. A nocicepção estava preservada, assim como o movimento da cauda e a função urinária. No entanto, apresentava mioclonias intensas nos quatro membros, com contraturas acentuadas nas falanges.

No segundo momento (30 dias), observou-se piora no escore neurológico em função da progressão da atrofia muscular dos membros pélvicos, que passou de discreta a severa.

No terceiro momento (60 dias), após o segundo transplante de cAT-MSCs, foi evidenciada discreta melhora funcional, com início de movimentação de arraste por meio dos membros torácicos.

Aos 90 dias (M4), houve redução na intensidade das mioclonias (de intensa para moderada), diminuição do tônus muscular espástico e melhora da mobilidade torácica, permitindo ao animal sustentar-se brevemente, embora ainda apresentasse paraparesia não deambulatória, com limitação em realizar mais de dez passos consecutivos.

No momento final da avaliação (120 dias), observou-se melhora clínica significativa, com maior independência locomotora utilizando os membros torácicos e redução progressiva das mioclonias, embora ainda presentes em baixa intensidade. Houve recuperação do reflexo palpebral e da sensibilidade nasal, mantendo-se, entretanto, a ausência da reação à ameaça no olho esquerdo. A atrofia severa dos membros pélvicos persistiu durante todo o acompanhamento, assim como as

contraturas nas extremidades dos membros torácicos e pélvicos, que não apresentaram regressão.

Animal 2: Na avaliação inicial (M1 – dia 0), o animal apresentava estado mental alerta, sem alterações comportamentais, e posicionamento da cabeça compatível com a normalidade. Observou-se tetraparesia espástica não deambulatória, com permanência em decúbito lateral e incapacidade de realizar mudanças posturais. O exame neurológico revelou redução da resposta à ameaça no olho direito e discreta anisocoria, com tendência à midríase ipsilateral, embora com resposta preservada ao reflexo fotomotor direto. Tremores de intenção eram evidentes durante a alimentação. A propriocepção estava ausente em todos os membros, a nocicepção e a mobilidade caudal estavam preservadas. Os reflexos espinhais estavam exacerbados, com presença de reflexo extensor cruzado.

Na reavaliação do M2 (dia 30), não foram observadas alterações clínicas significativas.

No M3 (dia 60), trinta dias após o primeiro transplante intravenoso de cAT-MSCs, foi observada resolução da anisocoria, discreta atenuação dos tremores de intenção e melhora no tônus dos membros pélvicos, embora os reflexos permanecessem aumentados.

No M4 (dia 90), os tremores de intenção deixaram de ser observados. Verificou-se melhora marcante do tônus do membro torácico esquerdo, aproximando-se da normalidade, e surgimento discreto de atrofia muscular nos membros pélvicos.

Na avaliação final (M5 – dia 120), o tônus do membro torácico direito também apresentou melhora significativa. Com isso, o animal passou a manter-se em decúbito esternal, conseguiu realizar mudanças de decúbito de forma autônoma e demonstrou capacidade de arraste utilizando os membros torácicos. Movimentos voluntários dos membros pélvicos foram observados, favorecendo a estabilização da atrofia muscular previamente notada. Os reflexos espinhais permaneceram aumentados ao longo de todas as avaliações.

Animal 3: Na avaliação inicial (M1 – dia 0), o animal apresentava estado de consciência alerta, comportamento preservado e posicionamento cefálico compatível com a normalidade. Foi observada tetraparesia não deambulatória, com redução da

propriocepção nos membros torácicos e ausência nos membros pélvicos. Os reflexos segmentares estavam dentro dos parâmetros esperados, exceto pelo reflexo flexor dos membros pélvicos, que se encontrava diminuído. Havia atrofia muscular significativa nos membros pélvicos, associada à redução de tônus, além de atrofia bilateral dos músculos temporais. A movimentação caudal estava ausente, e observou-se mioclonias moderadas na musculatura do masseter, com movimentos repetitivos de mastigação. O animal não conseguia manter-se em decúbito esternal sem auxílio e apresentava retenção urinária, com micção apenas mediante sondagem uretral, sendo a expressão manual da bexiga ineficaz. A nocicepção profunda encontrava-se diminuída em todos os membros.

No M2 (dia 30), não foram observadas alterações significativas na avaliação neurológica.

No M3 (dia 60), trinta dias após o primeiro transplante intravenoso de cAT-MSCs, o animal passou a permanecer em decúbito esternal por períodos prolongados sem suporte. Houve início de movimentação dos membros torácicos, com tentativa de arraste. As mioclonias de masseter persistiam, embora com melhora da atrofia temporal. O tônus dos membros pélvicos aumentou, aproximando-se da normalidade. A propriocepção dos membros torácicos normalizou-se, mantendo-se ausente nos pélvicos. A movimentação caudal passou a ser discretamente observada mediante estímulo nociceptivo. A função urinária evoluiu positivamente, sendo possível a expressão vesical manual.

No M4 (dia 90), observou-se melhora acentuada da atrofia temporal e aumento da força nos membros torácicos, permitindo locomoção com apoio da região pélvica. As mioclonias tornaram-se discretas.

Na avaliação final (M5 – dia 120), o animal demonstrava locomoção com apoio nos membros torácicos e capacidade de mudança autônoma de decúbito. A micção foi restabelecida, com esvaziamento vesical espontâneo, dispensando manobras de sondagem ou compressão. A nocicepção profunda permaneceu inalterada ao longo de todo o período de acompanhamento.

Animal 4: No momento M1 (dia 0), o animal apresentava estado de consciência alerta, comportamento preservado e posição da cabeça alterada, com desvio lateral (head-turn) para a direita em relação ao eixo corporal. Observou-se estrabismo

ventrolateral à direita, enquanto os demais reflexos de nervos cranianos estavam dentro dos padrões de normalidade. Apresentava paraparesia não deambulatória, com mioclonias intensas nos membros pélvicos, mais acentuadas à esquerda, associadas à contratura muscular. A propriocepção estava ausente nos membros pélvicos e preservada nos torácicos. Foi identificada ataxia propioceptiva, com reflexos segmentares e nocicepção preservados. Os reflexos perineal e bulbo-cavernoso estavam presentes, e observou-se retração prepucial com exposição da glândula em decorrência das mioclonias. O tônus da cauda e o reflexo cutâneo do tronco estavam presentes, com função urinária e evacuatória normais.

No momento M2 (dia 30), o escore de neurodeficiência manteve-se inalterado.

Em M3 (dia 60), observou-se melhora na posição da cabeça, com resolução do head-turn. O estrabismo previamente identificado também regrediu. As mioclonias em membros pélvicos reduziram-se para intensidade moderada. Houve melhora na mobilidade do membro pélvico direito, com tentativas de apoio, embora a propriocepção permanecesse ausente. O animal evoluiu para paraparesia deambulatória.

No momento M4 (dia 90), observou-se melhora da marcha, com apoio efetivo do membro pélvico direito, ainda com déficit propioceptivo. Houve redução da atrofia muscular em membros pélvicos, embora as mioclonias persistissem em intensidade moderada.

Por fim, em M5 (dia 120), as mioclonias dos membros pélvicos mantiveram-se com intensidade moderada. A ataxia propioceptiva apresentou discreta melhora, porém ainda estava presente, e a propriocepção seguia ausente. O membro pélvico esquerdo manteve contratura muscular importante, permanecendo sem apoio funcional.

Animal 5: No momento M1 (dia 0), o animal apresentava tetraparesia não deambulatória, com déficit propioceptivo em todos os membros: ausente no membro torácico esquerdo e em ambos os membros pélvicos, e diminuído no membro torácico direito. O exame de nervos cranianos não revelou alterações. Observou-se tremor de intenção associado à movimentação cefálica. Os reflexos segmentares estavam dentro dos padrões de normalidade, com aumento do tônus muscular em todos os membros. A atrofia muscular era discreta.

Em M2 (dia 30), não foram observadas alterações no exame neurológico em relação à avaliação anterior.

No momento M3 (dia 60), verificou-se normalização do tônus muscular e evolução clínica para paraparesia deambulatória. O déficit proprioceptivo restringiu-se ao membro pélvico esquerdo, com diminuição da resposta, enquanto os demais membros apresentavam propriocepção preservada. A marcha era ataxica, com paresia intermitente dos membros, resultando em quedas ocasionais. O tremor de intenção não foi mais observado.

Em M4 (dia 90), a marcha estava normalizada, sem evidência de paresia ou ataxia, e a propriocepção estava íntegra nos quatro membros. A única alteração persistente era a atrofia muscular em membros pélvicos.

Na avaliação final (M5, dia 120), observou-se melhora da atrofia muscular nos membros pélvicos e manutenção do exame neurológico sem alterações.

Animal 6: No momento M1 (dia 0), o animal apresentava paraparesia deambulatória dos membros pélvicos, associada a mioclonias intensas e ataxia moderada. O exame dos nervos cranianos não revelou alterações. A propriocepção estava preservada, sem evidência de atrofia muscular. Os reflexos segmentares encontravam-se dentro dos limites de normalidade.

Em M2 (dia 30), não foram observadas mudanças no exame neurológico em comparação à avaliação inicial.

No momento M3 (dia 60), foi identificada discreta melhora da ataxia durante a marcha, embora as mioclonias permanecessem intensas.

Em M4 (dia 90), observou-se redução na intensidade das mioclonias, que passaram a ser classificadas como moderadas.

Na avaliação final (M5, dia 120), o quadro clínico manteve-se estável, com paraparesia deambulatória, ataxia discreta e mioclonias de intensidade moderada.

Animal 7: No momento M1 (dia 0), o animal encontrava-se em decúbito lateral, apresentando tetraplegia. Observou-se aumento do tônus muscular nos membros torácicos e redução nos membros pélvicos. A sensibilidade superficial estava diminuída em membros torácicos, e a nocicepção profunda ausente nos membros

pélvicos. Reflexos flexores estavam diminuídos em todos os membros; o reflexo patelar estava diminuído no membro pélvico direito e normal no esquerdo. Foi observada disfonia, retenção urinária com necessidade de esvaziamento manual da bexiga, ausência de propriocepção nos quatro membros, reflexo cutâneo do tronco ausente em todo o segmento, atrofia muscular generalizada e redução dos movimentos da cauda.

Em M2 (dia 30), o exame neurológico permaneceu inalterado em relação à avaliação inicial.

No momento M3 (dia 60), o animal permaneceu em decúbito lateral, mas apresentou melhora na movimentação da cauda e na função miccional, sendo possível o esvaziamento com leve compressão vesical. Também foi observada discreta melhora da disfonia e retorno da sensibilidade superficial nos membros torácicos.

Aos 90 dias (M4), houve oscilação na fonia, alternando entre normalidade e rouquidão. O animal foi capaz de manter-se em decúbito esternal. A espasticidade persistiu no membro torácico direito, e observou-se retorno do reflexo cutâneo do tronco.

Na avaliação final, em M5 (dia 120), a fonia normalizou-se. Houve retorno da nocicepção profunda nos membros pélvicos. O animal permaneceu tetraparético não deambulatório, com espasticidade persistente no membro torácico direito.

Através da somatória dos escores da escala de neurodeficiência foi realizada a análise de medidas repetidas no tempo, contendo média e desviopadrão de cada momento experimental (Tabela 1). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos escores de neurodeficiência dos cães (n=7) submetidos ao transplante com células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino (cAT-MSCs), avaliados nos momentos, M1 (0 dias), M2 (30 dias), M3 (60 dias), M4 (90 dias) e M5 (120 dias).

Momento	Média ± Desvio Padrão
M1	20,0 ± 7,5 ^{ab}
M2	20,1 ± 7,6 ^a
M3	16,4 ± 8,0 ^{bc}
M4	12,8 ± 7,2 ^{cd}
M5	9,8 ± 6,2 ^d

*Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatística significativas entre momento pelo teste de Tukey (P < 0,05)

Ao analisar cada momento experimental, observou-se que não há diferença significativa entre os momentos M1 (0 dias) e M2 (30 dias). No entanto, ao comparar o momento M1 (0 dias) com os momentos M3 (60 dias), M4 (90 dias) e M5 (120 dias), foram observadas diferenças significativas, demonstrando uma redução no escore de neurodeficiência ao longo do tempo.

A maior redução foi observada entre o momento 0 e o momento 120, com uma redução de 51% no escore de neurodeficiência, o que indica uma diminuição substancial na gravidade das lesões ao longo do experimento.

Entre os momentos 60 e 90, não foi observada diferença significativa, indicando que o escore de neurodeficiência se manteve relativamente constante entre esses dois tempos. No entanto, a comparação entre os momentos 60 e 120 apresentou diferença significativa, indicando uma redução do escore entre esses dois momentos.

A análise individual dos escores de neurodeficiência (figura 7) demonstrou que todos os cães avaliados apresentaram melhora ao longo do tempo, entre os momentos M1 (inicial) e M5 (120 dias após o transplante). O Animal 5 apresentou a maior redução percentual, com melhora de 93,75%. Os Animais 3, 4 e 1 também exibiram reduções expressivas, com 51,85%, 46,67% e 44,00% de melhora, respectivamente. O Animal 2 apresentou uma melhora de 41,18%, enquanto os Animais 7 e 6 demonstraram as menores reduções, com 34,48% e 28,57%,

respectivamente. Apesar da variação interindividual, todos os animais mostraram resposta positiva ao tratamento.

5.3 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Os resultados do eritrograma e plaquetograma (Apêndice 2) dos 7 animais inclusos no estudo apresentaram-se dentro dos parâmetros de normalidade antes do transplante das cAT-MSCs (M1 – 0 dias) e após o transplante (M4 – 90 dias). 6 dos 7 animais apresentaram linfopenia no leucograma, dos 6, 3 normalizaram a linfopenia no momento M4 e 3 permaneceram com linfopenia, embora discreta melhora nos valores em comparação ao momento pré transplante. Os valores albumina, proteína total, GGT, FA, ALT, creatinina, ureia e globulina da bioquímica sérica não apresentaram alterações significativas ao estudo.

5.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

As imagens de RM foram realizadas de acordo com a neurolocalização da lesão de cada animal. Nos sete animais do estudo, foram realizadas RM do encéfalo ou medula espinhal, de acordo com a neurolocalização das lesões de cada animal, no momento M2, sendo repetidas no momento M5 no mesmo segmento avaliado anteriormente. Dos sete animais, quatro não apresentarem alterações na imagem de RM no segmento avaliado.

No animal 5 (Figura 8), no M2 (30 dias) foram observadas discretas lesões intramedulares focais amorfas mal definidas, hiperintensas em T2 e FLAIR e isointensas em T1 ao nível de vertebrae C3 a C5, sem realce pós contraste. Seu exame de ressonância magnética e coleta de líquido cefalorraquidiano precisou ser adiado, devido a prenhez do animal, os exames até o presente momento ainda não foram realizados.

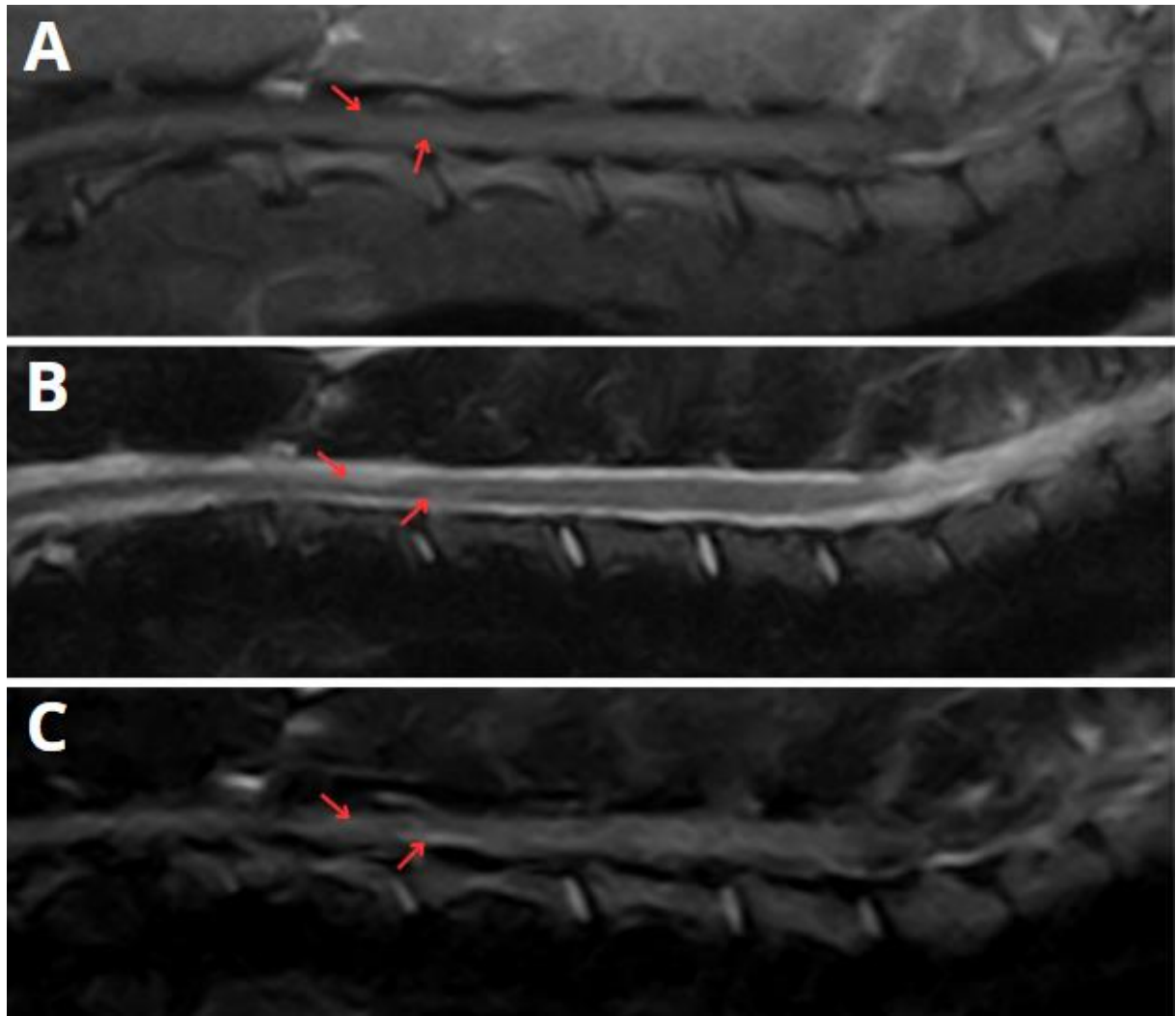


Figura 8. Ressonância magnética de medula espinhal cervical do animal 5 em momento M2 antes do transplante de cAT-MSCs. A. Tempo ponderado em T1. B. Tempo ponderado em T2. C. FLAIR. Setas vermelhas. Lesões intramedulares. (FMVZ – UNESP Botucatu, Serviço de Neurologia)

No animal 7 (Figura 9), no M2 (30 dias) foram observadas múltiplas áreas focais amorfas mal definidas, hiperintensas em T2 e FLAIR e isointensas em T1 ao de toda a medula espinhal, sendo as lesões maiores e mais delimitadas medindo em trono de 0,94 cm x 0,48 cm x 0,5 cm e 1,2 cm x 0,49 cm x 0,5 cm. Localizadas no nível de vertebrae C2 a C5 respectivamente, sem realce pós contraste.

Aos 120 dias (M5) foram observadas persistência das áreas focais amorfas com discretas diferenças nas medidas de áreas para, 1,02 cm x 0,41 cm x 0,28 cm e 1,58 cm x 0,43 cm x 0,37 cm.

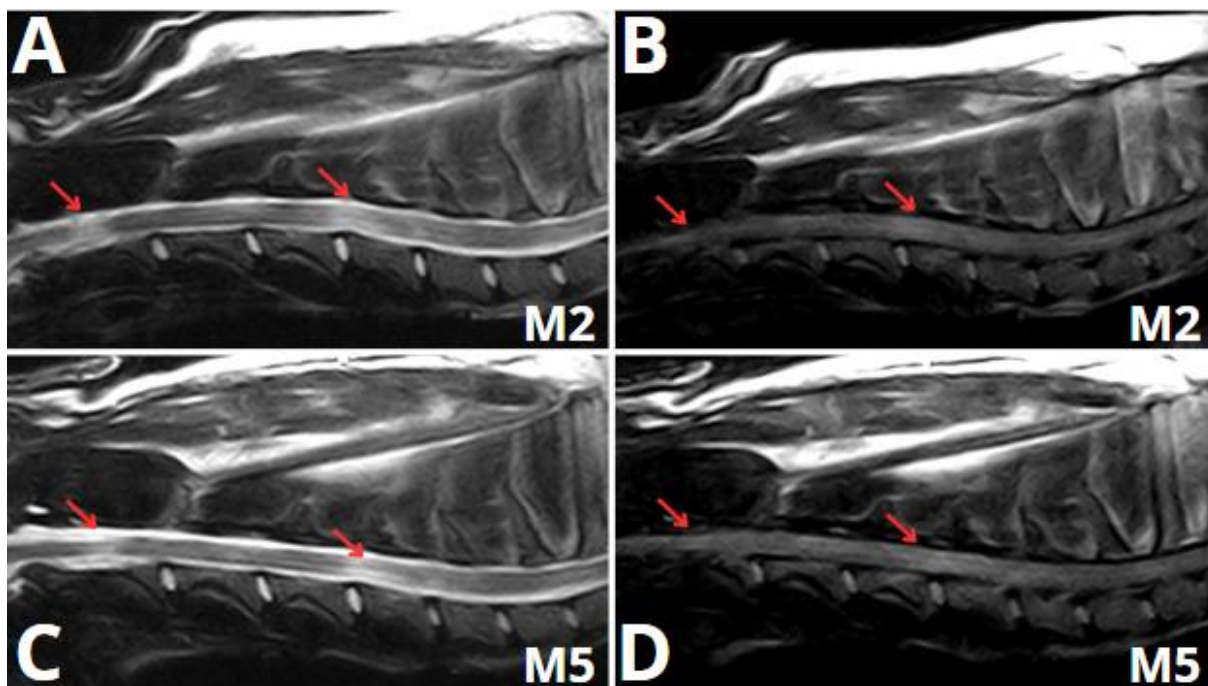


Figura 9. As imagens A e B referem-se ao momento M2 (antes do transplante com cAT-MSCs): A. Sequência ponderada em T2; B. Sequência FLAIR. As imagens C e D correspondem ao momento M5 (após os transplantes com cAT-MSCs): C. Sequência ponderada em T2; D. Sequência FLAIR. Setas vermelhas indicam lesões intramedulares. (FMVZ – UNESP Botucatu, Serviço de Neurologia)

Os achados predominantes nos animais 5 e 7 incluíram lesões hiperintensas nas sequências T2 e FLAIR na medula espinhal, indicando processos desmielinizantes e inflamatórios compatíveis com lesões neurológicas pela cinomose.

5.5 ANÁLISE DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Na análise de LCR os animais apresentaram densidade e pH dentro da normalidade. O animal 2 apresentou em M2 uma discreta pleocitose mononuclear que normalizou em M5. A presença de hiperproteínoorraquia foi observada no animal 2, 3, 4 e 7. O animal 7 foi o único a apresentar teste de pandy positivo, contendo duas cruzes (++), que posteriormente se normalizou aos 120 dias no final do tratamento (Tabela 2). A coleta dos 120 dias (M5) do animal 5 foi adiada devido a intercorrência, sendo possível apenas realizar seu exame neurológico no dia 120. O animal 3 apresentou aumento de sua hiperproteínoorraquia em M5, além de pleocitose mista, essas alterações podem ser resultado de contaminação da amostra com sangue no momento da coleta, apresentando coloração avermelhada e presença de 8.200 Hemácias/ μ L.

Tabela 2. Resultados individuais da análise de líquido cefalorraquidiano dos cães (n=7) submetidos aos transplantes com células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino, nos momentos M2 (30 dias - antes do primeiro transplante) e momento M5 (30 dias após o terceiro transplante).

		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7
Cor	M2	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Róseo	Incolor
	M5	Incolor	Incolor	Avermelhado	Incolor	NR	Incolor	Incolor
Aspecto	M2	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido
	M5	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	NR	Límpido	Límpido
Densidade	M2	1,006	1,006	1,006	1,006	1,006	1,006	1,006
	M5	1,006	1,006	1,006	1,010	NR	1,004	1,006
pH	M2	8,0	8,5	8,0	8,0	8,5	8,0	8,5
	M5	9,0	9,0	8,0	7,5	NR	8,5	8,5
Pandy	M2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	++
	M5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NR	Negativo	Negativo
Proteína (mg/dL)	M2	19,3	35,4	40,3	29,3	24,5	25,0	72,2
	M5	17,6	34,2	60,1	37	NR	23,5	63,6
Hemácias (/μL)	M2	1	<1	1.550	2	<1	1.400	<1
	M5	1	<1	8.200	35	NR	<1	79
Células (/μL)	M2	<1	9	<1	<1	<1	3	3
	M5	<1	<1	7	4	NR	2	3
Pleocitose*	M2	Ausente	Mononuclear	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	M5	Ausente	Ausente	Mista	Ausente	NR	Ausente	Ausente

NR, não realizado.

*Pleocitose considerada quando células nucleadas >5 (DI TERLIZZI & PLATT, 2009)

6. DISCUSSÃO

As sequelas neurológicas associadas à infecção pelo CDV decorrem, em grande parte, por lesões desmielinizantes induzidas por processos inflamatórios mediados pela ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ assim como liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α (ULRICH et al., 2014). A liberação de fatores anti-inflamatórios pelas MSCs contribui para a modulação do ambiente inflamatório, promovendo a redução da proliferação de linfócitos T e a indução de células Treg, que colabora atenuando o dano tecidual (KYURKCHIEV, 2014; JIANG & XU, 2020; MERIMI et al., 2021).

A seleção dos animais foi baseada nos seguintes critérios: presença de exame positivo para cinomose independente de teste rápido ou PCR, para comprovação de que o mesmo tenha passado pelo quadro de infecção pelo CDV, tempo mínimo de 3 meses de infecção e presença de sinais neurológicos para que fosse possível graduar a escala de neurodeficiência de cada animal e avaliar sua melhora a partir de cada transplante de MSCs. Este intervalo foi optado antes de admitir os animais ao projeto pois, as lesões crônicas referentes a infecção pelo CDV no SNC ocorrem entre 29 a 63 dias pós infecção (LEMPPE et al., 2014; ULRICH et al., 2014).

Alterações associadas a hiperqueratose de focinho e coxins demonstraram melhora gradual ao longo de cada transplante de cAT-MSCs. Resultado similar é observado por BALDOTTO, (2019).

A melhora dos sinais clínicos neurológicos pode estar associada a administração das cAT-MSCs. Conforme o delineamento experimental os cães estavam há pelo menos 3 meses sem evolução positiva do quadro neurológico, e ainda, pode-se observar que mesmo em um intervalo de 30 dias entre a primeira consulta e a primeira aplicação das MSCs, nenhum animal apresentou melhora esporádica do quadro. À medida que recebiam mais transplantes, a tendência foi uma melhora gradual do quadro neurológico. Resultados similares são observados em estudos realizados na fase crônica (GONÇALVES et al., 2018), fase aguda e crônica em dose única (BRITO et al., 2010; BALDOTTO, 2019).

Para uma análise objetiva e padronizada, tornou-se necessário a adoção de uma escala numérica descritiva, com o objetivo de quantificar os déficits observados na avaliação dos pacientes. Esse instrumento permitiu mensurar, de forma

sistemática, o grau de comprometimento funcional e possibilitou a comparação entre diferentes momentos de avaliação ao longo do acompanhamento clínico.

Embora essa redução tenha sido substancial, é importante notar que a variabilidade nos dados entre os indivíduos foi considerável, especialmente nos momentos iniciais (com uma média de $20,0 \pm 7,5$ no momento 0). Isso sugere que, apesar da tendência geral de melhora, a resposta ao tratamento ou condição experimentada foi heterogênea entre os animais, o que deve ser considerado ao interpretar os resultados.

Não existe uma dose padrão estabelecida nas terapias com MSCs em quadros de cinomose canina. Em nosso trabalho foram preconizadas doses pré estabelecidas pelo laboratório parceiro em relação ao peso de cada paciente. Todos os animais avaliados no estudo estavam na faixa de peso entre 9 a 20 kg, sendo a dose utilizada de 6×10^6 . As doses utilizadas em outros estudos são variadas entre $1,0 \times 10^6/\text{kg}$ (PINHEIRO et al., 2016), 10×10^6 dose única, intratecal (BALDOTTO, 2019), $5,0 \times 10^6$ a cada 15 dias (GONÇALVES et al., 2018) e entre $1,0 \times 10^8$ a $2,5 \times 10^8$ (BRITO et al., 2010). Sendo a última bem elevada em comparação a outras doses utilizadas.

Durante a viremia, a disseminação do vírus para tecidos linfoides e hematopoiéticos como baço, timo, linfonodos e medula óssea, pode resultar em quadros de linfopenia e imunossupressão (LEMPP et al., 2014). Entre as diversas alterações hematológicas observadas em cães infectados, a anemia regenerativa e a linfopenia são os achados mais consistentes e recorrentes (BATHEN-NOETHEN et al., 2008; MARTELLA et al., 2008; PINHEIRO et al., 2016; SARCHAHI et al., 2022). Em nosso estudo foram observados apenas a presença de linfopenia em alguns animais, tendo uma discreta melhora pós terapia, porém o presente estudo não foi realizado em fase de viremia.

Na análise de LCR o animal 2 apresentou alteração de pleocitose no momento M2 e o animal 3 no momento M5. O animal 2 apresentou uma pleocitose de origem mononuclear que quando comparada ao momento M5 pós tratamento normalizou. O animal 5 apresentou pleocitose de origem mista com predomínio de neutrófilos. A pleocitose de origem mononuclear é citada como achado em outros trabalhos que avaliam LCR de cães com cinomose (BATHEN-NOETHEN et al., 2008). Em estudo que avaliaram o LCR de cães com cinomose em fase ativa, a pleocitose mononuclear,

assim como a linfocítica são frequentemente observadas (FEITOSA et al., 1997; BATHEN-NOETHEN et al., 2008). A concentração de proteína dos LCR avaliados em nosso estudo não apresentaram diferença significativa entre os momentos M2 e M5. Quando comparado as concentrações de proteína da literatura nos casos de cinomose costumam ser variados, desde 30mg/dL até 360mg/dL (FEITOSA et al., 1997; BATHEN-NOETHEN et al., 2008). No animal 3 observamos um aumento na contagem de proteína do LCR assim como a presença de pleocitose, porém a contaminação por sangue deve ser considerada, sendo possível seu aumento devido a contaminação da amostra.

As principais alterações encontradas no exame de RM realizado em animais com alterações neurológicas pelo CDV são, lesões de formato ovoide, de apresentação hiperintensa em T2 e hipointensa ou isointensa em T1. Permanecem hiperintensa em FLAIR e ao utilizar contraste, pode-se observar captação nas regiões afetadas do parênquima e meninges (BATHEN-NOETHEN et al., 2008; GRIFFIN et al., 2009). Em nosso trabalho, foram observadas lesões focais amorfas de tamanho variado nos animais 5 e 7, com apresentação de hiperintensidade em T2 e FLAIR e isointensas em T1, porém sem captação de contraste. No animal 1 foi observada apenas uma discreta assimetria de ventrículos laterais. A assimetria ventricular pode ser um achado decorrente de uma prévia alteração da drenagem de fluxo do LCR na vilosidade aracnóide por anterior aumento de proteína ou celularidade do LCR durante a fase ativa da doença, levando a uma alteração do fluxo do LCR e consequente aumento ventricular (DI TERLIZZI & PLATT, 2006).

Os achados das ressonâncias magnéticas dos animais 5 e 7 podem estar associados a áreas de gliose e desmielinização, sendo frequentemente associados a hiperintensidade em T2 em animais avaliados com o histórico de cinomose (BATHEN-NOETHEN et al., 2008; GRIFFIN et al., 2009).

Este estudo apresenta limitações relevantes que devem ser consideradas na análise e interpretação dos resultados obtidos. A reduzida amostra de animais avaliados compromete a potência estatística e limita a extrapolação dos dados à população canina geral. A ausência de um grupo controle ou placebo impediu comparações diretas que poderiam reforçar a validade interna do estudo, além de potencialmente introduzir viés na avaliação da eficácia terapêutica. Adicionalmente, o delineamento do estudo não contemplou a metodologia duplo-cega, o que pode ter

influenciado a imparcialidade das observações clínicas. O período de acompanhamento prolongado, com duração total de cinco meses, constituiu um desafio operacional importante no contexto de um projeto de mestrado, dada a limitação temporal inerente à sua execução. Somaram-se a essas limitações fatores externos e imprevistos que impactaram diretamente o cronograma da pesquisa, como a interrupção temporária do funcionamento do equipamento de ressonância magnética e o consequente reagendamento de exames complementares. Apesar desses entraves metodológicos e logísticos, os achados obtidos contribuem de forma relevante para o avanço do conhecimento sobre o uso de terapias celulares em afecções neurológicas secundárias à cinomose canina, e fundamentam a necessidade de estudos futuros com delineamentos mais robustos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o transplante de cAT-MSCs por via intravenosa, é uma estratégia terapêutica segura e efetiva para o tratamento de sequelas neurológicas associadas à cinomose canina.

A análise dos parâmetros clínicos, neurológicos e laboratoriais evidenciou melhora progressiva no escore de neurodeficiência ao longo do tempo em 51% dos cães tratados, especialmente após a segunda e terceiras aplicações.

As respostas clínicas positivas foram acompanhadas por alterações significativas no exame neurológico, com destaque para a recuperação funcional da motricidade dos membros, retorno da propriocepção e nocicepção, além da retomada do controle de esfíncter. Em relação as mioclonias, não apresentou resultado satisfatório no controle das mesmas, permanecendo com pouca mudança na intensidade na maioria dos casos.

Os achados de ressonância magnética revelaram discreta redução nas áreas alteradas, sugerindo melhora parcial das lesões desmielinizantes.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o transplante intravenoso de cAT-MSCs constitui uma abordagem terapêutica viável, capaz de promover melhora clínica

e neurológica em cães com sequelas de cinomose, contribuindo para a recuperação funcional e qualidade de vida desses animais.

Para estudos futuros recomenda-se a ampliação do número amostral, a inclusão de grupo controle placebo, a extensão dos períodos de acompanhamento clínico, bem como a avaliação de diferentes dosagens e vias de transplantes como a intratecal.

REFERÊNCIAS

- ARECO, W. V. C.; TONDO, L. A. S.; AVILA, N. C.; SILVA, M.; DE FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G.; DE FLORES, M. M.; DE FLORES, E. F. Histopathological features of spinal cord lesions in dogs with distemper-associated demyelinating leukoencephalomyelitis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 189, p. 110–119, 2021.
- BALDOTTO, S. B. Efeitos da terapia com células estromais mesenquimais multipotentes em cães com encefalomyelite pelo vírus da cinomose. Botucatu, 2019. 167p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- BATHEN-NOETHEN, A.; STEIN, V.M.; PUFF, C.; BAUMGAERTNER, W.; TIPOLD, A. Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*. v. 49, n. 9, p. 460-467, 2008.
- BRAZA, F.; DIROU, S.; FOREST, V.; SAUZEAU, V.; HASSOUN, D.; CHESNÉ, J.; CHEMINANT-MULLER, M. A.; SAGAN, C.; MAGNAN, A.; LEMARCHAND, P. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells*, v. 34, n. 7, p. 1836–1845, 2016.
- BRITO, H. F. V.; SANTOS, M. R.; GILLIOLI, R.; LI, L. M.; PASSOS, L. A. C.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, F.; CORAT, M. A. F. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais*. v. 8, n. 24, p. 26-29, 2010.
- CARTY, F.; MAHON, B.P.; ENGLISH, K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents?. *Clinical & Experimental Immunology*. v. 188, n. 1, p. 1-11, 2017.
- DA FONTOURA BUDASZEWSKI, R.; VON MESSLING, V. Morbillivirus Experimental Animal Models: Measles Virus Pathogenesis Insights from Canine Distemper Virus. *Viruses*. v. 8, n. 10, p. 274, 2016.
- DI TERLIZZI, R.; PLATT S, R. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part II - analysis. *The Veterinary Journal*. v. 180, n.1, p. 15-32, 2009.
- FEITOSA, M. M.; FEITOSA, F. L. F.; KOHAYAGAWA, A.; CURTI, P. R.; MOGAMI, S. R. K. Avaliação física, citológica, conteúdo de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do liquor de cães normais e de cães com encefalite por cinomose. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 147–151, 1997.
- FREITAS, L. A.; LEME, R. A.; SAPORITI, V.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Molecular analysis of the full-length F gene of Brazilian strains of canine distemper virus shows lineage co-circulation and variability between field and vaccine strains. *Virus Research*, v. 264, p. 8–15, 2019.

FRESE, L.; DIJKMAN, P. E.; HOERSTRUP, S. P. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 43, n. 4, p. 268-274, 2016.

GIACINTI, J. A.; PEARL, D. L.; OJKIC, D.; CAMPBELL, G. D.; JARDINE, C. M. Genetic characterization of canine distemper virus from wild and domestic animal submissions to diagnostic facilities in Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 198, 2022.

GONÇALVES, D. S. V.; GOMES, M. V. S.; GUTERRA, V. L. P.; LUCCHI-RODRIGUES, A. F.; MATHIAS, C. H. T.; MAESTRI, L. F. P.; ARGÔLO-NETO, N. M.; MONTEIRO, B. S. Mesenchymal stem cell infusion for the treatment of neurological sequelae of canine distemper virus: a clinical study. *Genetics and Molecular Research*, v. 17, n. 4, p. gmr18088, 2018.

GRIFFIN, J. F.; YOUNG, B. D.; LEVINE, J. M. Imaging diagnosis—chronic canine distemper meningoencephalitis. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 50, n. 2, p. 182–183, 2009.

HANSMANN, F.; JUNGWIRTH, N.; ZHANG, N.; SKRIPULETZ, T.; STEIN, V. M.; TIPOLD, A.; STANGEL, M.; BAUMGÄRTNER, W. Beneficial and detrimental impact of transplanted canine adipose-derived stem cells in a virus-induced demyelinating mouse model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 202, p. 130–140, 2018.

JIANG, W.; XU, J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, v. 53, n. 1, 2020.

KAPIL, S.; YEARY, T. J. Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 41, p. 1069–1086, 2011.

KARUSSIS, D.; PETROU, P.; KASSIS, I. Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 324, p. 1–9, 2013.

KOLAKOFSKY, D. Paramyxovirus RNA synthesis, mRNA editing, and genome hexamer phase: A review. *Virology*, v. 498, p. 94-98, 2016.

KYURKCHIEV, D.; BOCHEV, I.; IVANOVA-TODOROVA, E.; MOURDJEVA, M.; ORESHKOVA, T.; BELEMEZOVA, K.; KYURKCHIEV, S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, v. 6, n. 5, p. 552-570, 2014.

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.

LOOTS, A. K.; MITCHELL, E.; DALTON, D. L.; KOTZÉ, A.; VENTER, E. H. Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. *Journal of General Virology*, v. 98, p. 311–321, 2017.

MANANDHAR, P.; NAPIT, R.; PRADHAN, S.M.; RAJBHANDARI, P.G.; MORAVEK, J.A.; JOSHI, P.R.; SHRESTHA R.D.; KARMACHARYA, D. Phylogenetic characterization of canine distemper virus from stray dogs in Kathmandu Valley. *Virology Journal*. v. 20, p. 117, 2023.

MANGIA, S. H.; PAES, A. C. Cinomose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. *Doenças infecciosas em animais de produção e companhia*. 1 ed. Rio de Janeiro, Roca, 2016, cap. 51, p. 561-579.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine Distemper Virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 38, n. 4, p.787-797, 2008.

MERIMI, M.; EL-MAJZOUB R.; LAGNEAUX L.; AGHA D.M.; BOUHTIT F.; MEULEMAN N.; FAHMI H.; LEWALLE P.; FAYYAD-KAZAN M.; NAJAR M. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. v. 9, 2021.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 27, p. 351-362, 2011.

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. *Genetic and Molecular Research*, v. 15, n. 2, 2016.

PINHEIRO, L. L.; DE LIMA, A. R.; MARTINS, D. M.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; SOUZA, M. P. C.; MIRANDA, C.M.F.C.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; RUSSO, F.B.; PIGNATARI, G.C.; FILHO, E.S.; BRANCO, E. Mesenchymal stem cells in dogs with demyelinating leukoencephalitis as an experimental model of multiple sclerosis. *Heliyon*, v. 5, n. 6, 2019.

RACANIELLO, V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*. v. 344, n. 1, p. 9-16, 2006.

RENDON-MARIN, S.; DA FONTOURA BUDASZEWSKI, R.; CANAL, C.W.; RUIZ-SAENZ, J. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology Journal*. v. 16, n. 30, 2019.

SARCHAHI, A. A.; ARBABI, M.; MOHEBALIAN, H. Detection of canine distemper virus in cerebrospinal fluid, whole blood and mucosal specimens of dogs with distemper using RT-PCR and immunochromatographic assays. *Veterinary Medicine and Science*. v. 8, n. 3, p. 1390–1397, 2022.

- SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A.; DOHERR, M. G.; WEISSENBOCK, H.; VANDEVELDE, M.; LASSMANN, H.; GRIOT, C. Demyelination precedes oligodendrocytes loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathologica*, v. 103, n. 1, p. 11-19, 2002.
- SHRESTHA, N.; GALL, F. M.; VESIN, J.; CHAMBON, M.; TURCATTI, G.; FOTIADIS, D.; RIEDL, R.; PLATTET, P. Antiviral screen against canine distemper virus-induced membrane fusion activity. *Viruses*, v. 13, n. 1, p. 128, 2021.
- SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 5, p. 215-220, 2007.
- SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. G. Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. *Journal of Neurocytology*, v. 16, p. 871-881, 1987.
- SYKES, J. E.; VANDEVELDE, M. Canine Distemper Virus Infection. In: SYKES, JANE E. *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2022.
- UCCELLI, A.; BENVENUTO, F.; LARONI, A.; GIUNTI, D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 24, n. 1, p. 59-64, 2011.
- ULRICH, R.; PUFF, C.; WEWETZER, K.; KALKUHL, A.; DESCHL, U.; BAUMGÄRTNER, W. Transcriptional Changes in Canine Distemper Virus-Induced Demyelinating Leukoencephalitis Favor a Biphasic Mode of Demyelination. *PLOS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 271-280, 1995.
- WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, p. 101-116, 1999.
- ZHANG, J.; BULLER, B.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; LU, M.; ROSENE, D.L.; MEDALLA, M.; MOORE, T.L.; CHOPP, M. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stromal cells promote remyelination and reduce neuroinflammation in the demyelinating central nervous system. *Experimental Neurology*, v. 347, 2022.

ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *International Journal of Stem Cells (Int J Stem Cells, eISSN: 2005-5447)*

Article Type
Original Article

Article Title

Mesenchymal Stem/Stromal Cells Mitigate Neurological Sequelae in Canine Distemper Encephalomyelitis

Short Title (up to 12 words)

Mesenchymal Stem/Stromal Cells Therapy for Canine Distemper Encephalomyelitis.

Authors

Thiago TourinhoPereira¹, Rogério Martins Amorim¹

Affiliations

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

ORCID IDs

Thiago Tourinho Pereira: [<https://orcid.org/0009-0001-4883-6822>]

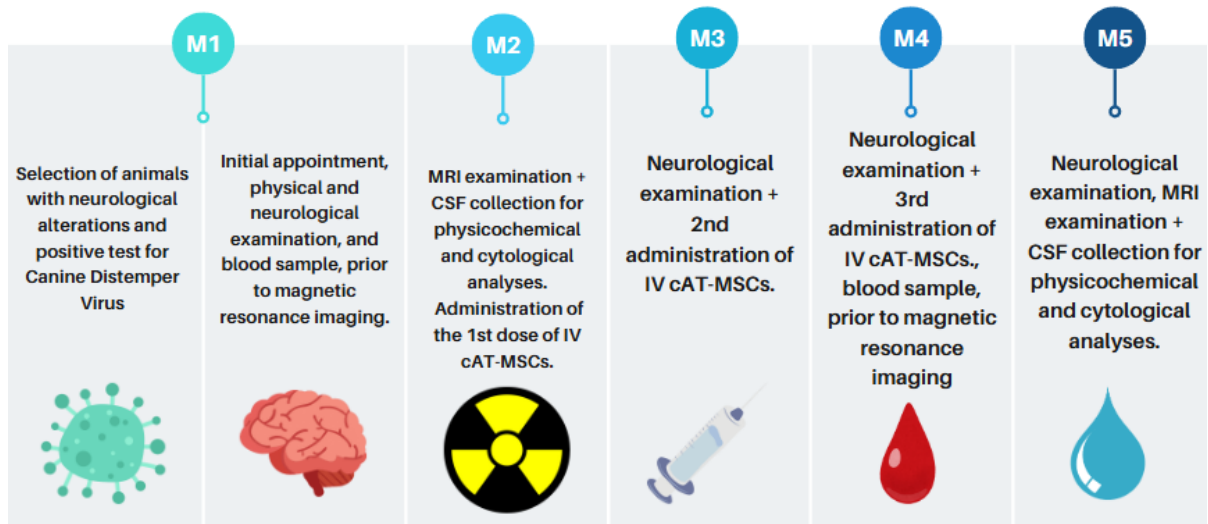
Rogério Martins Amorim: [<https://orcid.org/0000-0003-3750-5857>]

Abstract

Canine distemper is a severe viral disease that causes systemic and neurological signs. It affects dogs regardless of breed, age, or sex, occurring in unvaccinated or immunocompromised individuals. The neurological manifestations result from distinct demyelinating lesions, which vary according to the disease stage, leading to chronic central nervous system lesions. Currently, no satisfactory treatment exists. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are a promising therapeutic option for canine distemper-related neurological sequelae due to their immunomodulatory and neuroregenerative properties. This study aimed to evaluate the efficacy of intravenous canine adipose tissue derived mesenchymal stem/stromal cells (cAT-MSCs) therapy (6×10^6 cells per dose) in dogs with distemper-related neurological deficits persisting for more than three months without signs of improvement. Seven dogs were treated, each receiving three intravenous transplants at 30-day intervals. Neurological assessment was conducted using a neurodeficiency scale, along with cerebrospinal fluid (CSF) analysis and magnetic resonance imaging (MRI) at baseline and post-treatment. Clinical improvement was observed in all dogs, especially after the second and third MSC applications. Although no significant changes were observed on MRI or CSF analysis, the neurological recovery suggests that intravenous cAT-MSC therapy may offer a safe and effective strategy to mitigate clinical signs and enhance the quality of life in dogs with distemper-related neurological sequelae.

Keywords: Cell therapy, Demyelination, Dogs, Stem Cell Therapy, Neuroinflammation, Neuroregeneration.

Graphical Abstract



Introduction

Canine distemper is a severe infectious disease caused by a virus from the Morbillivirus genus, within the Paramyxoviridae family. Its clinical manifestations can be subclinical, acute, or chronic, and are characterized by cutaneous, gastrointestinal, respiratory, and neurological signs (1,2). Viral dissemination depends on the host's immune response as well as the virulence of the infecting strain. These factors influence whether the systemic disease progresses to its neurological phase (2,3).

Neurological alterations result from distinct demyelinating lesions, which vary according to the disease stage. Acute lesions arise from direct viral injury due to replication in glial cells, particularly astrocytes and oligodendrocytes, leading to increased production of TNF-alpha, which in turn causes further oligodendrocyte destruction and myelin loss. Chronic lesions are characterized by diffuse upregulation of the major histocompatibility complex (MHC), production of reactive oxygen species, and infiltration of inflammatory cells, with antigen restriction occurring at this stage (4–7).

Treatment for canine distemper is currently limited to supportive care (1,8). Considering the inflammatory features of the chronic phase, therapy with mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) has emerged as a potential alternative treatment (9–11).

MSCs play two main roles - tissue regeneration and immunomodulation. These functions are triggered upon detection of a damaged microenvironment and are mediated through paracrine mechanisms, including the release of soluble factors

such as cytokines, growth factors, and chemokines, as well as anti-apoptotic and antioxidant effects (12).

The regulatory effect of MSCs on lymphocytes and macrophages is also crucial for modulating immune responses. MSCs inhibit T lymphocytes and promote the differentiation of regulatory T cells (Tregs), while also influencing macrophage polarization toward the M2 phenotype, thereby enhancing the anti-inflammatory profile of the therapy (13,14).

Intravenous MSC therapy has been investigated primarily for its safety and efficacy in various neurological conditions. Its use in animals with neurological sequelae from distemper has shown significant reductions in neurological signs (15,16).

Considering the therapeutic potential of MSCs in neuroregeneration and the lack of definitive treatments for demyelinating conditions caused by canine distemper, the hypothesis of this study is that therapy with canine adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells (cAT-MSCs), administered through multiple intravenous transplants, can improve neurological sequelae in dogs affected by distemper.

Materials and Methods

Study Design and Ethical Approval

This prospective clinical trial included seven adult mixed-breed dogs of both sexes diagnosed with neurological sequelae of canine distemper virus (CDV) infection. Animals were recruited from the Veterinary Teaching Hospital (VTH–FMVZ–UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil) and private veterinary clinics. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA–FMVZ/UNESP, Protocol No. 000.114), and informed consent was obtained from all dog owners.

Inclusion Criteria

Dogs included had a history of CDV infection confirmed by positive RT-PCR of urine or cerebrospinal fluid (CSF), persistent neurological deficits for at least three months, and were stable at the time of enrollment. Only animals whose guardians consented to participate and agreed to suspend any ongoing therapies (e.g., physiotherapy, acupuncture, supplements, or medications—except antiepileptic drugs) were included.

Clinical and Neurological Assessment

All animals underwent comprehensive physical and neurological examinations. Neurological status was graded using a modified ordinal scale (0 to 4) based on locomotor function, reflexes, and postural reactions. Scoring was performed before treatment and during follow-up at defined time points (see below). The full scale is provided as Supplementary Table 1.

Imaging

Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain or cervical spinal cord was performed in all dogs under general anesthesia using a 0.25-Tesla MRI scanner (Vet-MR Grande, Esaote, Italy).

CSF Analysis

CSF was collected from the cerebellomedullary cistern under sterile conditions. Cell count, protein concentration and glucose levels were determined.

Experimental Timeline

Dogs were followed for 120 days, with evaluations at the following time points:

Time Point	M1 Day 0 (Baseline)	M2 Day 30	M3 Day 60	M4 Day 90	M5 Day 120
Evaluation	Selection of animals, Clinical/Neurological exam, blood sample	Clinical/Neurological exam, CSF, MRI, 1 st Cell therapy	Clinical/Neurological exam, 2 nd Cell therapy	Clinical/Neurological exam, blood sample, 3 rd cell therapy	Clinical/Neurological, MRI, CSF

Mesenchymal Stem/stromal Cells Transplantation

All animals received a three intravenous infusion of 6×10^6 adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells (AT-MSCs) (NeoStem®, Ourofino Saúde Animal, Brazil) diluted in 2,5 mL of sterile saline, spaced 30 days apart. Cells were thawed, washed, and resuspended per manufacturer's protocol. Infusion was performed via a cephalic vein over 10 minutes. Adverse effects were monitored for 24 hours post-infusion.

Data Analysis

Descriptive statistics were used to summarize the data. Neurological scores at different time points were compared to baseline using parametric tests (e.g., One-way repeated measures ANOVA), considering $p < 0.05$ as statistically significant.

Results

General Clinical Evaluation

General clinical evaluations were conducted on days 0, 30, 60, 90, and 120. The assessed parameters included body temperature, mucous membrane color, capillary refill time, lymph node palpation, hydration status, heart rate, and respiratory rate. All parameters remained within the physiological limits for the species at all time points.

Animals that initially presented with footpad hyperkeratosis (M1) showed significant improvement, particularly at 90 and 120 days (M4 and M5) after the third administration of MSCs (Figures 1 and 2). Those with nasal hyperkeratosis also demonstrated gradual improvement over the course of the sessions (Figure 3).

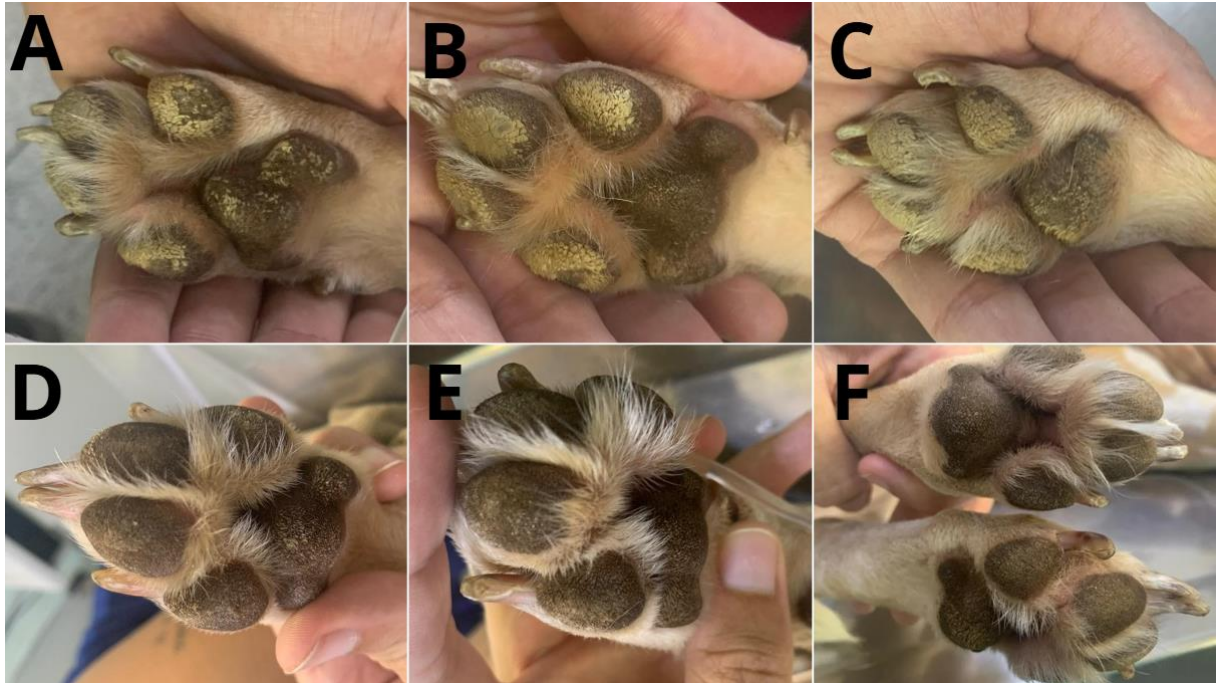


Figure 1. Animal 2 showing footpad hyperkeratosis at M3, with significant improvement at M4.

A and B: Palmar pads with hyperkeratosis at M3.

C: Plantar pad with hyperkeratosis at M3.

D and E: Palmar pads with improvement at M4.

F: Plantar pads with improvement at M4.

(FMVZ – UNESP Botucatu, Neurology Service)

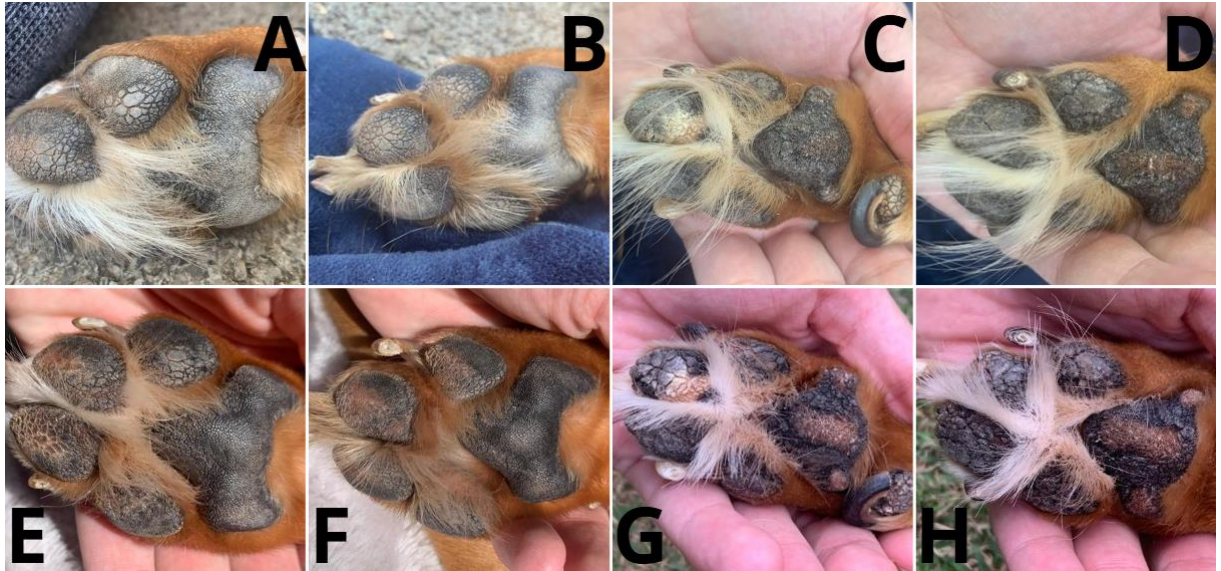


Figure 2. Animal 3 showing footpad hyperkeratosis at M4 and mild improvement at M5.

A and B: Palmar pads with hyperkeratosis at M4.

C and D: Plantar pads with hyperkeratosis at M4.

E and F: Palmar pads showing improvement at M5.

G and H: Plantar pads with desquamation, indicating regression of the condition at M5.

(FMVZ – UNESP Botucatu, Neurology Service)

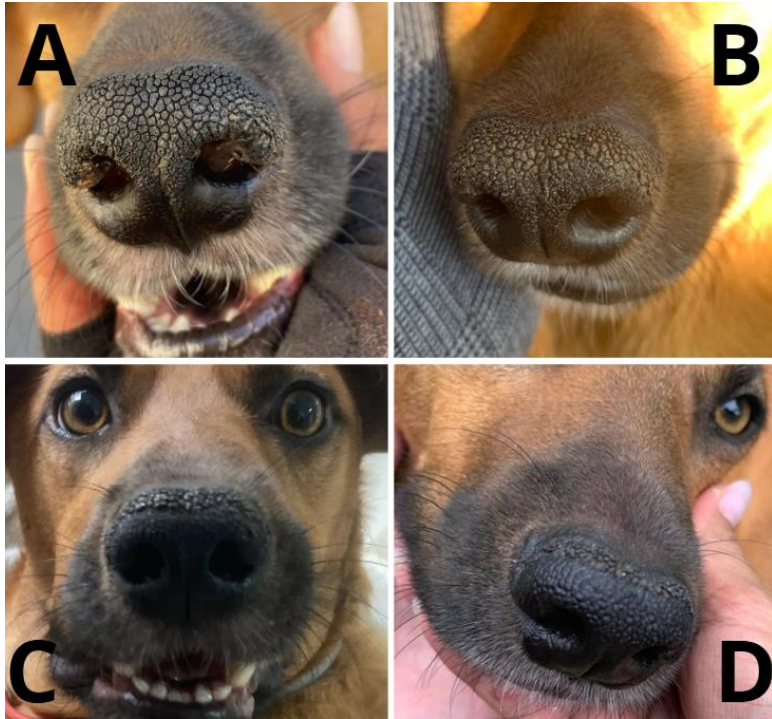


Figure 3. Animal 3 presenting nasal hyperkeratosis with progressive improvement after each MSC treatment.

A: Nose at M2.

B: Nose at M3.

C: Nose at M4, showing partial replacement of the hyperkeratotic tissue.

D: Nose at M5, with a thin residual layer of hyperkeratosis.

(FMVZ – UNESP Botucatu, Neurology Service)

Neurological Evaluation

The neurological evaluation was conducted at all five time points (M1 to M5) using a scoring system based on a clinical scale that assessed mental status, ambulatory capacity, postural reactions, spinal reflexes, and the presence or absence of myoclonus and seizures (Table 2). The clinical neurological status of the animals at the first evaluation (M1) varied between moderate and severe.

During follow-up evaluations, the animals presented with varying levels of clinical neurological improvement (Figure 4). Of the 7 animals included in the study, 6 showed progressive improvement over the five months, while 1 animals maintained a moderate and stable neurological condition, without deterioration.

Improvements were mainly observed in the resolution or reduction of myoclonus and in the restoration of postural reactions and ambulatory capacity. No animal had seizures during the five-month period of follow-up.

When analyzing each experimental time point, no significant difference was observed between days 0 and 30. However, when comparing day 0 with days, 90, and 120, significant differences were noted, demonstrating a progressive reduction in the neurodeficiency score over time.

The greatest reduction was observed between day 0 and day 120, with a 51% decrease in the neurodeficiency score, indicating a substantial reduction in the severity of neurological lesions throughout the experiment.

No significant difference was observed between days 60 and 90, suggesting that the neurodeficiency score remained relatively stable during this interval. However, a significant difference was found between days 60 and 120, indicating a further reduction in the score during this period.

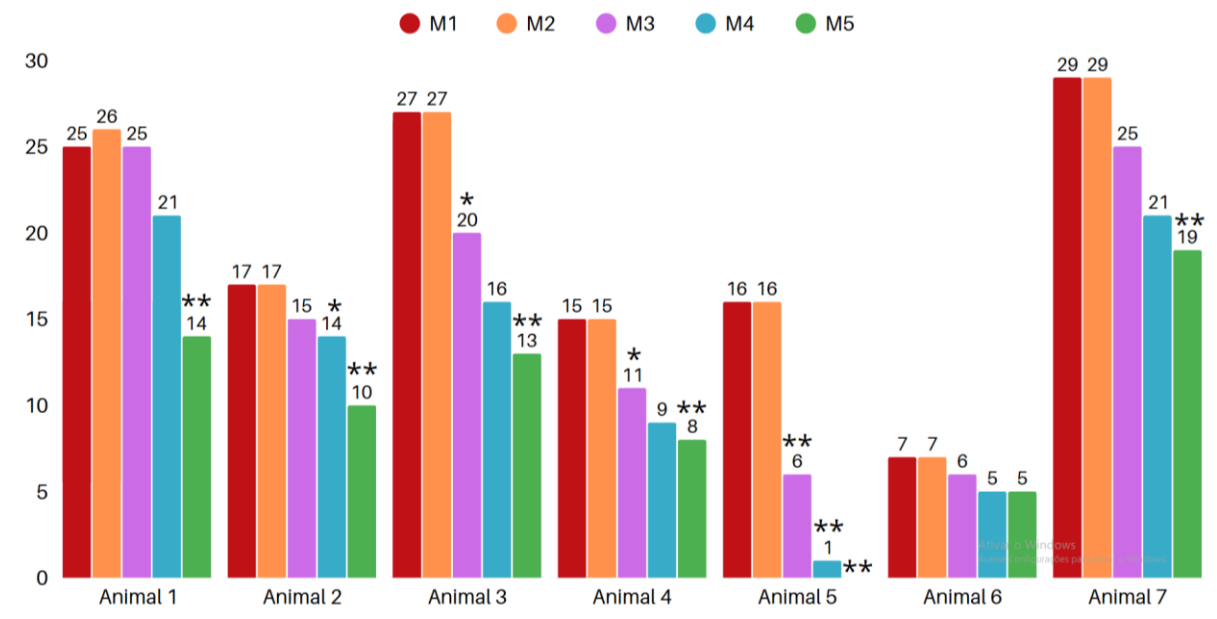


Figure 4. Neurodeficiency score at 0 days (M1), 30 days (M2), 60 days (M3), 90 days (M4), and 120 days (M5).

The number above the bars represents the score of each animal at different experimental time points. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 2. Mean and standard deviation of neurodeficiency scores in dogs (n = 7) treated with multipotent mesenchymal stromal cells derived from canine adipose tissue (cAT-MSCs), evaluated at time points M1 (0 days), M2 (30 days), M3 (60 days), M4 (90 days), and M5 (120 days).

Experimental Time Point	Mean $\pm$ Standard Deviation
M1	20,0 $\pm$ 7,5 ^{ab}
M2	20,1 $\pm$ 7,6 ^a
M3	16,4 $\pm$ 8,0 ^{bc}
M4	12,8 $\pm$ 7,2 ^{cd}
M5	9,8 $\pm$ 6,2 ^d

Means followed by different letters differ significantly between time points according to Tukey's test (P < 0.05).

Diagnostic Procedures

The cerebrospinal fluid (CSF) analysis was performed on 7 animals included in the study. Among these, five dogs exhibited normal CSF, while two presented abnormalities, including pleocytosis and increased protein concentration.

Table 3. Individual results of cerebrospinal fluid (CSF) analysis from dogs (n=7) subjected to transplants with multipotent mesenchymal stromal cells derived from canine adipose tissue, at timepoint M2 (30 days before the first transplant) and timepoint M5 (30 days after the third transplant)).

		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7
Color	M2	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Pink	Colorless
	M5	Colorless	Colorless	Red	Colorless	NP	Colorless	Colorless
Turbidity	M2	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent
	M5	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	NP	Translucent	Translucent
Density	M2	1,006	1,006	1,006	1,006	1,006	1,006	1,006
	M5	1,006	1,006	1,006	1,010	NP	1,004	1,006
pH	M2	8,0	8,5	8,0	8,0	8,5	8,0	8,5
	M5	9,0	9,0	8,0	7,5	NP	8,5	8,5
Pandy	M2	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	++
	M5	Negative	Negative	Negative	Negative	NP	Negative	Negative
Protein concentration (mg/dL)	M2	19,3	35,4	40,3	29,3	24,5	25,0	72,2
	M5	17,6	34,2	60,1	37	NP	23,5	63,6
Red blood cells (/μL)	M2	1	<1	1.550	2	<1	1.400	<1
	M5	1	<1	8.200	35	NP	<1	79
Cell count (/μL)	M2	<1	9	<1	<1	<1	3	3
	M5	<1	<1	7	4	NP	2	3
Pleocytosis*	M2	Absent	Mononuclear	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
	M5	Absent	Absent	Mixed	Absent	NP	Absent	Absent

NP, Not performed.

* Pleocytosis was considered when nucleated cells >5 (DI TERLIZZI & PLATT, 2009)

Magnetic resonance imaging (MRI) was performed in seven animals. The predominant findings included hyperintense lesions on T2 and FLAIR sequences in the spinal cord, indicating demyelinating and inflammatory processes consistent with neurological distemper. In two animals, lesions were observed as focal amorphous areas in the cervical spinal cord (Figure 5).

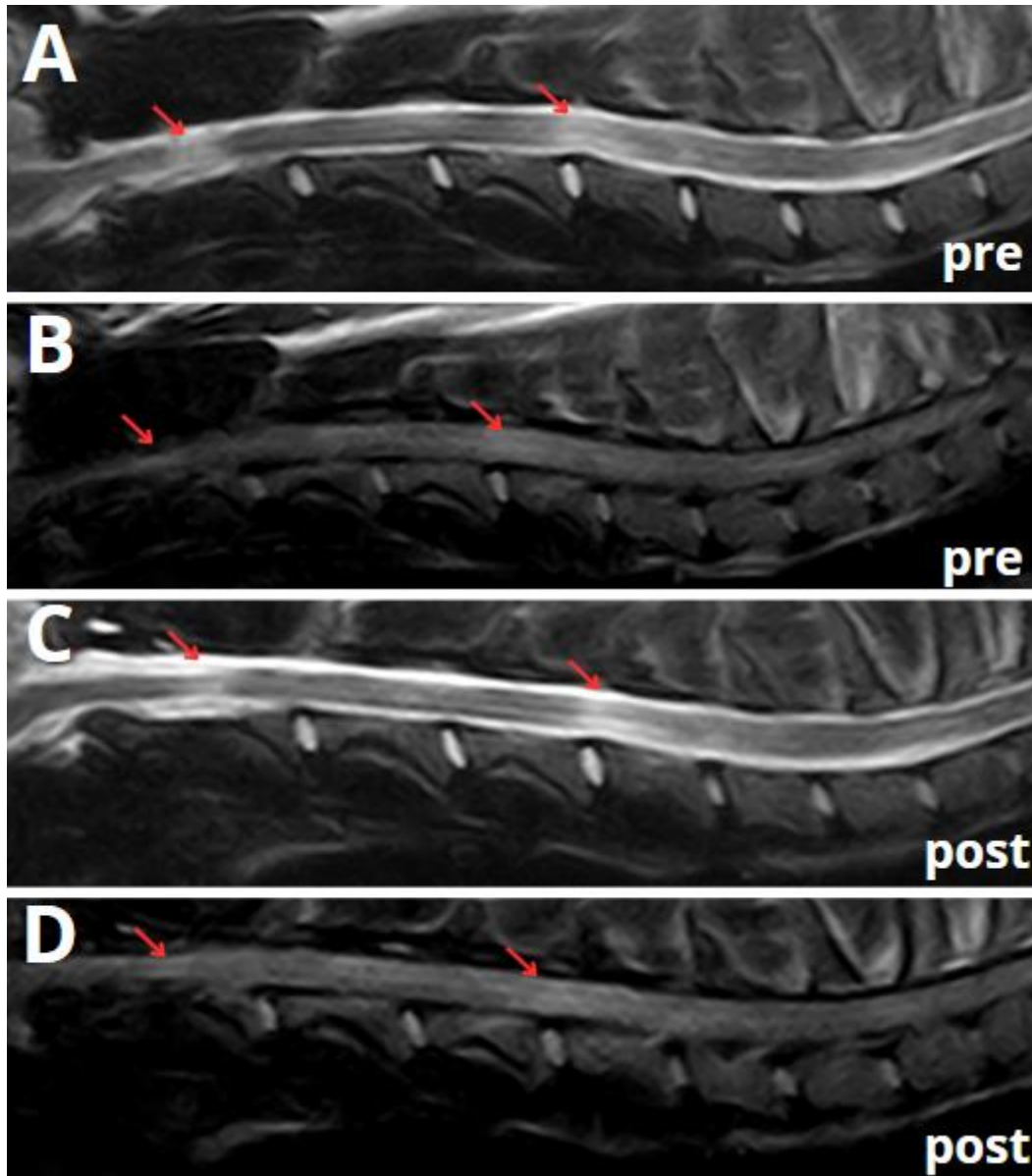


Figure 5. Magnetic resonance imaging of the cervical spinal cord of animal 7 at M2, pre cAT-MSC transplantation.

A. T2-weighted image.

B. FLAIR.

And at M5, post cAT-MSC transplantations:

C. T2-weighted image.

D. FLAIR.

Red arrows: intramedullary lesions.

(FMVZ – UNESP Botucatu, Neurology Service)

Hematological parameters remained within normal ranges before and after cAT-MSc transplantation. Lymphopenia was observed in six of seven dogs, with partial or full recovery in half of them by day 90. Serum biochemistry values showed no significant alterations throughout the study.

Discussion

The selection of animals was based on the following criteria: a positive test for canine distemper virus (CDV), either by rapid test or PCR, confirming prior infection; a minimum time of one month since infection; and the presence of neurological signs that allowed scoring on the neurodeficiency scale and evaluating improvement after each MSC application. This time interval was chosen before admitting the animals to the study because chronic lesions associated with CDV infection in the CNS typically occur between 29 to 63 days post-infection [5,17].

The improvement in neurological clinical signs is associated with the administration of MSCs. In our study, even with a 30-day interval between the first consultation and the first MSC application, no animal showed spontaneous improvement. As they received more applications, there was a gradual improvement in the neurological condition. Similar results are observed in studies conducted during the chronic phase; however, when therapy is applied during the viremic phase of the disease, it tends to be ineffective [9,15,18].

Although this reduction was substantial, it is important to note that data variability between individuals was considerable, especially in the initial moments (with a mean of 20.0 ± 7.5 at moment 0). This suggests that despite the general trend of improvement, the response to treatment or the condition experienced was heterogeneous among the animals, which must be considered when interpreting the results.

There is no standardized dose for MSC therapy in canine distemper cases. In our study, the doses were pre-established by the partner laboratory based on the weight of each animal. All animals evaluated weighed between 9 and 20 kg, and the dose used was 6×10^6 cells. Other studies report variable doses, such as $1.0 \times 10^6/\text{kg}$ [8], 5.0×10^6 every 15 days [9], a single dose of 10×10^6 [18], and between 1.0×10^8 and 2.5×10^8 [15], the latter being notably higher than others.

In CSF analysis, only animal 2 showed pleocytosis at moment M2, which normalized by M5. Mononuclear pleocytosis is a common finding in studies evaluating CSF of dogs with distemper [20]. In studies assessing CSF in the active phase, both mononuclear and lymphocytic pleocytosis are frequently observed [20,21]. CSF protein levels in our study did not show evident differences between M2 and M5. Literature values range widely, from 30 mg/dL to 360 mg/dL in distemper cases [20,21].

The main MRI findings in animals with neurological signs due to CDV are ovoid lesions, hyperintense in T2 and hypointense or isointense in T1. These remain hyperintense in FLAIR, and with contrast, enhancement may be seen in the affected parenchyma and meninges [20,22]. Similar lesions were observed in two

dogs in our study, described as amorphous focal lesions of varying sizes showing hyperintensity on T2 and FLAIR, and isointensity on T1, but without contrast enhancement. Asymmetry of the lateral ventricles was noted in one animal. This asymmetry may result from a previous alteration in CSF drainage due to increased protein or cellularity during the active disease phase, leading to altered CSF flow and subsequent ventricular enlargement [23].

In conclusion, the use of adipose-derived canine mesenchymal stem cells (cAT-MSCs) in dogs presenting neurological sequelae of canine distemper demonstrated progressive and sustained improvement in neurological function, particularly with multiple administrations at 30-day intervals. No spontaneous neurological recovery was observed before adipose-derived canine MSC treatment, reinforcing the association between therapy and clinical improvement. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis supported the clinical findings, with normalization of pleocytosis in one of the treated animals. Although variability among individual responses was noted, the overall trend favored neurological recovery. These results suggest that repeated intravenous applications of adipose-derived canine MSCs are a safe and potentially effective therapeutic strategy for managing chronic neurological sequelae of canine distemper.

However, this study presents important limitations that should be acknowledged, including the small sample size, the absence of a control or placebo group, and the lack of a double-blind design, which may affect the generalizability and objectivity of the findings. These factors highlight the need for further studies with larger sample sizes, proper randomization, inclusion of control groups, and long-term follow-up to validate these results and establish optimal dosing protocols, including different routes of administration and treatment regimens.

References

1. Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008;38(4):787–97.
2. Mangia SH, Paes AC. Distúrbios neurológicos em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina. *Pesq Vet Bras.* 2016;36(4):307–13.
3. Sykes JE, Vandeveld M. Canine Distemper Virus Infection. In: SYKES, JANE E. *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book.* Elsevier Health Sciences, 2022.
4. Summers BA, Appel MJ. Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural study. *Am J Pathol.* 1987;127(3):316–29.
5. Vandeveld M, Zurbriggen A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol.* 1995;89(1):34–9.
6. Schobesberger M, Zurbriggen A, Vandeveld M. Demyelination precedes oligodendrocytes loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathol.* 2002;103(1):11–19.

7. Vandeveld M, Zurbriggen A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Vet Microbiol.* 2005;105(3–4):187–91.
8. 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. *Genetic and Molecular Research*, 2016;15(2)
9. Gonçalves, D. S. V.; Gomes, M. V. S.; Guterra, V. L. P.; Lucchi-Rodrigues, A. F.; Mathias, C. H. T.; Maestri, L. F. P.; Argôlo-Neto, N. M.; Monteiro, B. S. Mesenchymal stem cell infusion for the treatment of neurological sequelae of canine distemper virus: a clinical study. *Genet. and Mol. Res.*, 2018;17(4);gmr18088
10. Pinheiro, L. L.; De Lima, A. R.; Martins, D. M.; De Oliveira, E. H. C.; Souza, M. P. C.; Miranda, C.M.F.C.; Beltrão-Braga, P.C.B.; Russo, F.B.; Pignatari, G.C.; Filho, E.S.; Branco, E. Mesenchymal stem cells in dogs with demyelinating leukoencephalitis as an experimental model of multiple sclerosis. *Heliyon*, 2019;5(6)
11. Zhang, J.; Buller, B.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Lu, M.; Rosene, D.L.; Medalla, M.; Moore, T.L.; Chopp, M. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stromal cells promote remyelination and reduce neuroinflammation in the demyelinating central nervous system. *Experimental Neurology*, 2022;347
12. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemother.* 2016;43(4):268–74.
13. Braza F, Dirou S, Forest V, Sauzeau V, Hassoun D, Chevalere C, et al. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells.* 2016;34(7):1836–45.
14. Carty F, Mahon BP, English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents? *Clin Exp Immunol.* 2017;188(1):1–11.
15. Brito, H. F. V.; Santos, M. R.; Gillioli, R.; Li, L. M.; Passos, L. A. C.; Lancellotti, M.; Ferreira, F.; Corat, M. A. F. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais.* 2010;8(24):26-29
16. Karussis, D.; Petrou, P.; Kassis, I. Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 2013;324:1–9
17. Lempp C, Spitzbarth I, Puff C, et al. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses.* 2014;6:2571–2601.
18. 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”.
19. Hansmann, F.; Jungwirth, N.; Zhang, N.; Skripuletz, T.; Stein, V. M.; Tipold, A.; Stangel, M.; Baumgärtner, W. Beneficial and detrimental impact of transplanted canine adipose-derived stem cells in a virus-induced

- demyelinating mouse model. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2018;202:130–140
20. Bathen-Noethen, A.; Stein, V.M.; Puff, C.; Baumgaertner, W.; Tipold, A. Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *J. Small Anim. Pract.* 2008;49(9):460-467
 21. Feitosa, M. M.; Feitosa, F. L. F.; Kohayagawa, A.; Curti, P. R.; Mogami, S. R. K. Avaliação física, citológica, conteúdo de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do liquor de cães normais e de cães com encefalite por cinomose. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, 1997;34(3):147–151
 22. Griffin, J. F.; Young, B. D.; Levine, J. M. Imaging diagnosis—chronic canine distemper meningoencephalitis. *Vet Radiol Ultrasound.* 2009;50(2):182–183
 23. Di Terlizzi R, Platt SR. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II—Analysis. *Vet J.* 2009;180(1):15–32.

Corresponding Author

Name: Rogério Martins Amorim

Postal Address: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Departamento de Clínica Veterinária. Distrito de Rubião Jr. s/n, campus 18618-000 - Botucatu, SP - Brasil

E-mail: rogerio.amorim@unesp.br

Funding

The authors are grateful for scholarship funding received through CAPES.

Acknowledgments

The authors thank the School of Veterinary Medicine and Animal Science of Botucatu, São Paulo State University - FMVZ-UNESP Botucatu and Ourofino Saúde Animal.

Potential Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest related to this study.

Author Contributions

Thiago Tourinho Pereira: clinical analysis, data collection, manuscript writing.

Rogério Martins Amorim: study conception, image analysis, assistance in clinical procedures, data interpretation, final manuscript review.

All authors read and approved the final version of the manuscript.

APÊNDICE 1

Identificação	Raça	Idade	Peso (Kg)	Sexo
Animal 1	PitBull	1 Ano	14,4	Macho
Animal 2	SRD	2 Anos	18,6	Fêmea
Animal 3	SRD	2 Anos	16	Macho
Animal 4	SRD	1 Ano	10	Macho
Animal 5	SRD	3 Anos	14	Fêmea
Animal 6	SRD	1 Ano	11,2	Fêmea
Animal 7	SRD	4 Anos	12,2	Fêmea

APÊNDICE 2

Hemograma	Momento	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7
Hemácias 10 ⁶ /μL	M1 (0 d)	5,65	6,44	5,09	6,33	5,47	6,57	6,92
	M4 (90 d)	5,27	6,11	6,34	7,27	5,47	6,13	6,56
Hemoglobina g/dL	M1 (0 d)	14,3	14,4	12,2	15,4	13,5	15,4	14,3
	M4 (90 d)	13,3	13,9	14,0	16,6	12,6	14,5	16,2
Hematócrito (vg)%	M1 (0 d)	40	44	38	45	40	46	44
	M4 (90 d)	39	41	42	48	38	42	47
Proteína g/dL	M1 (0 d)	6,8	7,8	6,6	7,0	7,2	6,2	8,4
	M4 (90 d)	6,8	6,2	6,6	6,6	7,8	6,2	8,4
Plaquetas /μL	M1 (0 d)	333.000	166.000	232.000	296.000	165.000	401.000	191.000
	M4 (90 d)	260.000	160.000	200.000	282.000	216.000	341.000	205.000
Leucócitos	M1 (0 d)	9.500	5.200	7.700	6.900	8.300	7.800	5.100
	M4 (90 d)	11.900	6.100	15.100	6.500	6.100	6.700	7.600
Neutrófilos	M1 (0 d)	7.100	4.400	7.000	5.700	7.800	6.100	4.100
	M4 (90 d)	8.600	5.200	12.200	4.400	4.400	4.400	5.900
Linfócitos	M1 (0 d)	1.100	100	200	900	100	900	400
	M4 (90 d)	1.500	200	1.200	1.600	700	1.700	700
Eosinófilos	M1 (0 d)	400	300	100	100	200	400	600
	M4 (90 d)	400	400	1.200	100	100	400	200
Monócitos	M1 (0 d)	900	500	300	100	200	400	0
	M4 (90 d)	1.400	300	500	300	900	200	900