

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

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

SUELEN BERGER BALDOTTO

Botucatu/SP

2019

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

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

SUELEN BERGER BALDOTTO

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Botucatu/SP

2019

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

Baldotto, Suelen Berger.

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

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

Orientador: Rogério Martins Amorim
Capes: 50501062

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

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

Nome do autor: Suelen Berger Baldotto

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

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

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

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

Data da Defesa: 21 de fevereiro de 2019.

Dedico,

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

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

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

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

- *Richard Branson*

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E aqueles que sem querer eu esqueci,

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

FIGURA 11 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna tóracolumbar do paciente 2, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Áreas de hiposinal intramedular em M1 e M2 (setas) (A, D). Áreas de hipersinal intramedular em M1 e M2 (setas) (B, C, E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2; C e F: sequências em Fast Flair..... 67

FIGURA 12 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 3, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no lobo temporal esquerdo em M1 (setas) (figuras B, C); diminuição do hipersinal em M2 (setas) (figura E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair..... 68

FIGURA 13 – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 3, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Aumento do hipersinal, associado à atrofia cerebelar em M2 (seta) (B). Figuras A e B: sequências ponderadas em T2..... 69

FIGURA 14 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 4, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no córtex occipital em M1 (seta) (B, C); discreta diminuição do hipersinal do córtex occipital em M2 (seta) (E). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair..... 70

FIGURA 15 – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 4, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no córtex occipital e no cerebelo em M1 (seta) (figura A); diminuição do hipersinal do córtex occipital e no cerebelo em M2 (seta) (figura B). Figuras A e B: sequências com tempo ponderado em T2..... 71

FIGURA 16 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna cervical do cão 5, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal intramedular em M1 (seta) (figura A); ausência do hipersinal em M2 (seta) (figura D). Hipersinal no canal central medular em M1 (seta) (figura B); diminuição do hipersinal no canal central medular em M2 (seta) (figura E). Hipersinal intramedular em M1 (seta) (figura C); ausência do hipersinal em M2 (seta) (figura F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2; C e F: sequências em Fast Flair..... 72

FIGURA 17 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna toraco-lombar do cão 6, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Não foram observadas alterações na medula espinhal toraco-lombar. Imagens ponderadas em T2 (A, C); imagens ponderadas em FLAIR (B, D)..... 73

FIGURA 18 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 7, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal cerebelar em M0 (seta) (B, C); diminuição do hipersinal em M2 (seta) (E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair..... 74

FIGURA 19 – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 7, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal cerebelar em M0 (seta) (B); ausência do hipersinal em M2 (seta) (D). Figuras A e C: sequências com tempo ponderado em T1; B e D: sequências com tempo ponderado em T2..... 75

FIGURA 20 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna cervical do cão 8, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Áreas de hipersinal intramedular em M1 (setas) (A, B, C e D); diminuição do hipersinal intramedular em M2 (setas) (E, F, G e H). Figuras A e E: sequência ponderada em T1; B e F: sequência ponderada em T2; C e G: sequência Gradient Echo; D e H: sequência STIR..... 76

FIGURA 21 – Imagens transversais e sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 9, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Permanência de hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M1 (setas) e M2 (A, D) - imagens ponderadas em T2; discreta diminuição do hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M2 (setas) (B, E) - imagens ponderadas em FLAIR. Diminuição do hipersinal no cortex frontal em M2 (setas) (C, F) - imagens sagitais ponderadas em T2..... 77

FIGURA 22 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 10, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no cerebelo em M2 (setas) (C, D). Figuras A e C: sequências ponderadas em T2; B e D: sequências Fast Flair..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cinomose

Cinomose canina é uma doença viral que causa imunossupressão grave e comprometimento multissistêmico. Possui três formas de apresentação clínica: aguda, subaguda e crônica, caracterizado principalmente por sinais respiratórios, gastrintestinais, dermatológicos, oftalmológicos e neurológicos (FENNER, 2004; GREENE; APPEL, 2006; SUMMERS et al., 1995). No sistema nervoso central (SNC) a cinomose está relacionada com infecção persistente pelo vírus da cinomose canina (VCC) resultando em doença desmielinizante multifocal progressiva (SCHOBESBERGER et al., 2002; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). São descritas três formas de encefalite causada pelo vírus da cinomose: encefalite dos cães jovens, encefalite em cães adultos e encefalite do cão velho (CORRÊA & CORRÊA, 1992; FAIRLE et.al.;.2015) A doença clínica tem sido conhecida há séculos e é descrito inequivocamente nos livros do século XVII, relatando grandes epidemias (BLANCOU, 2004). A introdução das vacinas com VCC modificadas, na década de 1950, e seu uso extensivo ajudou a manter a doença sob controle (APPEL, 1987; APPEL; SUMMERS, 1995). Não obstante, a incidência de doença relacionada ao VCC em populações caninas em todo o mundo parece ter aumentado nas últimas décadas, visto que vários episódios de cinomose em animais vacinados foram relatados (BLIXENKRONE-MÖLLER et al.; 1992; DECARO et al, 2004).

Devido às semelhanças com algumas doenças desmielinizantes em seres humanos, como esclerose múltipla e panencefalite esclerosante subaguda, os cães são utilizados como modelos experimentais na tentativa de elucidar a patogênese ainda incerta dessas doenças (INNES; SAUNDERS, 1962; KOESTNER, 1975; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

2.2 Etiologia

A cinomose é uma doença infectocontagiosa causada pelo RNA-vírus do gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* (ETTINGER; FELDMAN, 2005), ordem *Mononegavirales*. Este gênero de vírus é responsável por várias doenças

de alta gravidade em seres humanos e animais. O VCC possui um envelope com duas camadas lipídicas derivadas da membrana plasmática (LAMB; PARKS, 2007; ICTV, 2009) e seu genoma viral possui uma fita de RNA simples, grande (150 a 350nm), de simetria helicoidal (BRAZ, 2009) e com polaridade negativa, não sendo segmentada, (PARDO et al., 2005; ORSINI e BONDAN, 2008), envolto por lipoproteínas, possuindo apenas um antígeno (HIRCH e ZEE, 2009).

Morfologicamente, o VCC é constituído por seis proteínas estruturais: três internas (proteínas L, N e P) e três inseridas no envelope (proteínas M, H e F) (BARRETT, 1999; ZEE; MacLACHLAN, 2004; ORSINI; BONDAN, 2008) (Figura 1). O genoma é envolto por nucleocapsídeo helicoidal, que consiste na nucleoproteína (NP), associado à proteína matrix e ao complexo polimerase, incluindo as proteínas P (fosfoproteína) e L (polimerase ou grande). A proteína N (nucleocapsídeo) é responsável pela proteção do material genético e as proteínas L (polimerase) e P (fosfoproteína), também conhecidas como complexo polimerase, estão envolvidas na transcrição e na replicação do RNA viral (BARRETT, 1999; ORSINI; BONDAN, 2008). As proteínas L, N, P e o RNA viral formam o complexo ribonucleoprotéico (complexo RNP) (BARRETT, 1999; ORSINI; BONDAN, 2008; BEINEKE et al., 2009).

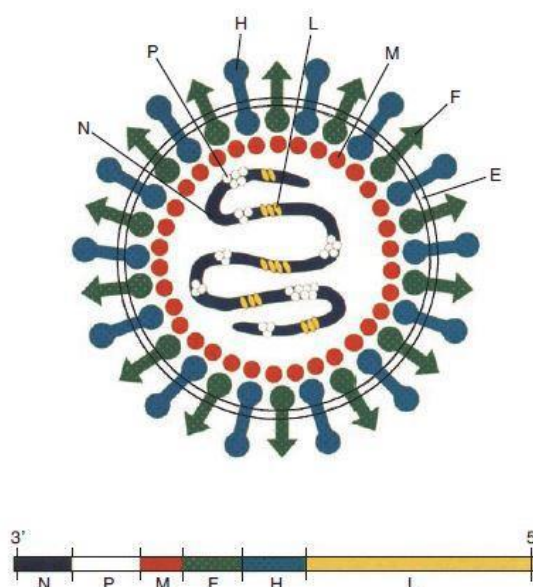


FIGURA 1 – Modelo esquemático da estrutura do vírus da cinomose canina, demonstrando as seis proteínas estruturais (N, P, M, F, H e L) codificadas pelos seis genes que compõem o RNA viral envoltas pelo envelope lipoprotéico (E). Fonte: Greene e Vandeveld (2012).

A proteína de membrana (M) está localizada na face interna do envelope e exibe as duas glicoproteínas, hemaglutinina (HA) e proteína de fusão (F), que são responsáveis pela fixação na membrana dos plasmócitos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; ELIA et al., 2008). A proteína M (matriz) é importante para a maturação viral e funciona como conectora das glicoproteínas de superfície (F e H) ao nucleocapsídeo (BARRETT, 1999; ORSINI; BONDAN, 2008; BEINEKE et al., 2009). A HA possui atividade de hemoaglutinação, sendo responsável pela fixação do vírus na célula hospedeira e pelo tropismo celular, também é reconhecida atualmente por possuir mais variações antigênicas. A proteína F proporciona a ligação entre a membrana celular do hospedeiro e o envelope viral e a formação de sincícios (STERN et al., 1995; WILD et al., 1995; LAN et al., 2006). Essas glicoproteínas são derivadas da membrana da célula hospedeira na formação de novos vírions (HASS; BERRETT, 1996). As proteínas P e L possuem a função de transcrição e replicação viral (BARRETT, 1999), ao mesmo passo que a NP é a principal reguladora da replicação viral e da transcrição, e consequentemente, é a primeira proteína exposta ao sistema imune que estimula a produção de anticorpos nos primeiros estágios da infecção (LATHA et al., 2007). Imhoff et al. (2007), afirmam que o colesterol está envolvido na formação e manutenção de membranas celulares e consequentemente para a formação das proteínas HA e F do envelope viral. Os autores demonstraram que a redução do colesterol do envelope viral reduz a infectividade do vírus da cinomose, e quando este interage com células de menor teor de colesterol há diminuição na formação de sincícios.

A replicação ocorre dentro do citoplasma, podendo ser em células anucleadas. O processo se inicia com a adsorção da célula, devido ao acoplamento da glicoproteína HA aos receptores da membrana celular e a proteína F promove a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula, liberando o nucleocapsídeo intacto dentro do citoplasma. Após produção de certa quantidade de proteínas virais, o complexo polimerase determina a interrupção do processo de transcrição e o início do processo de replicação do genoma (LAMB e PARKS, 2007).

Mutações pontuais causadas por erros intrínsecos da polimerase são as principais causas da variabilidade genética dos morbilivírus (MCCARTHY et al., 2007).

O vírus da cinomose canina (VCC), atualmente descrito, como *Morbillivirus* canino, está relacionado aos vírus do sarampo, *Measles virus*, e ao da peste bovina, *Rinderpest virus*, com reação cruzada entre eles, que ocorrem devido à ribonucleoproteína e aos antígenos do envelope viral (LAMB; PARKS, 2007). O gênero *Morbillivirus* inclui o vírus do sarampo (MeV), vírus da cinomose canina (VCC), morbilivírus dos felinos (FeMV), morbilivirus dos cetáceos (CeMV), vírus da cinomose dos focídeos (PDV), vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV), e vírus da peste bovina (RPV) (BUDASZEWSKI; VON MESSLING, 2016).

Este RNA-vírus assemelha-se de forma antigênica e biofísicamente ao vírus da peste bovina e ao dos pequenos ruminantes, assim como da cinomose dos golfinhos, das focas e dos botos e do vírus do sarampo dos humanos (GREENE; APPEL, 2006; BEINEKE *et al.*, 2009; BRAZ, 2009), do morbilivírus das toninhas, dos equinos e suínos (GREENE; APPEL, 2006). Tem característica pantrópica, infectando células dos diversos sistemas dos cães (MARTINS *et al.*, 2009).

Devido a sua habilidade de replicação em várias culturas celulares como macrófagos, linfócitos e células epiteliais, biótipos de cepas virulentas e atenuadas se diferenciam com facilidade (BRAZ, 2009). O vírus da cinomose canina possui apenas um sorotipo, porém os isolados de campo têm apresentado variabilidade antigênica considerável, podendo ser divididos em linhagens, que apresentam variações de patogenicidade e virulência (ZEE; MacLACHLAN, 2004; ARNS *et al.*, 2007; McVEY; KENNEDY, 2008), associadas principalmente com a área geográfica onde a cepa foi isolada (SUMMERS *et al.*, 1984).

Há um sorotipo de vírus que possui cepas biologicamente diferentes, sendo umas levemente virulentas, causando infecções inaparentes, algumas causam doença aguda com alta frequência de encefalite e outras cepas causam moléstia debilitante com alta taxa de mortalidade e baixa taxa de encefalite. Além disso, algumas estirpes virais podem se apresentar como viscerotrópicas, o que leva a uma moléstia debilitante, com elevada mortalidade e com baixa frequência de encefalite (GEBARA *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2010). Também há aquelas que demoram em apresentar seus efeitos encefalitogênicos, como a encefalite do cão velho ou a “hard pad disease” (MANGIA; PAES 2008). Estudos

de biologia molecular e sequenciamento viral caracterizaram amostras virais e classificaram filogeneticamente em nove linhagens circulantes no mundo: America-I, America-II, Asia-I, Asia-II, Europa II (silvestre), Ártica, África do Sul, América do Sul-I/Europa, América do Sul-II) (HASS et al., 1997; MOCHIZUKI et al., 1999; MARTELLA et al., 2006; CALDERÓN et al., 2007; WOMA et al., 2010; PANZERA et al., 2012). Foi identificada uma nova linhagem circulante na Colômbia, denominada de América do Sul III (ESPINAL et al., 2014). Informações moleculares das estirpes circulantes no Brasil demonstraram até o presente momento a linhagem América do Sul I (BUDASZEWSKI et al., 2014) Europa e América do Sul II (MANGIA; PAES, 2016)

As cepas virais, como o selvagem tipo A75/17, que induz infecção persistente no sistema nervoso central de cães, *Distemperoid*, foram descritas em furões, raposa e cães. As estirpes *Onderstepoort* e *Rockborn*, são utilizadas para a elaboração de vacinas contra a cinomose e as estirpes *Snyder Hill* e *R252* são utilizadas em experimentos de inoculação cerebral, em estudos da patogênese viral e em desafio pós-vacinal, pois possui grande potencial neurotrópico e imunossupressor (NEGRÃO et al., 2006; HARTMANN et al., 2007; MANGIA; PAES 2008). Essas três variedades (A75/17, R252 e Syder Hill) são altamente virulentas e neurotrópicas e as demais variam em suas habilidades em causar lesões no SNC (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

O agente viral da cinomose canina é relativamente lábil e possui pH menor que 4,5, é inativado pelo ressecamento e calor em 1 hora a 55° C e em 30 minutos a 60° C. Estando a uma temperatura de 20° C por 1 hora, este vírus ainda permanece viável, como também por 20 minutos nos exsudatos e por várias semanas entre 0 – 4° C. Permanece ainda estável durante meses a anos no estado congelado (LITFALLA et al., 2008).

A sua sobrevivência em tecidos excisados ou secreções é de pelo menos uma hora a 37° C e três horas a 20° C. Sua sobrevivência também é aumentada em temperaturas frias e a -65° C permanece viável por pelo menos sete anos (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

É inativado por detergente, solventes de lipídios, desinfetantes a base de amônia quaternária a 0,3%, durante 10 minutos, formol a 0,5%, durante 4 horas e fenol a 0,75%, durante 10 minutos (GREEN; APPEL, 2006; BARBOSA; PASSOS, 2008).

2.3 Epidemiologia

A cinomose canina é uma doença cosmopolita, que apesar de ocorrer em qualquer época do ano, (GREENE; APPEL, 2006) o maior número de casos ocorre no inverno, onde há um ambiente mais propício para a sobrevivência do vírus (GREENE; APPEL, 2006; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010).

O vírus da cinomose canina tem distribuição enzoótica mundial e dissemina-se muito rápido entre os cães não imunizados de qualquer sexo, raça ou idade, sendo mais comum em filhotes entre três a seis meses, por talvez não mais possuírem imunidade derivada da mãe (SANTOS, 2006; NELSON; COUTO, 2006; HARTMAN et al., 2007; BICHARD, 2008). O maior risco da disseminação do vírus é em local onde os cães são mantidos aglomerados (BICHARD, 2008), mantendo o vírus instável no ambiente (LITFALLA et al., 2008).

Os cães clinicamente acometidos apresentam as seguintes características: falta de vacinação ou falha no protocolo vacinal, vacinas inapropriadas, colostro da mãe com títulos inadequados de anticorpos, imunossupressão ou exposição a cães infectados (GREENE; APPEL, 2006).

Todos os animais que são infectados e desenvolvem a forma sintomática ou a forma assintomática da cinomose fazem parte da cadeia epidemiológica como fonte de infecção para animais suscetíveis (NEGRÃO et al., 2007a). De acordo com resultados de exames sorológicos, a taxa de animais infectados ou que tiveram contato com o vírus é maior que a de cães doentes e isso, deve-se a proteção natural contra o vírus (DEZENGRINI et al., 2007) e através de um exame molecular em reação de cadeia pela polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), identificou a presença do vírus em cães assintomáticos e não vacinados (DEL PUERTO et al., 2010).

A eliminação do vírus ocorre sete dias após a infecção, podendo durar de 60 a 90 dias após a exposição (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

A transmissão do VCC ocorre tanto pelo contato direto por aerossóis (GREENE; APPEL, 2006), pela exposição ao ar, como por urina, fezes, via placentária (ETTINGER; FELDMAN, 2008) por secreções e excreções, partículas infectantes, liberadas por animais infectados (LITFALLA et al., 2008; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Esses animais, podem ou não demonstrar

sinais clínicos (MARTINS et al., 2009), mas transmitem o vírus, via trato respiratório superior (GREENE; APPEL, 2006) disseminando-o principalmente em ambiente onde cães são mantidos em grupos (LITFALLA et al., 2008).

Com a exposição natural, o vírus se propaga por gotículas de aerossóis entrando em contato e ocorrendo a replicação primária, através da inalação, com o epitélio do trato respiratório superior (GREENE; APPEL, 2006; DE SWART et al., 2007; LEMON et al., 2011). A progressão da infecção depende da resposta imune do animal (BEINECKE et al., 2009).

A cinomose é endêmica em muitos países e desde a última década é considerada reemergente em vários locais que tinham a doença outrora controlada pela vacinação (BLIXENKRONE-MØLLER et al., 1994; GEMMA et al., 1996; EK-KOMMONEN, et al.; 1997; GRIOT et al., 2003; LAN et al., 2006; NORRIS et al., 2006; SCHODER et al., 2006; KAPIL et al., 2008). Surtos também têm ocorrido em todo o mundo, relacionados com intervalos inadequados na periodicidade da vacinação (GREENE, 2008), sendo alguns descritos em países como EUA, Japão, Finlândia e Alemanha (MANGIA; PAES, 2016), assim como relatos de alguns casos diagnosticados em locais em que a doença não ocorria, como a Nigéria (EZEIBE, 2005). A cinomose é endêmica no Brasil e apesar de ser responsável por um grande número de morte de cães vítimas da doença, em grandes centros urbanos, tem se comportado como doença controlada e aparece como surtos (MANGIA; PAES, 2016).

Além de cães domésticos, que representam o principal reservatório, os hospedeiros que são acometidos por esse vírus são os da Família Canidae como raposa, dingo, coio, lobo e chacal; da Família Mustelidae como furão, vison, doninha, marta, cangambá, texugo e lontra; da Família Procyonidae como guaxinim, panda, jupará e quati; Família Felidae como exóticos, mas não os gatos domésticos (GREENE; APPEL, 2006; ORSINI; BONDAN, 2008; GREENE; VANDEVELDE, 2012). O vírus pode induzir a doença em outras espécies como focas, golfinhos e primatas não humanos (NELSON; COUTO, 2006; KUIKEN et al., 2006).

Também são suscetíveis ao vírus, gatos domésticos e suínos, embora não desenvolvam a doença clínica (GREENE; APPEL, 2006). Os ferrets são muito sensíveis ao VCC, podendo chegar a 100% de morbidade e mortalidade (MARTINS et al., 2009).

Embora possa afetar todas as idades, a maior suscetibilidade é de cães entre três e seis meses de idade, coincidindo com o período de diminuição dos anticorpos colostrais após o desmame (APPEL, 2010). Não há predisposição racial, no entanto, os cães braquicefálicos têm demonstrado menor prevalência, sequelas e mortalidade da doença que os dolicocefálicos (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Cães sem raça definida são mais infectados pelo vírus da cinomose, em comparação aos cães de raça. Isso se deve ao fato desses animais apresentarem maior chance de entrar em contato com as partículas virais proveniente de outros cães já infectados (MARTINS et al., 2009).

Depois de infectados, muitos cães são capazes de livrarem-se do vírus sem apresentar a doença. Apesar da maioria deles eliminarem completamente o vírus, alguns ainda o hospedam no SNC (GREENE e VANDEVELDE, 2012). É possível que cães com sinais de infecção apenas do SNC não eliminem o vírus para o meio ambiente (LAPPIN, 2006).

Animais selvagens reintroduzidos em área de soltura podem ser acometidos por doenças de animais domésticos residentes nas proximidades, devido à falta de adequação do sistema imune dos animais selvagens frente aos patógenos dos animais domésticos (DIAS-CATÃO, 2008).

A infecção humana foi descrita experimentalmente por Nicolle (1931), na forma assintomática e alguns autores sugerem a participação do vírus em doenças neuroendócrinas humanas, assim como esclerose múltipla (SIPS et al., 2007), doença de Paget, panencefalite esclerosante subaguda (MARTINS et al., 2009), mas isso ainda é questionável, até que os vírus envolvidos sejam completamente isolados e sequenciados (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

2.4 Patogenia

A cepa o título viral, a idade do animal e a resposta imune do hospedeiro, influenciam na patogênese e na gravidade da doença (BICHARD, 2008).

O VCC pode replicar-se em vários tipos celulares, mas as células linfoides e os macrófagos parecem ser mais suscetíveis. Após infectar essas células, o vírus se dissemina para células e órgãos linfoides como baço, timo, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, células estomacais, células de Küpffer, células mononucleares ao redor dos vasos pulmonares e bronquiais e medula óssea, onde infecta linfócitos maduros, causando apoptose e queda da imunidade, o

que contribui para o desenvolvimento de infecções secundárias, sendo a principal causa de morte e desfecho da doença (GREENE; APPEL, 2006; BARBOSA et al., 2008).

Quando o vírus é inalado, a infecção se inicia pelas vias respiratórias e oral, é absorvido pelos macrófagos respiratórios e orofaríngeos e após o transporte por estas células mononucleares circulantes, multiplica-se e espalha-se para as tonsilas e os linfonodos cervicais e bronquiais aos dois dias pós-infecção (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; DEWEY, 2008; TAYLOR, 2009; NOGUEIRA et al., 2009), estando presente na circulação sanguínea por até dez dias (NOGUEIRA et al., 2009).

De quatro a sete dias após a infecção, há replicação viral no baço, fígado, timo e tecido linfóide por todo organismo, com sinais de pirexia inicial e linfopenia (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; DEWEY, 2008; TAYLOR, 2009). Podem ser observados perda de apetite, prostração, descarga nasal e ocular e tonsilite (MARTELLA et al., 2008). Em seguida, a infecção se estende para os epitélios gastrointestinal, respiratório, urogenital, pele e SNC (SILVA et al., 2007).

O vírus atinge o tecido epitelial depois de um período de multiplicação nesses locais e os sinais clínicos referentes às lesões epiteliais começam a aparecer. Na primeira semana pós-infecção há uma proliferação viral nos órgãos linfóides, nas células B e T, associadas à leucopenia por linfopenia. Após cinco ou seis dias da infecção, a viremia atinge o pulmão, nasofaringe e mucosa conjuntival. Uma segunda viremia pode ocorrer entre o oitavo e décimo quarto dia, podendo ser observada até o vigésimo quarto dia. O estágio virêmico pode durar até seis semanas (BRAZ, 2009).

Possivelmente por via hematogênica ou através do líquido cerebrospinal, o vírus atinge o sistema nervoso, de oito a dez dias pós-infecção, desencadeando lesões neurológicas (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; DEWEY, 2008; TAYLOR, 2009; SILVA et al., 2009). O grau de envolvimento epitelial e nervoso vai variar de animal para animal, podendo ser mínimo em alguns casos e em outros ocorrem doenças respiratórias graves, conjuntivite, gastroenterite, hiperqueratose e encefalite (SILVA et al., 2009). Provavelmente em todos os animais, o vírus atinge o SNC, mesmo em casos em que os cães não manifestam sinais neurológicos e quando os sinais sistêmicos evoluem para manifestação neurológica, possivelmente ocorre falha da resposta imune do

hospedeiro em eliminar o vírus (NELSON; COUTO, 2006; BIRCHARD, 2008; SILVA et al., 2009).

Devido à doença polissistêmica, os cães com baixa resposta imune, morrem a partir de nove a quatorze dias pós-infecção. O animal pode se recuperar e apresentar os sinais típicos da cinomose, se a resposta imune for moderada, mas apresentar encefalomielite desmielinizante crônica, tendo início retardado dos sinais clínicos nervosos. O cão afetado elimina o vírus e não se torna sintomático se tiver boa resposta imune (NELSON; COUTO, 2006; BIRCHARD, 2008). Quando há elevação da taxa de anticorpos pode haver a eliminação do vírus da maioria dos tecidos, exceto o tecido uveal, tegumento e neurônios (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

À medida que a doença progride e o cão desenvolve algum grau de imunidade, o vírus então é eliminado dos tecidos linfoides e da região cerebral e posteriormente eliminado de todos os tecidos, mas ainda pode persistir por períodos mais longos no SNC, contribuindo para o desenvolvimento dos sinais nervosos de um cão muito tempo depois de ele ter se recuperado dos efeitos sistêmicos do vírus (BRAZ, 2009).

O período de incubação pode variar de uma a quatro ou mais semanas (MARTELLA et al., 2008). A eliminação do vírus ocorre através de secreções respiratórias e oculares por até noventa dias após sua infecção (OLIVEIRA et al., 2009).

2.5 Imunopatogênese

O VCC possui linfotropismo o que resulta em linfopenia, tanto linfócitos B quanto T, por outro lado a trombocitopenia é causada pela infecção pelo VCC e está relacionada à liberação de complexos VCC-IgG-plaqueta do fígado para a circulação.

A predileção por linfócitos é devido à ligação seletiva da proteína H, presente no VCC com os receptores CD150/SLAM nos linfócitos; após essa ligação o vírus invade a célula o que possibilita uma rápida disseminação viral (KRAKOWKA et al., 1980; VON MESSLING et al., 2006). Quando em infecção aguda acredita-se que, ocorra linfocitose, o que facilita a infiltração via receptor

SLAM e replicação viral no SNC pelos linfócitos infectados (WENZLOW et al., 2007).

Apesar disso, de acordo com Alves et al. (2015) demonstraram que a infecção das células neurais ocorre pela ligação do vírus a um terceiro tipo de receptor “hitherto” indefinido denominado de GliaR, induzindo a uma infecção não citolítica persistente.

Embora o mecanismo de indução da imunossupressão ainda não tenha sido elucidado por completo sabe-se que, a replicação viral leva a uma supressão da resposta imune do hospedeiro. Como a citólise não é o único motivo da imunossupressão especula-se que seja multifatorial (KRAKOWKA et al., 1980; BEINEKE et al., 2009).

Nesse sentido, Krakowka et al. (1987b); YU et al. (2008), sugerem que a imunossupressão pode estar associada também à redução da produção de IL-1e IL 10 por macrófagos e monócitos e síntese elevada de prostaglandina-E2 (PGE2), agente imunossupressor impedindo a secreção de fatores por Th1 e Th 2. Isso gera uma redução na apresentação de antígenos pelos monócitos o que reduz o número de linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos e consequentemente a redução na produção de anticorpos.

2.6 Neuropatogenia e desmielinização

Nos últimos anos, progressos substanciais na compreensão dos mecanismos patogénéticos do Morbillivírus canino foram feitos. Investigações in vivo e in vitro forneceram novas ideias sobre sua patogênese, com ênfase especial na interação axônio-mielina-glia, potenciais mecanismos endógenos de regeneração e plasticidade astrogliar. O Morbillivirus canino é caracterizado por causar lesões com um grau variável de desmielinização e inflamação mononuclear acompanhada por uma orquestração desregulada de citocinas, bem como metaloproteinases de matriz e seus inibidores (MACHADO et al.; 2013; LEMPP, et al.; 2014)

O vírus infecta células do sistema nervoso como: neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células da micróglia, células endimárias e células do plexo coróide. (BEINEKE et al., 2009). A virulência e o estado do hospedeiro interferem na infecção uma vez que as a variedade da estirpe do VCC se reflete na

localização e intensidade das lesões no SNC, pois existe uma variação do tropismo viral. Como, por exemplo, a estirpe Snyder Hill infecta preferencialmente neurônios e geram lesões graves na substância cinzenta, mas pouca desmielinização, já as estirpes A75/17 e R252 possuem tropismo por células da glia, provocando uma desmielinização expressiva (SUMMERS et al., 1984a; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Além disso, a idade influencia no desenvolvimento e a eficiência do sistema imunológico o que interfere também na intensidade do quadro clinicopatológico (KRAKOWKA; KOESTNER, 1976). Cães jovens e de idade entre 11 e 13 anos tem maior susceptibilidade de infecção (McGRATH, 1960; VANDEVELDE et al., 1982b). Os cães susceptíveis são infectados por via aerógena ou por ingestão de gotículas infectantes (GILLESPIE, 1962; GREENE; APPEL, 2006).

A neuroinvasão ainda não está bem descrita na literatura, o que está determinado até o momento é que a neuroinvasão ocorre pela via hematogena e é disseminado pelo líquido cefalorraquidiano (LCR) (VANDEVELDE et al., 1985; KRAKOWKA, 1989; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). O VCC infecta as células endoteliais e a subsequente infecção dos astrócitos ocorre via espaço subaracnóide, pois a barreira hematoencefálica está lesionada devido à vasculite ou também após citólise das células infectadas do plexo coroide (KRAKOWKA et al., 1987a; KRAKOWKA, 1989).

Segundo Rudd et al. (2006) a invasão do vírus também pode ocorrer via nervo olfatório em furões. Uma vez que os dendritos dos neurônios olfatórios estão em contato íntimo com as células epiteliais respiratórias, possibilitando a transição do vírus entre essas células e então disseminação do vírus para outras estruturas do encéfalo. Embora essa via de infecção não tenha sido comprovada em cães, a similaridade entre o curso da doença entre furões e cães indica a possibilidade de infecção por essa via nesses animais (RUDD et al., 2006).

As alterações iniciais da mielina ocorrem durante um período de imunossupressão grave na ausência de inflamação (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995). A desmielinização ocorre após infecção das células neurais, (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995). Mecanismos que envolvem a excitotoxicidade pelo aumento da transmissão glutamatérgica contribuem para as lesões no tecido nervoso (BRUNNER et al., 2007).

A maioria dos estudos que foca em descrever a patogenia da desmielinização relata que os oligodendrócitos raramente são infectados pelo VCC, apesar da presença de nucleocapsídeos virais, o que não pode estar associadas à infecção direta pelo vírus (HIGGINS et al., 1982a; ZURBRIGGEN; VANDEVELDE, 1983; BLAKEMORE et al., 1989; ZURBRIGGEN et al., 1987; GRABER et al., 1995; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; SCHOBESBERGER et al., 2002). Embora a susceptibilidade dos oligodendrócitos à infecção pelo VCC seja baixa, as alterações degenerativas ocorrem quando essas células são infectadas (GRABER et al., 1995).

Sendo assim, os autores sugerem que as alterações degenerativas dos oligodendrócitos resultam de uma infecção viral incompleta, sem produção de proteína viral, mas com modificação na expressão de vários genes, particularmente dos responsáveis pela codificação das proteínas produtoras de mielina, mas não comprova que os oligodendrócitos sofrem degeneração (ZURBRIGGEN et al., 1983; ZURBRIGGEN et al., 1987; ZURBRIGGEN et al., 1993b; GRABER et al., 1995; ZURBRIGGEN et al., 1998).

O consenso entre autores mostra que desmielinização na cinomose seja um processo bifásico (SUMMERS; APPEL, 1994). Em um primeiro momento na fase inicial a desmielinização ocorre por ação direta do vírus sobre as outras células do SNC, como os neurônios e células da neuroglia, e a degeneração nos oligodendrócitos ocorre de forma secundária (ZURBRIGGEN et al., 1986; MUTINELLI et al., 1988; ZURBRIGGEN et al., 1998; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN et al., 2005). Em um segundo momento, durante a progressão da doença as lesões desmielinizantes parecem ser influenciadas por ação do sistema imune que podem agravar e acelerar a destruição da mielina nos estágios mais avançados da doença (VANDEVELDE et al., 1981; SUMMERS; APPEL, 1994; SEEHUSEN et al., 2007).

A maioria das células infectadas pelo VCC no SNC são astrócitos (HIGGINS et al., 1982b; MUTINELLI et al., 1988; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995). Na fase aguda da cinomose, quando lesões inflamatórias são ausentes, quase 65% dos astrócitos presentes nas lesões estão infectados pelo VCC, e essa população de células representa 95% de todas as células infectadas (MUTINELLI et al., 1988). Os astrócitos desempenham a função de manutenção da homeostasia do tecido nervoso, e qualquer alteração nesse tipo

celular influência a desmielinização (VANDEVELDE et al., 1983; VANDEVELDE et al., 1985).

Os neurônios não são primariamente infectados pelo VCC, portanto, a distribuição e a natureza das lesões diferem das observadas na maioria das outras encefalites, já que o VCC apresenta maior afinidade pelos tecidos mielinizados do SNC (GEBARA et al., 2004).

Apesar de décadas de pesquisa, vários novos aspectos da neuropatogênese do *Morbillivírus* canino foram descritos. Outro achado inesperado refere-se ao aparecimento de células bipolares positivas para neurotrofina p75 (NTR) durante a leucoencefalite desmielinizante. Como p75NTR é um protótipo de células imaturas de Schwann, esse achado sugere que a remielinização de células de Schwann pode representar um mecanismo endógeno de regeneração até agora subestimado. Embora seja bem conhecido que os astrócitos representam o principal alvo da infecção pelo vírus da cinomose na leucoencefalite desmielinizante a detecção de astrócitos positivos para vimentina infectados em lesões crônicas indica um papel crucial desta população de células na cinomose nervosa.

Enquanto a proteína glial fibrilar ácida representa a característica filamento intermediário de astrócitos maduros, a expressão de vimentina é geralmente restrita a astrócitos imaturos ou reativos. Assim, os astrócitos positivos à vimentina podem constituir uma importante população de células para a persistência e disseminação do vírus, bem como a progressão da lesão. Modelos in vitro, tais como culturas de células gliais dissociadas, bem como culturas de fatias cerebrais organotípicas contribuíram para uma melhor compreensão dos mecanismos de infecção e certos aspectos morfológicos e moleculares da leucoencefalite desmielinizante. Estudos in vivo e in vitro revelaram notáveis novos aspectos da cinomose nervosa. Essas novas percepções melhoraram substancialmente a compreensão da patogênese da desmielinização e podem representar novos pontos de partida para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (LEMPP et al.;2014)

2.7 Sinais clínicos

A transmissão viral da cinomose ocorre através de aerossóis e progressão da doença é influenciada por diversos fatores como virulência do vírus, condições ambientais, idade dos animais, resistência individual, falta de vacinação, doses incompletas, vacinas inapropriadas, colostro da mãe com títulos inadequados de anticorpos, imunossupressão e história de exposição a cães infectados (APPEL et al., 1981; GREENE, 2006; O'BRIEN; COATS, 2010; PRATELLI, 2011).

O animal apresenta sinais multissistêmicos muito variáveis, como alterações respiratórias, gastrointestinais, dermatológicas, oftálmicas e neurológicas (O'BRIEN; COATS, 2010). Os sinais podem ocorrer sequencialmente, simultaneamente ou isoladamente (SILVA et al., 2009).

A fase aguda, devido à perda da imunidade passiva, é mais comum em animais de quatro a seis meses de idade e dentre os sinais, observa-se imunodepressão, secreção nasal e ocular serosa a mucosa, apatia, desidratação, anorexia, perda de peso, caquexia, debilidade, febre, sinais respiratórios, gastrointestinais e oculares, lesões cutâneas, hipoplasia do esmalte dentário e hiperqueratose dos coxins plantares e do espelho nasal (devido a infecções das células basais do epitélio). Estes são os principais sinais extraneurais (FLORES, 2007; BIRCHARD, 2008; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Inicialmente após a infecção ocorre o primeiro pico febril, correspondente à distribuição do vírus pelos órgãos linfoides (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Alguns animais podem apresentar febre associada à leucopenia, sendo ambas temporárias. Neste período inicial, os sinais clínicos são percebidos com mais intensidade, podem ainda ser acompanhados de rinite e conjuntivite (MANGIA, 2008; TILLEY; SMITH, 2008).

Após quatorze dias de exposição viral, os cães que possuem resposta celular e humoral intensas, se recuperarão do quadro clínico ou permanecerão subclínicos, devido à neutralização, inibição ou eliminação do vírus pelos anticorpos específicos. Em animais com resposta intermediária, não há sinais multissistêmicos, mas poderão apresentar encefalomielite crônica com retardo do início dos sinais neurológicos. Nestes casos, o vírus se espalha pelo epitélio

tecidual e a infecção pode ser resolvida quando os títulos de anticorpos aumentarem. Quando a resposta imune é falha ou inexistente, a infecção se torna multissistêmica e os sinais clínicos são graves, especialmente neurológicos, resultando em um segundo pico febril, podendo levar a morte aguda do animal em duas e quatro semanas (GREENE; APPEL, 2006; TILLEY; SMITH, 2008; LITFALLA et al., 2008; ORSINI; BORDAN, 2008).

A presença do vírus no SNC depende da magnitude da viremia (AMUDE et al., 2007). Os sinais neurológicos ocorrem entre uma e três semanas pós-recuperação dos sinais sistêmicos, sendo progressivos e de prognóstico desfavorável, variando da extensão e cronicidade das lesões e da área afetada no SNC (MARTELLA et al., 2008; TAYLOR, 2009).

Após semanas ou meses da recuperação da forma aguda ou após a recuperação de infecções inaparentes, os sinais neurológicos podem aparecer, com mioclonia ou espasmo dos flexores. Para os cães que sobrevivem ao vírus, há grandes chances de ficarem com sequelas neurológicas permanentes, como espasmos nos flexores e disfunções visuais e olfatórias (ETTINGER; FELDMAN, 2008).

Alterações oftálmicas são representadas por lesões que o vírus causa ao nervo óptico, gerando cegueira, midríase, não reagindo aos estímulos luminosos. As lesões da retina são causadas por degeneração e necrose com deslocamento focal ou total. Há o aparecimento de lesões crônicas, circunscritas, hiperreflexivas, atróficas da região retiniana, chamadas de “medalhões dourados”. Há ainda congestão, edema e tumefação, uveíte, neurite óptica e retinocoroidite. Devido ao comprometimento da glândula lacrimal, o animal pode apresentar ceratoconjuntivite seca, e consequente desconforto, diminuição da produção aquosa, destacado por gordura e muco (NELSON; COUTO, 2015). Ainda é encontrada conjuntivite purulenta. (FLORES, 2007; BIRCHARD, 2008).

No sistema respiratório pode haver presença de tosse seca ou produtiva (GREENE; APPEL, 2006; SILVA et al., 2007), podendo ser auscultados crepitações nos pulmões (GREENE; APPEL, 2006), pneumonia, secreção nasal, secreção ocular, dispneia, febre de 41° C, inflamação na faringe, nos brônquios e aumento das tonsilas (SILVA et al., 2007). Quando há replicação viral no sistema respiratório inferior, o animal pode apresentar pneumonia intersticial,

progredindo para broncopneumonia generalizada, agravada pela infecção bacteriana secundária (dentre as bactérias estão a *Bordetella bronchiseptica* e *Mycoplasma* sp.) (NELSON; COUTO, 2010), levando a tosse úmida e produtiva, taquipneia, dispneia e febre (AMUDE et al., 2006; SILVA et al., 2007; LÓPES, 2007; CHVALA et al., 2007; CARVALHO et al., 2012; DIAS et al., 2012).

Sinais gastrointestinais como vômito e diarreia e respiratórios como secreção nasal e rinite costumam vir em seguida, agravados por infecções bacterianas secundárias (TILLEY; SMITH, 2008). Há inflamação da mucosa do intestino e estômago, causando enterite e gastrite respectivamente, com consequentes episódios de vômito, diarreia que podem ser mucosanguinolenta e perda de peso, o que pode levar a desidratação (MARTINS et al., 2009; DIAS et al., 2012). Anorexia, febre e predisposição a infecções bacterianas secundárias também são observados nas fases aguda e subaguda (QUINN et al., 2005; SILVA et al., 2007; FLORES, 2007; BIRCHARD, 2008; ETTINGER; FELDMAN, 2008).

A hipoplasia de esmalte, caracterizada por manchas marrons escuras ao redor do esmalte do dente, devido à exposição da dentina, (GELBERG, 2007), pode acometer animais infectados durante o desenvolvimento de sua dentição permanente, deixando esses dentes predispostos à doença periodontal (FLORES, 2007; NELSON; COUTO, 2015).

No sistema tegumentar, o animal é acometido por exantema cutâneo, com pústulas abdominais, hiperqueratose dos coxins podais e focinho, sinais considerados tardios da evolução da doença (AMUDE et al., 2006; SILVA et al., 2007; FLORES, 2007; BIRCHARD, 2008; GREENE; VANDEVELDE, 2012; CARVALHO et al., 2012; SILVA et al., 2015).

Os sinais podem ser exacerbados por infecções bacterianas (FAWI et al., 1971; HEADLEY et al., 1999) e protozoárias (MORETTI et al., 2002) secundárias. O VCC pode atingir diretamente o pulmão causando uma pneumonia viral, devido a seu efeito imunodepressor ou levando a associação com outros vírus como o *adenovírus tipo II* e o vírus da *parainfluenza* (TOVAR et al., 2007; CHVALA et al., 2007) ou ainda com infecções secundárias (LÓPES, 2007). As pneumonias causadas por *Bordetella bronchiseptica* ou *Mycoplasma* sp. podem acontecer como infecções pulmonares primárias e como secundárias

em animais acometidos pelo vírus da cinomose canina (LÓPES, 2007; CHVALA et al., 2007).

Miosite e radiculoneurite são causadas por infecções combinadas de cinomose canina e *Toxoplasma gondii* ou *Neospora caninum* (GREENE; APPEL, 2006). Isso se dá através da imunossupressão que permite a infecção desses agentes oportunistas. A toxoplasmose é caracterizada por sinais neuromusculares, respiratórios e gastroentéricos ou por infecções generalizadas associada com sinais neurológicos (MORETTI et al., 2006).

2.8 Sinais do sistema nervoso

Entre os principais sinais neurológicos da cinomose canina pode-se observar apatia, convulsão, distúrbios comportamentais, vocalização, déficit dos nervos cranianos, sinais cerebelares e vestibulares, paraplegia ou tetraplegia, atrofia muscular, hiperestesia, mioclonia e coma (SILVA, 2009; MARTELLA et al., 2008; AMUDE et al., 2006).

A manifestação clínica neurológica observada durante a infecção pelo VCC varia de acordo com a região do SNC acometido pelo vírus, e pode não apresentar correlação clínica com a extensão das lesões (SILVA, 2009). Além disso, estes sinais podem aparecer isoladamente ou associados a sinais sistêmicos, podendo ocorrer simultaneamente ou após a recuperação clínica sistêmica (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Porém, independente da neurolocalização do VCC, a lesão da substância branca e cinzenta pode resultar em uma variedade de sinais neurológicos focais ou difusos, agudos ou crônicos e progressivos (MARTINS, 2016; AMUDE et al., 2007).

As convulsões são caracterizadas por atividade elétrica hiperssincrônica dos neurônios do córtex cerebral (AMUDE et al., 2007). Podem ser parciais ou tônico-clônicas generalizadas, dependendo da extensão do acometimento do prosencéfalo e estão associadas a lesões no lobo temporal e piriforme (McGRATH, 1960).

Os sinais vestibulares como hipermetria, ataxia do tronco e cabeça sem presença de paresia, nistagmo, estrabismo posicional e andar em círculos indicam uma disfunção cerebelar (DEWEY, 2006; SILVA, 2009). Estes sinais geralmente ocorrem associados a alteração do estado mental, paresia ipsilateral,

déficits nas reações posturais e nos nervos cranianos do III ao XII pares (MARTINS, 2006). Segundo Amude et al. (2007), as lesões cerebelares em regiões específicas demonstram um vestibulopatia paradoxal, onde a inclinação de cabeça ou andar em círculo são contralaterais à lesão.

Quando ocorre lesão do tronco encefálico em nível de mesencéfalo e bulbo, o animal pode apresentar graves distúrbios de consciência, ataxia, paresia ou paraplegia (DEWEY, 2006; SILVA, 2009). Alguns autores ainda citam lesões nos nervos trocleares e trigêmeo, onde se observa anisocoria e estrabismo, e atrofia muscular da cabeça, respectivamente (CHRISMAN, 2005). McGrath (1960) cita que a ataxia cerebral está relacionada com disfunção extrapiramidal e lesões em regiões mais craniais do tronco encefálico.

De Lahunta et al. (2015) relatam que as disfunções motoras ocorrem devido a lesão dos núcleos ou axônios dos neurônios motores superiores ou inferiores a nível do tronco encefálico, medula espinhal ou nervos periféricos. Lesão dos núcleos dos neurônios motores inferiores nas intumescências braquial e lombosacral ou dos nervos periféricos resultam em paresias com diminuição dos reflexos espinhais (DE LAHUNTA et al., 2015).

A alteração do estado mental como o coma e esturpor, ocorre devido às lesões no tronco encefálico e diencéfalo (De LAHUNTA et al., 2015; DEWEY, 2006; MARTINS, 2016). Já as lesões no hipotálamo não são observadas com frequência em cães infectados com VCC (McGRATH, 1960).

A vocalização, muito comum em casos de cinomose, ocorre devido a uma lesão no prosencéfalo (De LAHUNTA et al., 2015). Pode estar acompanhada de confusão mental e delírio, porém pode ocorrer também como manifestação de dor devido a inflamação nas meninges (MARTINS, 2016; De LAHUNTA et al., 2015).

Sinais clínicos como andar em círculos ou andar compulsivo estão relacionados com lesões nos núcleos basais e déficit cortical, ou ainda nas áreas motoras frontal e pré-frontal (McGRATH, 1960; SILVA, 2009)

Outros sinais neurológicos relacionados ao déficit cortical são a alteração do estado mental, convulsões, distúrbios comportamentais (agressividade, vocalização e apatia) e pressão da cabeça contra objetos (AMUDE et al., 2006; DEWEY, 2006).

A automutilação pode estar relacionada às lesões no córtex do lobo parietal e nos feixes sensitivos da medula espinhal e do tronco encefálico (CHRISMAN, 2005).

A mioclonia é um sinal neurológico comum em animais com cinomose, porém embora seja considerada como um sinal patognomônico por alguns pesquisadores, pode ser observada também em outras doenças ou relacionadas a síndromes raras onde há degeneração esponjosa no SNC (GREENE; APPEL, 2006; LORENZ; KORNEGAY, 2006).

Embora o mecanismo da mioclonia não esteja totalmente elucidado, Chrisman (1985) e Summers et al. (1995) sugerem que lesões no neurônio motor inferior focais na substância cinzenta da medula espinhal podem desencadear os movimentos musculares involuntários. McGrath (1960) ainda cita que, a mioclonia dos músculos temporais, estejam relacionados a lesões do nervo trigêmeo.

Síndromes clínicas são descritas na cinomose canina: encefalomielite dos cães jovens, encefalomielite multifocal dos cães adultos, encefalite do cão idoso, encefalite pós-vacinal e encefalomielite desmielinizante crônica recidivante dos cães adultos (HARTLEY, 1974; HIGGINS et al., 1989; BRAUND, 1994; SUMMERS et al., 1995; NESSELER et al., 1997; HEADLEY et al., 2009). Clinicamente são diferenciadas pela idade dos animais acometidos, sinais clínicos manifestados, curso da doença, estirpe viral e padrão histopatológico (SUMMERS et al., 1995).

A *Encefalomielite de cães jovens* é uma encefalite aguda que ocorre no início da infecção em cães jovens ou animais imunossuprimidos, sendo caracterizada pela replicação viral direta, causando lesões multifocais na massa branca e cinzenta, acompanhadas de sinais clínicos sistêmicos (BRAZ, 2009).

A encefalomielite dos cães jovens é considerada de caráter agudo e grave, pode haver presença ou não de doença sistêmica, sendo caracterizada principalmente pela desmielinização (AMUDE et al., 2006).

As manifestações neurológicas são caracterizadas por espasmos semelhantes aos da epilepsia, mudança de personalidade, como depressão e desorientação, hipermetria, quedas, cabeça inclinada, monoplegia ou paraplegia, (GREENE; APPEL, 2006), mioclonias ou contrações involuntárias dos músculos, convulsões, ataxia, incoordenação, rigidez muscular,

hiperestesia, deambulação em círculos, vocalização e cegueira. Isso se deve a desmielinização, causada pelo vírus aos oligodendrócitos e astrócitos, ou reações imunes contra o vírus, aumentando a lesão da mielina (SILVA et al., 2007; ETTINGER; FELDMAN, 2008).

A *Encefalomielite de cães adultos* é uma encefalomielite multifocal dos cães adultos é considerada de caráter subaguda e caracteriza-se por inflamação não supurativa leve a moderada, sendo acompanhada de desmielinização, que é secundária a persistência do vírus (GREENE; APPLE, 2006).

Em geral, acomete cães de quatro a oito anos de idade, sendo uma enfermidade lentamente progressiva, com curso clínico de mais de um ano. Os sinais clínicos são debilidade dos membros pélvicos, incoordenação, inclinação da cabeça, nistagmo, paralisia facial e tremores na cabeça não acompanhados de mioclonia, respostas deficientes a ação de ameaça. Convulsões generalizadas e mudanças de personalidade não são sinais desta doença. Apesar de continuarem alerta, os cães podem apresentar paralisia (SILVA et al., 2007).

A *Encefalite de cães idosos* é uma encefalite crônica que ocorre por meio de um processo imunopatológico vírus independente, acometendo as células dendríticas através de uma reação do imunológica, resultando em um mecanismo patogênico de desmielinização (BRAZ, 2009).

Na encefalite dos cães idosos as lesões são crônicas caracterizadas por inflamação moderada e acentuada malácia. Essas lesões crônicas se devem as tentativas do organismo em eliminar o vírus do Sistema Nervoso Central (GREENE; APPLE, 2006).

É um distúrbio raro que acomete cães com mais de seis anos de idade. A principal característica é a panencefalite esclerosante subaguda. Deficiência visual e respostas bilaterais deficientes às ações de ameaça são os principais sinais clínicos. Com o avanço da doença os cães ficam deprimidos, andam em círculos ou têm o hábito de comprimir a cabeça contra objetos, não havendo resposta aos estímulos normais do seu ambiente, mudam a personalidade e passam a não reconhecer mais os donos (GREENE; APPEL, 2006; MANGIA, 2008; ETTINGER; FELDMAN, 2008). Assemelha-se a panencefalite esclerosante subaguda desenvolvida em humanos adultos infectados na infância pelo vírus do sarampo (ORSINI; BORDAN, 2008).

A morte ocorre por coma ou durante as convulsões ou ainda por causas secundárias como ataxia, anorexia prolongada, decúbito causando grave pneumonia hipostática, paresia ou paralisia entérica ou visceral, alterações metabólicas gerais (SEEHUSEN et al., 2007).

A *Encefalite pós-vacinal* é uma encefalite pós-vacinal canina é uma doença rara e ocorre em jovens animais, sobretudo aqueles com menos de seis meses de idade. A patogênese desta doença não é clara, mas acredita-se que esteja associada à vacinação usando cepas vivas do VCC. Pode ocorrer entre uma a duas semanas após a vacinação dos cães e pode resultar de atenuação insuficiente do vírus da vacina, causando subsequente e latente infecção no SNC, desencadeada pela vacinação ou uma suscetibilidade aumentada do animal (AMUDE et al., 2006).

2.9 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos do animal, sendo este, desafiador, principalmente quando não há mioclonias e outros sinais sistêmicos associados aos sinais neurológicos (TIPOLD et al., 1992; KOUTINAS et al., 2002). A doença deve ser considerada, como diagnóstico diferencial em áreas endêmicas e em cães que apresentem alterações neurológicas (AMUDE et al., 2012). Sendo assim, exames laboratoriais para um diagnóstico definitivo são necessários (HIRSH; ZEE, 2009). Cada exame possui vantagens e desvantagens, seja no custo do processamento ou no tempo previsto para o laudo (ETTINGER; FELDMAN, 2008). O diagnóstico clínico é realizado pela anamnese juntamente com exames complementares (hematológico, avaliação do líquido cefalorraquidiano, métodos sorológicos, corpúsculo de inclusão, bioquímico, imunológicos, imunocromatográfico e histopatológico), sendo estes muitas vezes inconclusivos. Recentemente os métodos moleculares permitem uma maior acurácia no diagnóstico da doença (AMUDE et al., 2007; MANGIA; PAES, 2016).

2.9.1 Diagnóstico clínico

O grupo de sinais clínicos facilita o diagnóstico, mas não é conclusivo, uma vez que não há um sinal patognomônico. O histórico de cães jovens não vacinados ou de cães adultos com protocolo vacinal inadequado são sinais indicativos de cinomose, assim como febre, sinais respiratórios, digestivos e neurológicos, hiperqueratose nasodigital, linfopenia, coriorretinite, corrimentos oculonasais mucopurulentos (ETTINGER; FELDMAN, 2008).

Os sinais sistêmicos podem ou não preceder ou acompanhar uma doença neurológica multifocal, associada à idade e a condição de imunização do animal. Movimentos mioclônicos, frequentemente presentes, auxiliam na caracterização clínica (LAPPIN, 2006). Contudo, os critérios devem ser considerados com cautela, uma vez que a fase neurológica pode ocorrer com a ausência de sinais sistêmicos e de mioclonia, e os sinais neurológicos manifestados apenas focalmente (AMUDE et al., 2007).

O diagnóstico ainda pode ser estabelecido de acordo com o histórico, a raça, a idade, os sinais neurológicos, a evolução dos sinais e os resultados de exames complementares (DEWEY, 2008; LAPPIN, 2010; O'BRIEN; COAST, 2010).

2.9.2 Diagnóstico laboratorial

2.9.2.1 Hematologia

Observa-se anemia devido à destruição de eritrócitos pela presença do vírus, pela deposição de imunocomplexos na membrana do eritrócito ou pela diminuição da produção devido à falência da medula óssea, causada pelo estresse desencadeado pela doença (SILVA et al., 2005).

No início da doença, as anormalidades hematológicas são linfopenia e trombocitopenia (SANTOS, 2006; ETTINGER; FELDMAN, 2008; BIRCHARD, 2008; NELSON; COUTO, 2015). Logo depois, há leucocitose com neutrofilia, devido às infecções secundárias, tais como pneumonia (BARBOSA et al., 2011). No entanto, um dos principais achados de hemograma é a neutropenia (com redução do número de neutrófilos segmentados) (SANTOS, 2006; ETTINGER; FELDMAN, 2008; BIRCHARD, 2008; NELSON; COUTO, 2015).

Os cães que apresentam apenas sinais nervosos da cinomose vão apresentar leucograma normal ou leucopenia três a seis dias após a infecção, devido à linfopenia causada pelo vírus nas células linfoides (linfócitos B e T). Observa-se linfopenia, monocitose e discreta neutrofilia, podendo haver leucocitose devido à infecção bacteriana secundária (GREENE; VANDEVELDE, 2012). A trombocitopenia provavelmente é do tipo imunomediada, com remoção das plaquetas pelo sistema retículo endotelial (LOPES JÚNIOR, 2006).

2.9.2.2 Bioquímica sérica

Os achados são inespecíficos, mas pode ocorrer hipoalbuminemia, sobretudo, em filhotes infectados antes do nascimento ou neonatos com imunossupressão persistente causada pelo vírus ou hiperglobulinemia (GREENE; APPEL, 2006). As lesões no epitélio intestinal causadas pelo vírus, com consequente diarreia, além de apatia, causam hiporexia ou anorexia no animal. Consequentemente, a diminuição da ingesta proteica e o comprometimento intestinal são fatores determinantes na redução dos níveis séricos de albumina (SILVA et al., 2007).

2.9.2.3 Pesquisa de inclusão viral

Os corpúsculos de inclusão conhecidos como corpúsculos de Lentz intracitoplasmáticos ou intranucleares são encontrados em diversos tecidos de cães com cinomose canina (BRAZ, 2009). São visualizados a partir de esfregaços sanguíneos, no líquido e em impressões das mucosas nasal, prepucial, vaginal e conjuntival (WEISS; WARDROP, 2010; GREENE; VANDEVELDE, 2012). São compostos por agregados de nucleocapsídeos e restos celulares resultantes da ação vírica (BRAZ, 2009).

Estes corpúsculos podem ser observados, através da microscopia, no estômago, no epitélio de brônquios e bronquíolos dos pulmões, na vesícula urinária, na pelve renal, na conjuntiva, nos coxins digitais, baço, linfonodos, tonsilas, macrófagos, no SNC (SONNE, 2008), hemácias ou leucócitos, definindo o diagnóstico. Essas inclusões são encontradas principalmente em neutrófilos de animais infectados incluindo os animais vacinados recentemente (MANGIA, 2008). No SNC o vírus causa lesões caracterizadas por áreas de

necrose bem delimitadas, desmielinização e inclusões intranucleares em astrócitos (GREENE; APPEL, 2006).

Esta pesquisa do corpúsculo de Lentz tem baixo custo e resultado rápido, porém o vírus deve estar em mitose para ser detectado (SILVA et al., 2005).

2.9.2.4 Isolamento viral

Como diagnóstico *ante mortem*, pode ser realizado a inoculação de amostras clínicas (*swabes* de secreções corporais nasal, ocular, vaginal, conjuntival, líquido ou sangue) em células de linhagem (BRAZ, 2009). Culturas de macrófagos alveolares e linfócitos detectam o vírus em até 24 a 48 horas (GREENE; APPEL, 2006). A técnica de isolamento viral em cultivo celular é específica, mas é de difícil realização, podendo apresentar falso negativo se o animal não estiver na fase aguda da doença (MANGIA, 2008), como diagnóstico *post mortem*, podem ser utilizadas amostras de tecidos como pulmão e cérebro (GREENE; APPEL, 2006). O vírus encontra-se também em alta concentração no baço (ORSINI et al., 2007).

Pode-se observar como efeito citopático: lise celular, arredondamento celular, descolamento da monocamada, formação de sincício. A monocamada pode ser corada com cristal violeta e corpúsculos de inclusão podem ser visualizados de forma intranuclear ou intracitoplasmático (BRAZ, 2009).

2.9.2.5 Análise do líquido cefalorraquidiano

As características como coloração, aspecto, densidade, pH e glicose não indica qualquer anormalidade líquórica nas diferentes fases da cinomose, mas o componente proteico e a celularidade líquórica mostram alterações importantes na presença de sinais neurológicos (MANGIA, 2008; BICHARD, 2008).

Embora alguns cães com a infecção no SNC apresentem análise normal do LCR, essa técnica, pode auxiliar no diagnóstico da cinomose canina. Muitos animais apresentam pleocitose das células mononucleares (mais de 05 células mm³) e aumento na concentração de proteínas (superior a 25mg/dl), com predomínio de linfócitos (GREENE; VANDEVELDE, 2012; NELSON; COUTO, 2015).

Anticorpos no LCR são elevados em alguns cães com encefalite. Estes anticorpos são produzidos no local e este aumento não é encontrado em animais vacinados ou na cinomose sistêmica sem alterações neurológicas (AMUDE et al., 2007; MANGIA; PAES, 2008; NELSON; COUTO, 2015).

2.9.2.6 Técnicas sorológicas

Uma das técnicas é a de imunofluorescência, que pode ser executada de duas formas: Imunofluorescência direta (IFD) e Imunofluorescência indireta (IFI), (BRAZ, 2009), através de impressões do epitélio respiratório, conjuntiva palpebral, prepúcio, vagina, tonsila, bexiga, sedimento de urina, medula óssea, estômago, duodeno, pulmão e encéfalo. A técnica de imunofluorescência direta é um dos métodos mais sensíveis e específicos na detecção de antígenos virais, mas, em geral, somente detectada no início da infecção, antes do aparecimento dos sinais neurológicos (ELIA et al., 2008).

O teste de ELISA – ensaio imunoenzimático detecta os títulos de anticorpos contra o VCC podem ficar por vários meses após a vacinação, infecção clínica e subclínica. As imunoglobulinas M (IgM), vírus-específicas, podem persistir por pelo menos três meses após a infecção, usadas como marcador de infecção recente (DEZEGRINI et.al., 2007; MARTELLA et al., 2008). Na fase aguda da doença, os métodos sorológicos, soro IgG ou IgM específicos para o vírus, são importantes diagnósticos, mas podem indicar infecções passadas e presentes, de um animal vacinado ou não contra cinomose. Na fase crônica da infecção do SNC, para mensurar os anticorpos, pode ser analisado os níveis de IgG específica no líquido (MANGIA, 2008; BIRCHARD, 2008).

A imunoistoquímica detecta antígenos virais e reações provocadas pelo vírus em astrócitos, que sofrem bastante com a ação desmielinizante (ORSINI et al., 2007). Os resultados são mais satisfatórios na fase aguda da doença (BRAZ, 2009).

2.9.2.7 Diagnóstico molecular

2.9.2.7.1 Hibridização *in situ* (ISH)

Esta técnica detecta o mRNA do vírus da cinomose canina em tecidos como cérebro, linfonodos, coxins digitais (D'INTINO et al., 2006).

O genoma viral pode ser detectado em amostras biológicas frescas ou amostras conservadas por meio de sondas radioativas como radioisótopos ou não radioativas como enzimas (SANTOS et al., 2008).

2.9.2.7.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Dentre os métodos moleculares encontra-se o RT-PCR convencional, técnica qualitativa que identifica a presença ou ausência do vírus e o RT-PCR em tempo real, técnica quantitativa que identifica a carga viral presente na amostra. Além destes ainda pode ser realizado *nested* PCR com maior sensibilidade. Os materiais que podem ser coletados para análise são, sangue periférico, *swab* conjuntival e vaginal, secreção nasal, urina, LCR (GREENE; VANDEVELDE, 2012)

A sensibilidade do teste pode variar de acordo com o *primer* utilizado, o método de extração do RNA e o tipo de amostra clínica testada, considerando também que a amostra pode apresentar baixo nível de RNA (FRISK et al., 1999). Amostras do líquido cefalorraquidiano podem apresentar baixa celularidade levando a resultados falso-negativos no teste, mesmo quando o animal apresenta sinais neurológicos (NEGRÃO et al., 2007). Para aumentar a sensibilidade do teste, é ideal coletar e processar pelo menos duas amostras orgânicas, dentre elas a urina é a melhor opção para extração de RNA viral (AMUDE et al., 2006; NEGRÃO et al., 2007).

A utilização de outras técnicas como a *nested* PCR é indicado quando a amostra possui uma baixa carga viral o que, diminui a possibilidade desses falsos negativos e poderia ser uma opção para amostras do líquido cefalorraquidiano, onde geralmente existe pouco material genético viral, entretanto mais oneroso do que o qPCR (SHIN et al., 2004). Deve-se evitar a coleta de amostras no período de três semanas após a vacinação, uma vez que poderá resultar em falso positivo (SHIN et al., 1995; JOZWIK; FRÍMUS, 2005).

De acordo com (ELIA et al., 2015), demonstraram que as amostras de urina e fezes, independente dos sinais clínicos, são as melhores amostras para o isolamento, quantificação e identificação viral.

2.9.2.8 Diagnóstico histopatológico

Na necropsia as alterações macroscópicas são variáveis e inconclusivas, mesmo em cães que apresentam sinais clínicos graves. Os pulmões apresentam variações como edema pulmonar difuso, até áreas escuras de broncopneumonia bacteriana secundária ou lesões cinza-amareladas de hiperplasia do epitélio alveolar. Em casos de pneumonia intersticial, os pulmões estarão com infiltrado de células mononucleares, macrófagos espumosos, hiperplasia de pneumócitos e edema alveolar. Os linfonodos podem estar congestos ou hemorrágicos (SONNE, 2008).

Presença de vacúolos multifocais, desmielinização, infiltrados mononucleares perivasculares e em meninges e reação glial, sugestivos de encefalomielite (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

A desmielinização sempre estará presente quando o SNC é acometido pelo vírus (SILVA et al., 2009). Pode também ocorrer lesões no cerebelo e na substância branca da medula espinhal, com delimitadas áreas de necrose, desmielinização e inclusões intracelulares, sobretudo em astrócitos (MELLO et al., 2008).

Pode-se observar no intestino degeneração do epitélio, necrose linfoide e infiltração de linfócitos na lâmina própria, proeminência das placas de Peyer, conteúdo diarreico amarelo ou avermelhado, estômago com mucosa hiperêmica e pequenas erosões da mucosa gástricas. Cães que ainda não tiveram a erupção dos dentes permanente podem apresentar hipoplasia do esmalte dentário devido à exposição da dentina, visto macroscopicamente em áreas de coloração amarelo bege (SONNE, 2008).

Os achados macroscópicos que também podem ser encontrados em cães são secreção ceruminosa no conduto auditivo externo, atrofia do timo, aumento dos linfonodos mesentéricos, placas fibrinonecróticas na língua e no palato (SONNE et al., 2009).

2.9.2.9 Diagnóstico por imagem

2.9.2.9.1 Ressonância magnética

Observam-se múltiplas áreas de hiperintensidade na substância branca, principalmente cerebelar, em ponderação T2, na ressonância magnética (RM). Estudos histopatológicos das regiões mostradas pela TC e RM correspondem áreas de desmielinização (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Segundo Bathen et al.; (2008) quatro cães com encefalite aguda causada por cinomose apresentaram lesões multifocais, assimétricas, em formato ovóide, hiperintensos em T2 na substância cinzenta do prosencéfalo, afetando principalmente o lobo temporal. Essas lesões eram isointensas ou hipointensas em T1. com realce de contraste inconsistente. Em três cães avaliados foram observadas lesões hiperintensos em T2 e perda da demarcação cortical e da substância branca na região do cerebelo. Um cão teve uma lesão hiperintensa em T2 no tronco cerebral. Na encefalite aguda, a replicação viral direta causa lesão neuronal, necrose e desmielinização. Isso leva a lesões multifocais na substância branca cinzenta e, em menor grau, na substância branca.

Na encefalite crônica, os resultados da infiltração linfocitária perivascular aparecem como uma forte resposta imunológica humoral. A distribuição de sinais de hiperintensidade predominantemente em substância branca, são consistentes com o extenso envolvimento de lesões nessa região, que são vistos na meningoencefalite por cinomose crônica. (GRIFFIN et al.; 2009)

2.9.3 Tratamento

A cinomose é considerada uma enfermidade importante na clínica veterinária, não havendo para ela uma terapia efetiva, apenas um tratamento sintomático (MANGIA; PAES 2016). Há um grande número de pesquisas realizadas com o VCC, mas, pouco se evoluiu nas orientações terapêuticas para a doença. Devido a isso, diversos tratamentos são instituídos, de forma empírica, mesmo na ausência de trabalhos científicos que suportem a escolha terapêutica (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Atenção deve ser dada, para que recuperação espontânea observada em cães com sinais neurológicos e/ou

sistêmicos não seja considerada como o resultado de um tratamento instituído (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

É indicado, caso haja perdas eletrolíticas através de vômito ou diarreia, fluidoterapia parenteral para estabelecer uma hidratação constante (NELSON; COUTO 2006). Orienta-se, também, a administração de antieméticos (NELSON; COUTO 2006) e em caso de diarreia grave usar antidiarreicos complexos que contenham pectina, caolim ou outros adsorventes (MANGIA, 2008; BICHARD, 2008).

Os fármacos mais utilizados na terapia antibacteriana são amoxicilina, cloranfenicol, florfenicol, cefalosporinas, fluorquinolonas e aminoglicosídeos (GREENE; APPEL, 2006).

Os corticosteroides podem ser utilizados nas imunopatologias das lesões neuronais e para redução do edema cerebral (GREENE; APPEL, 2006). O principal efeito colateral dos corticosteroides é a imunossupressão (MANGIA, 2011), hiperglicemia, aumento da apoptose neural e em algumas circunstâncias a exposição crônica aos corticosteroides pode resultar em efeito pró-inflamatório no SNC (SORRELLS; SAPOLSKY, 2007). O uso da sinvastatina vem sendo estudada, após a erradicação da viremia, como substituto dos corticóides para diminuir a sobrecarga inflamatória mediada pelos astrócitos contra o tecido nervoso. Assim, visa diminuir os efeitos deletérios produzidos pelo VCC sobre o SNC, principalmente a desmielinização (YOUSSEF et al., 2002).

O uso de anticonvulsivantes também é indicado, tais como fenobarbital, na dose de 2 mg/kg, por vias intravenosa, intramuscular ou oral, a cada 12 horas (GREENE; APPEL, 2006), diazepam ou brometo de potássio (NELSON; COUTO, 2006). O brometo de potássio também pode ser a primeira opção para filhotes que não possuem o sistema microssomal hepático desenvolvido e consequentemente não conseguem metabolizar o fenobarbital (PLATT; GAROSI, 2012).

A ribavirina, um antiviral, causa mutações no vírus, ocorrendo um erro na formação do genoma viral. Na dose de 30 mg/kg por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias, demonstrou atividade efetiva, e 20 mg/kg, a cada 24 horas, por 15 dias, quando associada ao Dimetilsulfóxido (DMSO) na dose de 1 g/kg, por via intravenosa, a cada 24 horas, em cães com encefalite aguda pelo vírus da cinomose (MANGIA et al., 2011). Devem ser diluídos em solução 10 a 20% de

NaCl 0,9% (ELIA et al., 2008). Um dos efeitos adversos da ribavirina é a indução de anemia hemolítica (WU et al., 2005).

Pode ser utilizado soro hiperimune específico (gama globulinas específicas), pois sua ação é de soroneutralização, devendo ser administrada de uma só vez. Quando há alterações do sistema nervoso, o soro hiperimune pode não impedir o avanço da doença, pois atua apenas nos vírus circulantes e não sobre as partículas virais que ultrapassam a barreira hematoencefálica (MANGIA, 2008). O soro permanece ativo no animal por 15 a 30 dias, baixando seu título ou concentração gradativamente, seja por soroneutralização, com a formação de antígenos x anticorpos, seja por metabolização e eliminação progressiva (GREENE; APPEL, 2006).

O prognóstico é reservado nos casos de cinomose aguda, principalmente se os sinais neurológicos forem identificados e estiverem em plena evolução. Os tratamentos de suporte e sintomático das infecções secundárias aumentam as chances de recuperação do paciente com qualidade de vida (HOSKINS, 2004).

2.9.4 Profilaxia

A melhor forma de prevenção da doença é por meio da instituição de um protocolo vacinal correto e, conseqüentemente, eficaz. A vacinação deve ser realizada o mais cedo possível, por se tratar de uma doença que já se inicia com o animal ainda jovem, respeitando a influência dos anticorpos maternos que controlam o momento adequado para a vacinação segura e sem neutralização (MONTI et al., 2007; SILVA et al., 2015). A vacinação estimula as respostas imunes, humoral, mucosal ou mediada por células (NELSON; COUTO, 2006).

Deve haver uma periodicidade na vacinação, pois os cães podem perder sua imunidade em situações de estresse, imunossupressão ou contato com outros animais doentes (CRAWFORD; SELLON, 2010; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Vários fatores podem influenciar a ocorrência das falhas vacinais e são importantes para o resultado da vacinação como: a individualidade dos animais vacinados, como genética, idade, nutrição, estado de saúde, meio ambiente, situações de estresse (MONTI et al., 2007), hospedeiro imunocomprometido, vacinação incompleta, níveis de anticorpos maternos que suprimem a vacina e

animal infectado com o vírus antes da vacinação (NELSON; COUTO, 2006; LAN et al., 2006; MARTELLA et al., 2008) isolado viral utilizado, a manutenção da imunogenicidade suficiente durante todo o processo de atenuação do antígeno, o número de partículas virais atenuadas em uma dose e vacinas manuseadas e estocadas indevidamente (MONTI et al., 2007), a variação genética observada entre as linhagens de campo e as estirpes vacinais (PANZERA et al., 2012).

O controle também pode ser feito por meio do isolamento e desinfecção do local (QUINN, 2011). Animais em fase de viremia devem evitar contato com outros animais, mantendo-se em isolamento para evitar contágio dos animais saudáveis. O VCC é sensível a desinfetantes comuns (CRAWFORD; SELLON, 2010; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Pode ser utilizado desinfetante à base de amônia quaternária a 0,3%, formol a 0,5%, fenol a 0,75% e outros produtos que inativem o vírus. (SANTOS, 2006).

2.9.4.1 Terapia celular

Uma opção de tratamento é a terapia com células-tronco (BLACK et al., 2007 e 2008). Essa terapia foi utilizada no tratamento de esclerose múltipla humana, doença autoimune neurodegenerativa, com sequelas semelhantes às da cinomose canina (RIORDAN et al., 2009).

Na última década, a terapia celular evoluiu rapidamente, tanto em pesquisas pré-clínicas *in vitro* e *in vivo* quanto em ensaios clínicos. As células-tronco mesenquimais (CTMs) geraram um grande interesse no campo da medicina regenerativa devido às suas propriedades biológicas (HOFFMAN; DOW 2016; BAJEK et al. 2016).

A terapia é feita através da inoculação de células em um determinado indivíduo, para que elas se proliferem, se diferenciem ou secretem fatores que promovam a regeneração dos tecidos lesionados. Essa terapia oferece possibilidade de tratamento para várias doenças hereditárias ou adquiridas como doenças neurológicas, metabólicas, cardíacas e cancerígenas (TRINDADE et al., 2013).

A maioria das células do organismo tem sua renovação a partir de células-tronco (CT) que se encontram presentes nos diferentes tecidos. São células indiferenciadas, autorrenováveis e com alta capacidade de proliferação,

originando células diferenciadas e funcionais (NARDI, 2007) e possuem propriedades fundamentais de não ter nenhuma estrutura tecido-específica que permita a execução de funções especializadas, entretanto, podem dar origem a células especializadas como as células do músculo cardíaco, do sangue ou células nervosas (DEL CARLO, 2005).

De acordo com a origem tecidual, as células-tronco podem ser classificadas em três tipos principais: embrionárias, fetais (anexos fetais) e adultas (origem hematopoiética, mesenquimal, neural, epidermal, etc). As embrionárias podem ser derivadas da massa celular interna do blastocisto ou do zigoto. As primeiras possuem capacidade ilimitada de autorrenovação e são pluripotentes, já as células com origem a partir do zigoto são classificadas como totipotentes. Em contraste, as células-tronco adultas aparentemente têm capacidade de autorrenovação limitada e são denominadas multipotentes (MARTINELLO et al., 2010)

As células-tronco adultas (CTA), também chamadas de células-tronco somáticas, são células indiferenciadas encontradas entre as células diferenciadas de um tecido ou órgão, podendo permanecer sem se dividirem por muitos anos, até que sejam ativadas por uma doença ou por lesão. Mantêm e reparam o tecido em que se encontram. Estão em muitos órgãos e tecidos como cérebro (capazes de gerar astrócitos, oligodendrócitos e neurônios), medula óssea, sangue periférico, vasos sanguíneos, músculo esquelético, pele, fígado (DEL CARLO, 2005), rim, córnea, retina, baço, tecido adiposo, trato gastrointestinal, pâncreas, fluido amniótico, polpa dental e coração (MEIRELLES et al., 2006), entretanto, há um número muito pequeno delas em cada tecido (DEL CARLO, 2005).

As CTA são consideradas seguras nas terapias celulares pelo seu baixo risco de se transformarem em células malignas e sua grande capacidade de diferenciação. Entretanto, sua habilidade imunossupressora pode causar, de forma indireta, o crescimento tumoral e proliferação metastática (ASUNUMA et al., 2010).

A medula óssea possui duas linhagens: células progenitoras hematopoiéticas e mesenquimais (NAKAGE et al., 2009; OLIVEIRA, 2008; NARAZAKI e CRISTANTE, 2011).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são responsáveis por toda linhagem hematopoiética (MENDEZ-OTERO et al., 2007). Elas podem ser utilizadas clinicamente no restabelecimento dos elementos sanguíneos e do sistema imunológico (PEREIRA et al., 2008). Podem ser isoladas a partir da medula óssea, sangue periférico e sangue do cordão umbilical (FRITSCH et al., 2007).

Durante estudos realizados com células pertencentes ao estroma da medula óssea as células-tronco mesenquimais (CTMs) foram, inicialmente, descritas (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Existem questionamentos sobre essa terminologia, devido o mesenquima ser o tecido não diferenciado do embrião, com isso, denominações foram surgindo como células-tronco estromais, células progenitoras mesodérmicas (SETHE; SCUTT; STOLZING, 2006), células-tronco mesenquimais maduras, precursores de tecidos não hematopoiéticos, unidades formadoras de colônias de fibroblastos, células medulares estromais, células progenitoras multipotentes adultas, células-tronco reciclantes RS-1 e RS-2 e células-tronco multipotentes da medula óssea humana (FRITSCH et al., 2007). Por esse motivo, a Sociedade Internacional de Terapia Células determina a padronização da nomenclatura em células estromais mesenquimais multipotentes, do inglês *multipotent mesenchymal stromal cell* (MSCs) (HORWITZ et al., 2005).

As MSCs foram descritas principalmente derivadas da medula óssea (BMMSCs), mas, nos últimos anos, as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASCs) também têm sido amplamente estudadas, uma vez que podem ser facilmente obtidas (FRESE et al. 2016).

As MSCs secretam fatores solúveis que estimulam a migração, mitose e diferenciação das células-tronco locais, aumentam a angiogênese e modulam as imunorreações, e todos esses fatos as tornam ferramentas interessantes para a engenharia e regeneração tecidual (FU et al. 2017; KYURKCHIEV et al. 2014).

As MSCs são capazes de auto-regular os fatores da cascata da inflamação, incluindo as citocinas pró-inflamatórias interleucinas-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ . (KIM et al. 2005). As citocinas liberadas nos sítios de inflamação ou lesão promovem a sinalização química para orientar a migração das células implantadas (DAHLGREN, 2009a). Segundo Chen et al. (2008a), essas células migram seletivamente para áreas de

lesão, inflamação e tumores, onde estão envolvidas na reparação tecidual e formação do estroma associado ao tumor

O padrão de expressão de citocinas e receptores para fatores de crescimento das CTMs é dinâmico e complexo, e sugere que os progenitores mesenquimais na medula óssea contribuem para a formação e função do microambiente estromal. (MAJUMDAR et al. 1998, KIM et al. 2005).

Estes efeitos anti-inflamatórios podem ter influências profundas no ambiente tecidual local e igualmente influenciar a habilidade de investigadores em utilizar células-tronco alogênicas sem induzir uma resposta imune do hospedeiro. (DAHLGREN, 2009a)

As CTMs secretam uma série de citocinas e fatores de crescimento com atividades parácrinas e autócrinas, tais como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, fator estimulador de colônias macrofágicas (M-CSF), ligante de Flt-3 e Fator de Células Tronco (SCF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) e fator estimulador de colônias granulocítica-macrofágicas (GM-CSF) (MAJUMDAR et al. 1998, KIM et al. 2005). Além disso, essas células também secretam fatores de crescimento que promovem a efetiva revascularização tecidual, além de apresentarem efeito antiapoptótico, importante na restauração e manutenção da função tecidual (DAHLGREN, 2009a). Dessa forma, a regeneração tecidual após a aplicação de MSCs pode ser explicada pela liberação de citocinas e fatores tróficos no local da lesão. As CTs possuem a capacidade de migrar e identificar o local lesado, devido principalmente aos fatores quimiotáticos liberados pelo tecido. (SCHWINDT et al., 2005; PHINNEY e PROCKO, 2007) Para explicar essas supostas funções destes fatores na lesão, têm sido sugeridas várias hipóteses, incluindo a produção de moléculas que previnam a morte celular; recrutamento de células adjacentes ao próprio tecido, e posterior diferenciação; modulação do sistema imune, em resposta à inflamação decorrente ao dano tecidual; e a presença de moléculas ou enzimas que auxiliem nos defeitos metabólicos (SCHWINDT et al., 2005).

As células-tronco mesenquimais multipotentes (MSCs) possuem potencial de se diferenciarem em várias linhagens celulares e são relevantes no uso da terapia celular devido à sua plasticidade e simplicidade de isolamento. Diferenciam-se *in vitro* em linhagens de condrócitos, adipócitos e osteoblastos

(DOMINICI et al., 2006; NERY et al., 2013), podem originar células musculares, tecido adiposo, hepatócitos, osteócitos e estroma (CASTRO-SILVA et al., 2010).

São encontradas no estroma de diversos locais como medula óssea, polpa dentrária, tendão, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, fluido amniótico, placenta, membrana sinovial, músculo esquelético e em outros tecidos e órgãos (GADE et al., 2012).

Por sua facilidade de obtenção (a partir da medula óssea - crista ilíaca superior, tíbia, fêmur, úmero e coluna vertebral, lombar e torácica, tecido adiposo), rápida capacidade de expansão *in vitro*, mantendo suas características e propriedades biológicas, as MSCs são excelentes candidatas a utilização de terapias celulares (YARAK e OKAMOTO, 2010).

Possuem facilidade de isolamento e expansão *in vitro*, além de terem, em condições especiais, a capacidade de se diferenciar em tecidos de origem ectodermal, mesodermal e endodermal (CHEN et al.;2008)

As MSCs são largamente utilizadas em pesquisas por não apresentarem barreiras éticas, facilidade de obtenção e por serem usadas em transplantes autólogos (ZAMPROGNO, 2007).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) definiu critérios para a caracterização das MSCs. Dentre os critérios inclui aderência ao plástico em cultura celular e expressar ou não marcadores de superfície específicos *cluster designation* (CD), além da demonstração *in vitro* para diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica (DOMINICI et al., 2006).

Segundo a SITC as MSCs devem expressar determinados marcadores de superfície da célula, como CD73, CD90, e CD105, e expressão negativa para CD45, CD34, CD14, ou CD11b, CD79alpha ou CD19 e moléculas de superfície de HLA-DR. além disso as células devem apresentar a expressão dos marcadores genéticos de pluripotencialidade como OCT4, SOX9, RUNX2, PPARG (Aubin et al.;2002). Estes marcadores celulares foram descritos por Neupane et al. (2008) e Reich et al., (2012).

As MSCs humanas devem apresentar expressão positiva para CD105, CD73, CD90 e expressão negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR. (DOMINICI, et al., 2006). Contudo, para cães o perfil característico das MSCs é que as células apresentem expressão positiva de CD44, CD90 e MHCI e expressão negativa para CD14,

CD29 e MHCII, além disso as células devem apresentar a expressão dos marcadores genéticos de pluripotencialidade como Nanog, Oct4 e SOX2 (VIEIRA et al., 2010; GUERCIO et al., 2012; SCREVEN et al., 2014).

Atualmente, estudos confirmaram a existência de MSCs no tecido adiposo canino, bem como na medula óssea (Alipour et al. 2015; Csaki et al. 2009; Guercio et al. 2013; Reich et al. 2012). Na medicina veterinária, as MSCs são usadas consideravelmente na terapia de várias doenças (Quintanilha et al.; 2014; Marx et al. 2015; Murphy et al. 2003; Wang e Cao 2014). No entanto, são pouco definidas a caracterização de MSCs de cães, quando comparada com MSCs humanas., não existindo um consenso em relação à expressão de marcadores de superfície de MSCs de cães, sendo esse conhecimento limitado na veterinária devido em partes pela falta de anticorpos monoclonais espécie-específico para muitos marcadores celulares (SCREVEN et al., 2014)

Dessa forma, anticorpos não validados de reação cruzada de outras espécies, como humana e camundongo são comumente utilizados, contribuindo assim na incapacidade de estabelecer um painel coerente de marcadores celulares de superfície para caracterização de MSCs animais (SCREVEN et al., 2014).

Ivanovska et al. (2017) caracterizaram imunofenotipicamente CTMs de cães derivadas de tecido adiposo perivisceral e subcutâneo, por meio de um painel espécie-específico de anticorpos. Nesse estudo foram utilizados 7 marcadores específicos de cão, como CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 e MHC-II. Todos os anticorpos utilizados demonstraram reatividade esperada, sendo positivos para CD29, CD44, CD73, CD90 e negativos para CD34, CD45 e MHC-II.

Foi também desenvolvido um estudo por Screven et al. (2014), em que investigaram características de MSCs de cães derivadas de tecido adiposo e MO. Por meio da citometria de fluxo, CTMs foram definidas por serem CD90+, CD44-, MCH I+, CD14-, CD34- e MHC II -. Tais células foram posteriormente caracterizadas utilizando PCR em tempo real como CD105+, CD73+, CD14-, CD29+, MHC II+ e CD45-. Dentre estes marcadores, as CTMs de cães diferem de células mononucleares do sangue periférico pela ausência da expressão gênica de CD45.

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

A população de células isoladas do tecido adiposo é heterogênea e contém uma combinação fisiológica de fibroblastos, células e progenitores endoteliais, pericitos, macrófagos, pré-adipócitos, linfócitos B e T e células musculares lisas. O total da população de células-tronco é estimado em 1 a 3% do total de células nucleadas (DAHLGREN, 2009b).

As MSCs derivadas do tecido adiposo possuem peculiaridades interessantes no que se diz respeito a coleta e cultivo *in vitro*, por serem facilmente coletadas em cirurgias eletivas de castração e estarem presentes em quantidades superiores em relação aos outros tecidos. Podem ser coletadas da região inguinal, abdominal ou da parede torácica de pequenos animais e ainda do glúteo de equinos (VIDAL et al, 2007). Outras grandes vantagens são os danos mínimos e a possibilidade de coletas adicionais (DAHLGREN et al., 2009).

2.9.4.2 Tratamento de lesões no sistema nervoso com MSCs

Nos animais domésticos, assim como para seres humanos, lesões no sistema nervoso são incapacitantes e devido à capacidade regenerativa limitada do sistema neural, o transplante de células estromais mesenquimais tem sido estudado em algumas doenças do sistema nervoso central (KARUSSIS et al., 2013). Com base em evidências experimentais de seus modelos pré-clínicos, Uccelli et al. (2011) sugerem que as MSCs constituem uma promissora abordagem na reparação e proteção neural.

Em um estudo realizado por Lim et al.;(2007), 1×10^6 células do cordão umbilical alogênicas, foram transplantadas diretamente no local da lesão em cães com trauma medular. Após 15 dia, foi observado melhoras significantes da condução nervosa e da função dos membros pélvicos, comparadas ao grupo controle

Em um cão com neurite do nervo ciático, células autólogas de medula óssea foram transplantadas na região perineural, sendo evidenciado melhora do déficit proprioceptivo e paresia, após um mês do transplante. (HECKLER et al., 2012)

Outro estudo avaliou o transplante intralesional de 1×10^6 CTM alogênicas derivadas de tecido adiposo, uma semana após a lesão medular e foi possível observar nove semanas após o transplante, recuperação da função neurológica dos membros pélvicos, além da velocidade de condução nervosa com base no potencial evocado somatosensorial, significativamente favorável nos animais transplantados. Na imunohistoquímica dessas células derivadas do de tecido adiposo foram observados GFAP, Tuj-1 e NF160, sugerindo que a melhora na função neurológica pelo transplante de MSCs –TA desses cães com lesão na medular pode ser parcialmente devido à diferenciação neuronal das células-tronco aplicadas (RYU et al., 2009).

Alguns estudos comprovaram o potencial de regeneração das CTM, através de mecanismos neuroprotetores, incluindo a melhora do microambiente potencializando os mecanismos de regeneração, síntese de fatores de crescimento ou citocinas, efeitos vasculares e remielinização (PARR et al., 2007).

Foi evidenciado que MSCs adultas possuem a capacidade de migrar para áreas lesadas, como áreas de hipóxia, apoptóticas ou inflamadas (PAUL; ANISIMOV, 2013). A atenuação dos sinais clínicos neurológicos de diversas doenças deve-se ao fato das MSC serem imunomoduladoras sendo tróficos para fator de crescimento do epitélio vascular (VEGF) pois estimula a angiogênese, impede a liberação de citocinas pró-inflamatórias e permite a regeneração tecidual (CAPLAN; DENNIS, 2006; PERONI; BORJESSON, 2011; SCHWINDT et al., 2005; STEWART, 2011).

Outros estudos demonstraram que as MSCs podem inibir a resposta proliferativa dos linfócitos T (CD8+ e CD4+), linfócitos B, natural *killer* e células dendríticas pela indução de apoptose, produção de linfócitos T reguladores e inativação funcional (anergia), contribuindo também para minimização dos sinais neurológicos (DI NICOLA et al., 2002; BEYTH et al., 2005).

O potencial das MSCs na regeneração nervosa com recuperação morfológica e funcional após lesões do SNC e periférico, tem sido evidenciado

em diversas espécies, como roedores (WANG et al., 2012; SHEN et al., 2010), primatas não humanos (HU et al., 2013), suínos (CHO et al., 2010), humanos (BRAGA-SILVA et al., 2008). Em um estudo feito com cães que apresentavam meningoencefalite, de origem desconhecida, e que receberam transplante de MSCs, houve uma melhora significativa dos sinais neurológicos, o que se deve a capacidade imunomoduladora e das propriedades regenerativas dessas células (ZEIRA et al., 2015).

A via intratecal tem se mostrado eficaz e segura para aplicação de MSCs autólogas (CHEN, B. K. et al., 2014; MAIA et al., 2015; SATTI et al., 2016; ZEIRA et al., 2015) e alogênicas (LIANG et al., 2009; VILLANOVA; BACH, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do transplante de células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo por via intratecal como tratamento da encefalomielite causada pelo vírus da cinomose canina.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar clinicamente a viabilidade, segurança e eficácia do transplante intratecal pela cisterna magna de células estromais mesenquimais (MSCs) alogênicas no tratamento da cinomose canina;
- Avaliar a resposta ao transplante intratecal por meio de exame neurológico seriado;
- Avaliar a resposta ao transplante intratecal por meio de análise do líquido cefalorraquidiano;
- Avaliar a resposta ao transplante intratecal mediante análise das imagens de ressonância magnética.

4 MATERIAL 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 0232/2017. Os tutores dos animais utilizados nesta pesquisa foram informados a respeito dos procedimentos a serem realizados e assinaram a Declaração de Livre Consentimento.

4.1 Delineamento experimental

4.1.1 Seleção dos animais

Foram utilizados 10 cães, sem raça definida, adultos e de ambos os sexos, sendo estes, provenientes do serviço de Moléstias Infecciosas 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 animais com diagnóstico positivo para cinomose pelo teste de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) na urina, com sinais clínicos neurológicos (ataxia, paralisia, paresia, mioclonia, convulsão), sem predileção para fase da doença e histórico de imunização não satisfatório (APÊNDICE 1).

Todos os animais continuaram com o tratamento clínico padrão estabelecido pelo serviço de moléstias infecciosas, exceto o uso de corticoide.

4.1.2 Momentos Experimentais

Momento 0 (M0) – Os animais com sinais clínicos neurológicos indicativos de cinomose e com resultado positivo no teste de q PCR de amostra de urina foram selecionados; seguido de coleta de sangue para hemograma e bioquímica sérica (Figura 2).

Momento 1 (M1) – Os animais foram submetidos à anestesia para exame de ressonância magnética, seguido da colheita do líquido cefalorraquiano (LCR), e então transplante das MSCs (Figura 2).

Momento 2 (M2) – 30 dias após o transplante os animais passaram por reavaliação clínica e neurológica, hemograma, bioquímico, imagens de ressonância magnética nova colheita de LCR (Figura 2).

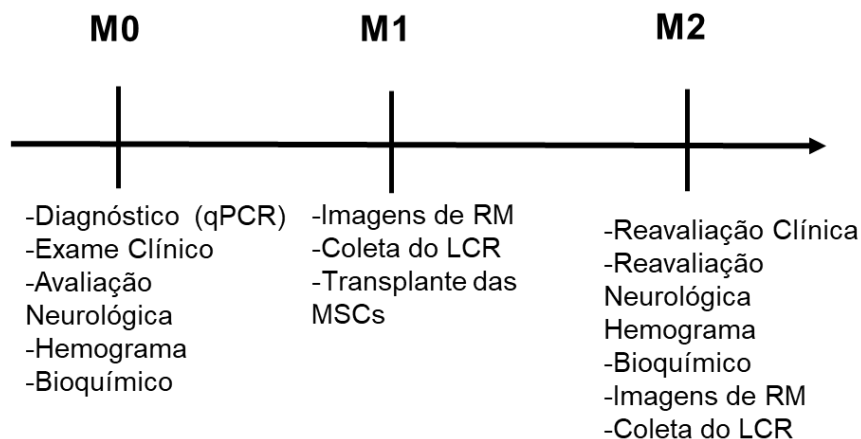


FIGURA 2 – Momentos experimentais: Células estromais mesenquimais (MSCs); Transplante de células mesenquimais via (MSCs); Avaliação clínica e neurológica; Análise de hemograma; Análise de bioquímica sérica; Colheita e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR); Imagens de Ressonância Magnética (RM); Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).

4.2 Cultivo e preparação de MSCs

As células estromais mesenquimais (MSCs) de tecido adiposo utilizadas em nosso estudo, foram previamente isoladas, cultivadas, caracterizadas e doadas pelo banco de células Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia de Células-Tronco (LANÇA).

As células apresentavam marcadores positivos para CD44 e CD90 e negativos para CD34 e MHC-II.

Os protocolos executados pelo laboratório estão descritos abaixo.

4.2.1 Isolamento das MSCs derivadas do tecido adiposo

Os animais utilizados na doação de tecido adiposo para o cultivo de MSCs, oriundos da rotina de cirurgias eletivas de ovário-histerectomia do centro cirúrgico do Departamento de Reprodução Animal, possuíam idade média de três anos, saudáveis e apresentaram resultados negativos na detecção de Adenovírus tipo 1, *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii* e Morbilivírus pelo teste de qPCR,

Aproximadamente 4 mL de tecido adiposo extraído da cavidade

abdominal foram armazenados em tubo cônico de 50 mL, estéril, contendo Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), ficando completamente submersos.

No Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia de Células-Tronco (LANÇA) foram isoladas as MSCs do tecido adiposo (MSCs - TA) o qual foi dissecado em pequenos fragmentos ($1-2 \text{ mm}^3$), lavados com HBSS e digeridos com collagenase tipo 1 a 0,04% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). O tubo com o tecido fragmentado foi mantido em banho-maria a 37°C e agitado a cada 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a neutralização da enzima com o meio de cultivo contendo 90% de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) (Novafarma, Anápolis, Brasil) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

O material foi então filtrado com filtro de 70 µm, centrifugado a 340 g por 10 minutos, o sobrenadante aspirado e acrescido do meio de cultivo e homogeneizado para centrifugação subsequente. Na sequência foi novamente removido o sobrenadante e adicionado meio de cultivo como previamente descrito. As células foram contadas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão do azul de tripano (Invitrogen, São Paulo, Brasil), totalizando uma média de $3,325 \times 10^6$ células, divididas em duas garrafas de 25 cm² contendo 4 mL de meio e cultivadas sob as condições descritas a seguir.

4.2.2 Cultivo das MSCs

As garrafas foram identificadas e incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após as primeiras 48 horas sem manipulação, para haver adesão celular, o meio dos cultivos foi trocado e as células não aderidas descartadas. Após esse período, as garrafas foram monitoradas periodicamente e o meio de cultura trocado a cada 3 ou 4 dias. A passagem das MSCs foi realizada quando atingiram confluência de aproximadamente 80 a 90% (Figura 3), para isso, foi realizada a tripsinização. Tal procedimento abrangeu o descarte do meio de cultivo das garrafas as quais foram lavadas com HBSS aquecido a 37 °C, e acrescidas de 2 mL de solução

de tripsina a 0,25% (Invitrogen, São Paulo, Brasil) a 37 °C. As garrafas foram levadas à estufa por 8 minutos para que as células se desprendessem da garrafa. Com as células em suspensão, foi adicionado 1 mL de meio de cultivo com 90% de DMEM alta glicose, 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) para bloqueio da ação da tripsina. Em seguida, realizada centrifugação a 340 g por 10 minutos para a remoção da tripsina. O novo pellet formado foi ressuspenso em meio de cultivo, centrifugado novamente e ressuspenso em meio. O conteúdo de uma garrafa do cultivo primário foi dividido para expansão e posterior realização dos testes de diferenciação, cariotipagem, viabilidade e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os tempos de cultivo primário e de primeira passagem foram registrados em número de dias.



FIGURA 3 – Células estromais mesenquimais de tecido adiposo prontas para passagem, confluência 90%.

4.2.3 Caracterização das células

A caracterização imunofenotípica foi realizada por meio da análise de citometria de fluxo. A avaliação foi feita com o auxílio de anticorpos conjugados para os marcadores de superfície específicos para as CTMs: CD44 (Rat anti Dog – AbdSerotec – MCA 104 1A488) e CD90 (Anti canine – eBioscience – clone YKIX337.217). Além disso, verificou-se a ausência de expressão de marcadores característicos de outros tipos celulares como o CD34 (Mouse anti canine – AbdSerotec – MCA 2411F) e o MHCII (Rat anti Dog – AbdSerotec – MCA 1044F).

As análises foram conduzidas à fresco em P4 com a concentração de 1×10^5 células em tubos transparentes de citometria. As amostras foram diluídas em 100µl de solução PBS e incubadas por 1 hora com os anticorpos na concentração de 1:100, exceto o tubo controle. Por fim, as amostras foram lavadas com PBS e ressuspensas em 400µl de solução PBS para análise no citômetro de fluxo BD LSR FortessaTM, contabilizando-se 5.000 eventos.

4.2.4 Diferenciação *in vitro*

Osteogênica

As células foram plaqueadas em P4 na concentração de 5×10^3 células por cm^2 em quatro poços da placa de 24 poços, sendo dois deles para controle e dois para diferenciação. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, os poços controle permaneceram sendo cultivados em meio de cultivo normal e, nos outros dois, foi acrescido o meio de indução de diferenciação osteogênica (Kit de diferenciação Osteogênica – *Stem Pro* – Gibco[®], EUA). As amostras foram cultivadas a 37,5°C, com 95% de umidade e 5% de CO₂, por 15 dias, com troca de meio a cada 72 horas.

Após o período de cultivo, os poços foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 4% e corados com solução de *Alizarin Red* 2,5% (Sigma-Aldrich, EUA) para facilitar a identificação dos depósitos extracelulares de cálcio.

Adipogênica

Foram utilizadas amostras em P4 nas condições previamente descritas para diferenciação osteogênica, utilizando-se o meio de indução da diferenciação adipogênica (Kit de diferenciação Adipogênica – *Stem Pro* – Gibco[®]). As amostras foram cultivadas a 37,5°C, com 95% de umidade e 5% de CO₂, por 15 dias, com troca de meio a cada três dias.

Após a diferenciação, os poços foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 4% e corados com *Oil Red O* 0,5% em álcool isopropílico (Sigma-Aldrich, EUA) para facilitar a identificação das gotículas de lipídio que se acumularam no citoplasma das células e contracorados com hematoxilina de Mayer por 3 minutos.

Citometria de fluxo

Na análise da citometria de fluxo, foi observada expressão significativa do marcador de células mesenquimais CD44 (86,7%) e uma expressão moderada para CD90 (53,2%). Já os marcadores CD34 e MHCII apresentaram uma baixa expressão (2,1 e 1,2% respectivamente) (APÊNDICE 4).

Diferenciação in vitro: osteogênica e adipogênica

Na diferenciação osteogênica aos 15 dias, todas as amostras cultivadas com o meio de indução apresentaram intensa deposição de cálcio extracelular corado com o *Alizarin Red*.

Já as amostras induzidas à diferenciação para a linhagem adipogênica foram positivas apresentando gotículas lipídicas dentro do citoplasma celular quando coradas com o *Oil Red* (APÊNDICE 5).

4.2.5 Viabilidade celular

As MSCs caninas foram transplantadas com viabilidade entre 70 e 80%. A viabilidade celular foi realizada pelo teste de exclusão com azul de tripan a 0,3% imediatamente antes do transplante de MSCs nos animais. O resultado foi expresso em percentagem de células viáveis, segundo a fórmula: Viabilidade (%) = Células coradas (viáveis) x 100/ total de células (coradas + não coradas).

4.2.6 Preparo de MSCs para o transplante

As MSCs de terceira passagem foram tripsinizadas e posteriormente centrifugadas a 340 g durante 10 minutos, o sedimento ressuspenso com HBSS até completar três lavagens. Depois de contar o número total de células, foram aspiradas com uma agulha de 30x8 mm em uma seringa estéril de 1 mL. A concentração total de MSCs foi de 10×10^6 células, de acordo com o número obtido durante a cultura.

4.3 Avaliação clínica geral

Foi realizada anamnese dos animais, incluindo comportamento, alimentação e estado de saúde. Durante o exame físico foram anotadas as seguintes informações na ficha clínica: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, palpação de linfonodos, coloração das mucosas, tempo

de preenchimento capilar, pulso e grau de hidratação, avaliação da acuidade visual por meio de testes com bolas de algodão, os testes de labirinto e a resposta à ameaça. Adicionalmente foram também avaliadas a produção lacrimal, valendo-se do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Teste da Lágrima de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda).

4.4 Exame neurológico

Foi realizada avaliação neurológica antes e após o transplante intratecal de MSCs.

Para a avaliação, desenvolvemos uma escala de neurodeficiência onde avaliou-se os parâmetros de estado mental, comportamento, postura e coordenação da cabeça e do tronco, nervos cranianos, marcha, reações posturais, propriocepção, reflexos espinhais, nocicepção e palpação epaxial, para acompanhamento da evolução do quadro clínico (Figura 4).

Os pacientes foram classificados conforme a sua apresentação clínica em leve, moderado e grave, na qual os primeiros apresentavam disfunção discreta das suas funções normais e os últimos com disfunção severa, caracterizada por perda das funções normais.

De forma a classificar de forma objetiva a gravidade da doença neurológica foram estabelecidos cinco graus que variavam de 0 a 4 conforme a severidade dos sinais neurológicos apresentados. Aos animais com exame neurológico normal era atribuída nota 0, animais com déficits leves a nota 1, animais com déficits moderados a nota 2, déficits graves a nota 3 e muito graves a nota 4.

		Pontos	Escore
Estado mental	Alerta	0	
	Deprimido	1	
	Delírio/desorientação	2	
	Semicomatoso	3	
	Comatoso*	4	
Comportamento	Comportamento normal	0	
	Comportamento anormal**	2	
Total		0	

2. CRISES EPILEPTICAS		Pontos	Escore
Ausente		0	
Focais		1	
Generalizadas ou focais com generalização secundária		2	
Seriadas		3	
Estado epilético		4	
Total		0	

3. POSTURA DA CABEÇA E CORPO		Pontos	Escore
Normal		0	
Desvio de cabeça		1	
Pleurotótono		1	
Opistótono		2	
Postura de Schiff-sherrington		2	
Rigidez de descerebração		3	
Rigidez de descerebração		4	
Total		0	

4. MARCHA		Pontos	Escore
Normal		0	
Hemi/paraparesia ambulatória; monoparesia		1	
Hemi/paraparesia não-ambulatória, tetraparesia ambulatória ou monoplegia		2	
Hemi/paraplegia ou tetraparesia não-ambulatória		3	
Tetraplegia		4	
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	
Total		0	

5. COORDENAÇÃO		Pontos	Escore
Normal		0	
Movimentos involuntários*** leves		1	
Movimentos involuntários moderados		2	
Movimentos involuntários graves		3	
Dismetria, tremor de intenção, ampla base		2	
Total		0	

6. NERVOS CRANIANOS		Pontos	Escore
Normal		0	
Lesão em NC II		3	
Lesão em NC III-IV		2	
Lesão em NC V ramo motor		3	
Lesão em NC V ramo sensitivo		2	
Lesão em NC VI-XII		4	
Múltiplas lesões em NC. VI-XII		+ 4 pts	
Total		0	

7. REFLEXOS		Pontos	Escore
Normais com marcha normal		0	
Normais com marcha anormal		1	
Diminuído/ausente membros torácicos ou pélvicos		2	
Aumentado em membros torácicos ou pélvicos		2	
Perineal/anal diminuído		2	
Total		0	

8. NOCICEPÇÃO		Pontos	Escore
Superficial	Normal	0	
	Diminuída (hemi/para/mono)	1	
	Diminuída (tetra)	2	
	Ausente (hemi/para/mono)	3	
	Ausente (tetra)	4	
Profunda	Normal	0	
	Diminuída (hemi/para/mono)	2	
	Diminuída (tetra)	3	
	Ausente (hemi/para/mono)	4	
	Ausente (tetra)	4	
Hiperestesia/alodinia		1	
Total		0	

9. PALPAÇÃO EPAXIAL/VESÍCULA URINÁRIA		Pontos	Escore
Epaxial	Normal	0	
	Dolorosa	1	
Micção	Normal	0	
	Incontinência/retenção urinária intermitente (compressão manual)	1	
	Incontinência/retenção urinária constante	2	
	Incontinência/retenção urinária constante com necessidade de cateterização permanente	3	
Total		0	

FIGURA 4 – Escala de neurodeficiência.

4.5 PCR

A extração de RNA das amostras de urina foi realizada com reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies, USA) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras permaneceram em freezer -80°C até a realização da transcrição reversa. Após a purificação, as amostras de RNA foram utilizadas para a síntese de DNA complementar (cDNA), realizada com inibidor de RNase, Randon Primer, Oligo-dT e a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma-Aldrich®).

Para a análise de qPCR foi utilizado 12 microlitros do Master Mix (Promega®) mais 2 microlitros de cDNA e água MilliQ® até completar 25 microlitros de volume final. A análise de qPCR foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) seguindo os ciclos padrão do equipamento. Os primers alvo utilizados foram o VCCIN e VCC01 (Quadro 1) previamente validados (DEL PUERTO et al., 2010) adicionalmente foi utilizado um controle negativo da qPCR e um controle positivo e negativo da extração. Todas as amostras foram corridas em duplicatas.

QUADRO 1 – Informação específica dos primers utilizados para amplificação em qPCR

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (° C)	Referência
VCCIN	F: 5'-TAGCATAACTCCAGAGCAATG -3'	84	60	DEL PUERTO et al., 2010
VCC01	R: 5'-CAGCACCGTACATGGTTATC -3'			

*F: forward primer; R: reverse primer; bp: pares de base.

4.6 Hemograma e bioquímica sérica

Amostras de sangue total e soro foram coletados para a realização dos exames de hemograma (Sysmex pochH-100iV Diff por impedância) e bioquímica sérica (uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), proteína total, albumina, globulina e glicemia; Mindray BS200E) nos momentos M0 e M2. Os resultados foram avaliados de acordo com os valores de referência do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ/Unesp – Botucatu.

4.7 Ressonância magnética (RM)

As imagens de ressonância magnética foram realizadas nas regiões de encéfalo e da medula espinhal, região cervical e toracolombar, considerando a localização da lesão com base no exame neurológico nos momentos M1 e M2. As RM foram feitas em tempos ponderados de T1 e T2 e na sequência de inversão-recuperação atenuante de fluido (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*, FLAIR) sem a administração de contraste. As RM foram obtidas nos 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 Colheita e análise do LCR

Para a coleta do liquor, os cães foram submetidos ao protocolo pré anestésico com meperidina 4 mg/kg intramuscular; indução com midazolam 0,3 mg/kg intramuscular + propofol 5 mg/kg intravenoso; manutenção com isoflurano e mantidos em decúbito lateral. Após tricotomia e antissepsia da região atlanto –occipital, foi introduzida a agulha espinhal de 25 Gx31/2” (0,50x90 mm) até a cisterna magna para obtenção de amostras do LCR, conforme descrito por De Lahunta; Glass, 2010.) (Figura 5) e subsequente análise do LCR dos cães como previamente descrito por Wamsley; Alleman, 2004), nos momentos M1 e M2. De acordo com 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 todos os dados do exame físico, químico e citológico do LCR, foram tabulados para sua análise.



FIGURA 5 – Punção da cisterna magna para obtenção de amostras do LCR.

4.9 Transplantes de MSCs

Os cães foram mantidos sob anestesia geral (Protocolo: medicação pré-anestésica com meperidina 4 mg/kg intramuscular; indução com midazolam 0,3 mg/kg intramuscular + propofol 5 mg/kg intravenoso; manutenção com isoflurano), mantidos em decúbito lateral, sendo realizada logo após a punção da cisterna magna a aplicação lenta de 10×10^6 células diluídas em 0,5 mL de solução fosfato salino (PBS) por via intratecal (Figura 6).



FIGURA 6 – Punção da cisterna magna a aplicação lenta de 10×10^6 células diluídas em 0,5 mL de solução fosfato salino (PBS) por via intratecal.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica geral

As informações coletadas antes e após o transplante das células estromais mesenquimais durante exame físico como, temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, palpação de linfonodos, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, pulso e grau de hidratação estavam dentro da normalidade. Os animais avaliados no M0 apresentavam clinicamente déficit da produção lacrimal e hiperqueratose de coxim (Figura 7-A e B) e no momento M2, os mesmos apresentaram melhora clínica destes sinais (Figura 7-C e D).

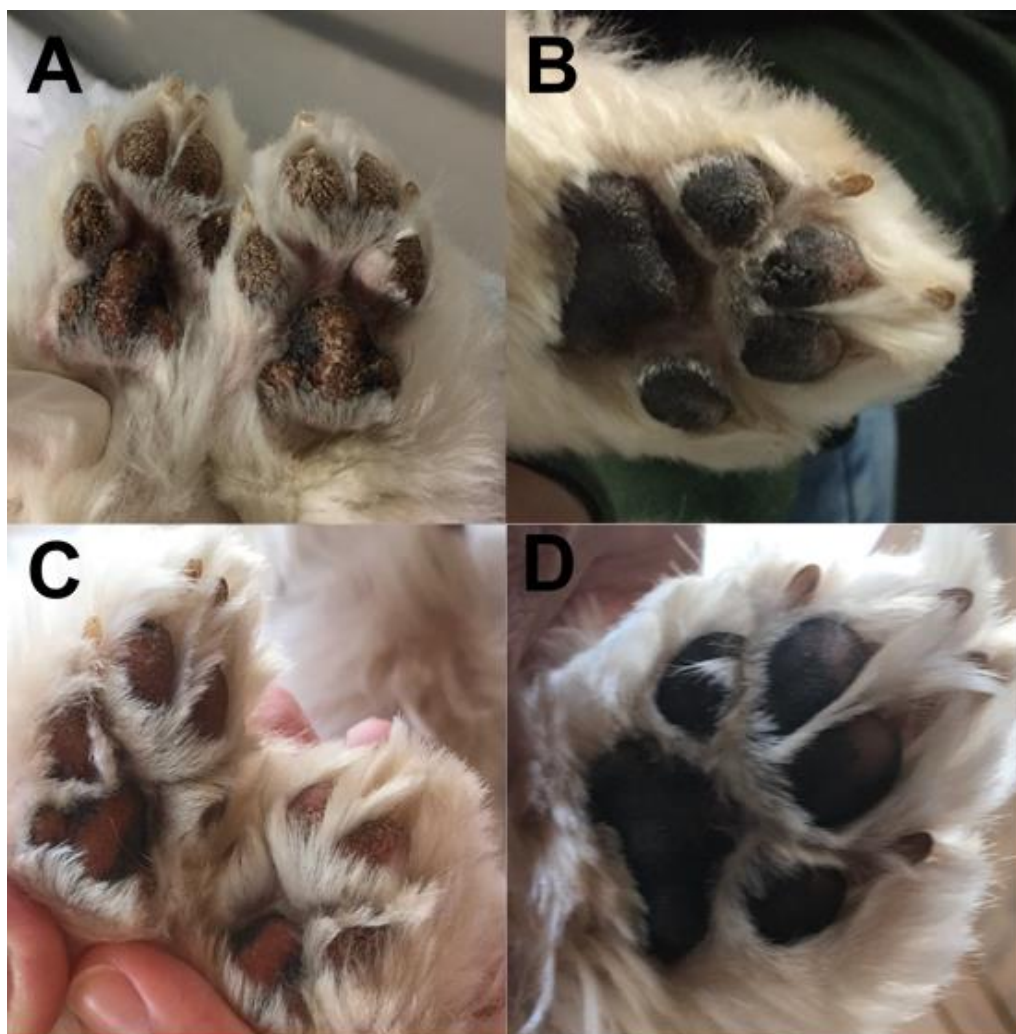


FIGURA 7 – Avaliação clínica. (A) Coxins plantares apresentando hiperqueratose antes da aplicação das MSCs. (B) Coxins palmares apresentando hiperqueratose antes da aplicação das MSCs. (C) Coxins plantares apresentando melhora visível do quadro de hiperqueratose 30 dias após a aplicação das MSCs. (D) Coxins palmares apresentando melhora visível do quadro de hiperqueratose 30 dias após a aplicação das MSCs.



FIGURA 8 – Avaliação clínica. (A) Olho esquerdo com secreção mucoide antes da aplicação das MSCs. (B) Olho esquerdo apresentando melhora visível da secreção ocular 30 dias após a aplicação das MSCs.

5.2 Exame Neurológico

A avaliação neurológica foi realizada previamente no momento (M0) ao transplante das MSCs, e trinta dias após o transplante no momento (M2) e pontuados de acordo com a escala de neurodeficiência (Figura 9).

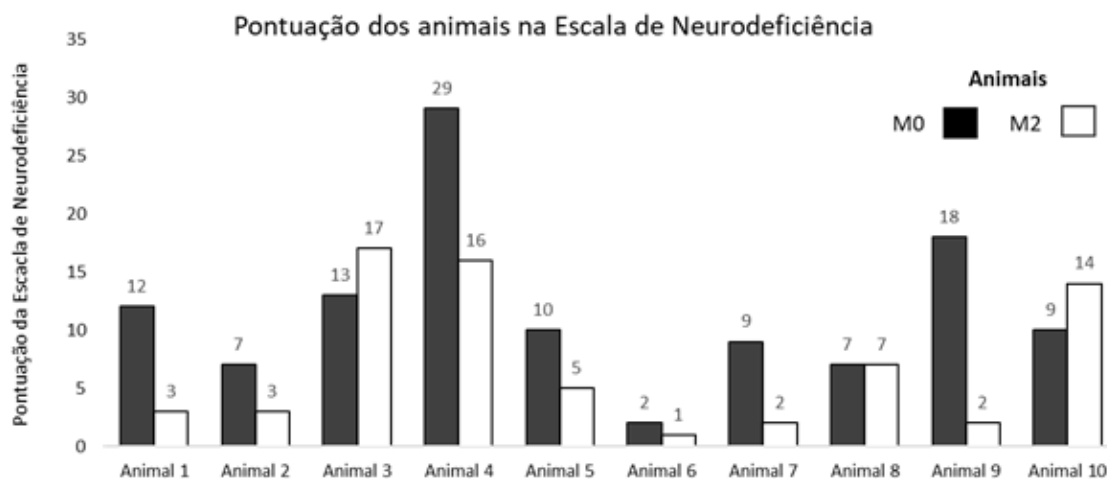


FIGURA 9 – Pontuação dos animais na Escala de Neurodeficiência no momento M0 (antes do transplante MSCs; barras pretas) e no momento M2 (30 dias após o transplante MSCs; barras brancas). Os números acima das barras representam a pontuação exata de cada animal no experimento.

Os animais foram acompanhados semanalmente entre os momentos M1 e M2. A avaliação neurológica foi realizada com base nos aspectos semiológicos para avaliação do SNC, sendo este importante para determinar a localização da

lesão para direcionamento na realização da ressonância magnética. Os parâmetros avaliados foram o estado mental, comportamento, postura e coordenação da cabeça e do tronco, nervos cranianos, marcha, reações posturais, propriocepção, reflexos espinhais, nocicepção e palpação epaxial.

Inicialmente, no M0 em todos os animais o nível de consciência era alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e palpação epaxial estavam normais, embora todos apresentassem alguma alteração de marcha.

Em relação aos outros parâmetros houveram diferenças que serão descritas a seguir:

Animal 1: Previamente a aplicação das MSCs (M0), o estado mental do animal era alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Na avaliação dos nervos cranianos, observou-se ausência da resposta à ameaça bilateral e reflexos fotopupilares (RFP) direto e consensual normais. Na avaliação da marcha, observou-se tetraparesia não ambulatória e atrofia muscular dos quatro membros, mais pronunciada nos membros torácicos. Na avaliação das reações posturais, apresentava propriocepção ausente nos membros pélvicos e torácicos. Os reflexos miotáticos estavam presentes em todos os membros e constatou-se *clonus* bilateralmente na avaliação do reflexo patelar e presença de extensor cruzado. O teste da sensibilidade superficial e profunda apresentou-se normal e não houve sensibilidade dolorosa a palpação. O animal manifestava mioclonia em região de cabeça, tronco e membros torácicos e crises epiléticas generalizadas tônico-clônicas. Baseado no exame neurológico, a neurolocalização foi multifocal, indicando uma síndrome cortical frontal e occipital bilateral (cegueira cortical) e espinhal cervical (c1-c5 bilateral) grau 2, comprometendo os funículos ventral e dorsolateral da medula.

Após o transplante das MSCs (M2), o nível de consciência do animal manteve-se alerta, assim como a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Permaneceu também ausência da resposta à ameaça bilateral e reflexos fotopupilares (RFP) direto e consensual normais. O animal apresentou paresia não ambulatória de membros torácicos e atrofia muscular dos membros torácicos. Houve melhora da atrofia muscular dos membros pélvicos, da força extensora e presença de ataxia dos membros pélvicos. Na avaliação das

reações posturais, apresentava propriocepção ausente nos membros torácicos e melhora proprioceptiva nos membros pélvicos. Os reflexos miotáticos estavam presentes em todos os membros. O teste da sensibilidade profunda apresentou-se normal e não houve sensibilidade dolorosa a palpação. O animal apresentou mioclonia com menor intensidade em região de cabeça, tronco e membros torácicos e aumento do Intervalo interictal das crises epiléticas. Baseado na escala de neurodeficiência a lesão foi multifocal, indicando uma síndrome cortical frontal e occipital bilateral (cegueira central) e espinhal cervical (c1-c5 bilateral) grau 3, comprometendo os funículos ventral e dorsolateral

Animal 2: Previamente a aplicação das MSCs (M0), o estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Não houve alterações na avaliação dos nervos cranianos. Na avaliação da marcha, observou-se paraplegia e atrofia muscular e nas reações posturais o animal apresentava propriocepção ausente nos membros pélvicos. Os reflexos miotáticos estavam presentes em todos os membros. O animal manifestava mioclonia nos membros torácicos. O teste da sensibilidade profunda apresentou-se normal e não houve sensibilidade dolorosa a palpação. Com base no exame neurológico, a lesão foi classificada como uma síndrome espinhal toraco-lombar (t3-l3) simétrico bilateral grau 3 comprometendo os funículos ventral e dorsolateral.

Após o transplante de MSCs (M2), o nível de consciência manteve-se alerta, enquanto não se observaram alterações na qualidade da consciência, comportamento e postura da cabeça com respeito ao corpo. Não houve alterações na avaliação dos nervos cranianos. O animal apresentou paraparesia não ambulatoria e atrofia muscular. Nas reações posturais, observou-se propriocepção ausente nos membros pélvicos. Verificou-se melhora na força extensora dos membros pélvicos. Os reflexos miotáticos estavam presentes em todos os membros. O animal manifestava mioclonia nos membros torácicos com menor intensidade. O teste da sensibilidade profunda apresentou-se normal e não houve manifestação dolorosa a palpação. Com base na escala de neurodeficiência a lesão foi classificada como síndrome espinhal toracolombar (T3-L3) simétrico bilateral grau 3, comprometendo o funículo dorsolateral da medula espinhal

Animal 3: No M0, o estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Observou-se ausência da resposta à ameaça bilateral e reflexos fotopupilares (RFP) direto e consensual normais. O animal apresentava postura em ampla base, tremor de intenção, ataxia cerebelar/hipermetria, ausência de déficit proprioceptivo, ausência de mioclonia, sem atrofia e crises epiléticas generalizadas tônico-clônicas seriadas. Reflexos espinhais e nocicepção presentes. Sendo assim, condizentes com da lesão na região córtex e cerebelo grau 13 de acordo com a escala de neurodeficiência.

Após o transplante de MSCs (M2), o nível de consciência foi alerta, foi observado vocalização a noite. O animal apresentava desvio de cabeça para esquerda, tremor de intenção, tetrataxia, desequilíbrio, tetraparesia não ambulatoria e déficits proprioceptivos diminuído em membro torácico e ausente em membro pélvico. Também apresentou crise epilética generalizada tônico-clônicas seriadas e dor cervical. Quanto aos reflexos miotáticos e nocicepção, estes estavam presentes. Sendo assim, condizentes com da lesão na região córtex e cerebelo grau 17 de acordo com a escala de neurodeficiência.

Animal 4: A postura da cabeça em relação ao corpo apresentava-se normais. Observou-se ausência da resposta à ameaça bilateral e reflexos fotopupilares (RFP) direto e consensual diminuídos, alteração II, III, V e VII pares de nervos cranianos. O animal apresentava tetraparasia não ambulatorial, déficit proprioceptivo em membros pélvicos. Os reflexos miotáticos e nociceptivos em membros pélvicos estavam ausentes, presença de incontinência urinária, mioclonia facial e cervical, atrofia muscular nos membros pélvicos e na face esquerda. Não houve sensibilidade dolorosa a palpação. Essas alterações foram condizentes com uma lesão multifocal, grau 29 na escala de neurodeficiência.

Após o transplante de MSCs (M2) O nível de consciência manteve-se alerta, assim como a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Observou-se discreta melhora ao teste resposta à ameaça bilateral e reflexos fotopupilares (RFP) direto e consensual e ao teste com bolas de algodão, reflexo palpebral e da sensibilidade em região temporal, evidenciando assim, melhora do II, III, V e VII pares de nervos cranianos. O animal permaneceu com tetraparesia não

ambulatorial, atrofia de membros pélvicos e da face esquerda e déficits proprioceptivos em membros pélvicos, entretanto, houve melhora da mioclonia em face e melhora do tônus muscular. Os reflexos miotáticos e nocicepção permaneceram ausentes em membros pélvicos. Essas alterações foram condizentes com uma lesão multifocal, grau 16 na escala de neurodeficiência.

Animal 5: No momento M0, o estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e apresentavam-se normais. Não houve alterações na avaliação dos nervos cranianos. O animal apresentava postura em ampla base, tetraparesia/tetrataxia evidente nos membros pélvicos, déficit proprioceptivo em membro torácico direito diminuído, mioclonia em região temporal e perineal. Reflexos miotáticos aumentados e nocicepção presentes. Não houve sensibilidade dolorosa a palpação. Essas alterações foram condizentes com uma lesão multifocal, nas regiões cervical esquerda, tóracolombar e tronco encefálico, grau 10 na escala de neurodeficiência.

Após o transplante de MSCs (M2), O nível de consciência manteve-se alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. O animal apresentou ataxia discreta em membros pélvicos e déficit proprioceptivo em membro pélvico esquerdo, mioclonia perineal, sem alteração no sistema músculo esquelético, melhora do tônus muscular. Os reflexos miotáticos e nocicepção estavam presentes. Essas alterações foram condizentes com uma lesão multifocal, grau 5 na escala de neurodeficiência

Animal 6: No M0 o estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Não houve alterações na avaliação dos nervos cranianos. O animal apresentava ataxia, hemiparesia esquerda, déficit proprioceptivo em membro torácico esquerdo e membro pélvico esquerdo, sem alteração músculo esquelética e com tônus muscular. Os reflexos miotáticos e nocicepção estavam presentes. Essas alterações foram condizentes com uma lesão cervical do lado esquerdo, grau 2 na escala de neurodeficiência.

Após o transplante de MSCs (M2), O nível de consciência manteve-se alerta, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais, assim como a avaliação dos nervos cranianos. O animal apresentou, leve ataxia, leve déficits proprioceptivos em membros

torácico e pélvico esquerdos. Sem alteração em sistema músculo esquelético e tônus muscular. Reflexos miotáticos e nocicepção presentes. Essas alterações foram condizentes com uma cervical do lado esquerdo, grau 1 na escala de neurodeficiência

Animal 7: O estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência e comportamento apresentavam-se normais. O animal apresentava postura em base ampla e tremor de intenção, tetrataxia, alteração de VIII par de nervo craniano, nistagmo vertical, desequilíbrio, hipermetria, déficits proprioceptivos presente em membros torácicos e menor em membros pélvicos. Os reflexos miotáticos e nocicepção eram normais. Essas alterações foram condizentes com lesão em cerebelo grau 9 na escala de neurodeficiência.

Após o transplante de MSCs (M2), O nível de consciência manteve-se alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Ausência de alteração em nervos cranianos. Apresentou discreta hipermetria, ausência de déficit proprioceptivo. Os reflexos espinhais e nocicepção estavam presentes. Essas alterações foram condizentes com lesão em cerebelo grau 2 na escala de neurodeficiência

Animal 8: No momento M0, o estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Não houve alterações na avaliação dos nervos cranianos. O animal apresentava tetraparesia não ambulatória, tetrataxia, com déficits proprioceptivos em membros torácicos e pélvicos. Atrofia muscular em membros torácicos e pélvicos e tônus aumentado em membro torácico. Os reflexos miotáticos e nocicepção estavam normais. Essas alterações foram condizentes com lesão multifocal (cervical e toracolombar) grau 7 na escala de neurodeficiência.

Após o transplante de MSCs (M2), O nível de consciência manteve-se alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo e nervos cranianos apresentavam-se normais. O animal permaneceu em tetraparesia não ambulatória, tetrataxia, com déficits proprioceptivos em membros torácicos e pélvicos, o mesmo apresentava atrofia muscular com melhora do tônus muscular, leve redução da espasticidade e presença de reflexos miotáticos e nocicepção. Essas alterações foram

condizentes com lesão multifocal (cervical e toracolombar) grau 7 na escala de neurodeficiência

Animal 9: No momento M0, o estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência e o comportamento apresentavam-se normais. O animal apresentava desvio de cabeça e nistagmo. Paralisia de membros pélvicos e paresia em membros torácicos. Déficit proprioceptivo nos quatro membros, mioclonia de face e membro torácico esquerdo, atrofia muscular pélvica, tônus muscular diminuído e reflexos miotáticos aumentados, nocicepção presente. Baseado na escala de neurodeficiência a lesão foi multifocal, nas regiões de córtex, cerebelo, cervical e torácica grau 18.

Após o transplante de MSCs (M2), O nível de consciência manteve-se alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Sem alteração de nervos cranianos. Discreto desequilíbrio e tetrataxia. Déficits proprioceptivos somente em membros pélvicos, ausência de mioclonia, melhora da atrofia, reflexos miotáticos e nocicepção normal. Baseado na escala de neurodeficiência a lesão foi multifocal, nas regiões de córtex, cerebelo, cervical e torácica grau 2.

Animal 10: O estado mental foi alerta, enquanto a qualidade da consciência, o comportamento e a postura da cabeça com respeito ao corpo apresentavam-se normais. Não houve alterações na avaliação dos nervos cranianos. O Animal apresentava ataxia, sem alteração de nervos cranianos, paraparesia não ambulatória, déficit de proprioceptivos em membros pélvicos, mioclonia em membros torácicos e tônus muscular diminuído. Os reflexos miotáticos em membros pélvicos estavam aumentados e nocicepção presente. Baseado na escala de neurodeficiência a lesão foi multifocal, toracolombar pontuada em grau 9.

Após o transplante de MSCs (M2), o nível de consciência manteve-se alerta, foi observado vocalização em algumas horas do dia, paralisia de membros pélvicos, alterações de VII par nervos cranianos, nistagmo, tetraparesia não ambulatória, propriocepção ausente em membros pélvicos e reduzido em membros torácico, presença de tetrataxia. Ausência de mioclonia em membros torácicos e presença em membros pélvicos. O animal apresentava também retenção urinária da bexiga intermitente (compressão manual), atrofia de membro pélvico, tônus muscular, reflexos miotáticos diminuídos e nocicepção

presente. Baseado na escala de neurodeficiência a lesão foi multifocal, toracolombar grau 14.

5.3 Hemograma e bioquímica sérica

Os resultados do eritrograma, leucograma e plaquetograma, assim como albumina, proteína total, GGT, FA, ALT, creatinina, uréia e globulina, dos 10 animais inclusos no estudo apresentaram-se dentro dos parâmetros de normalidade antes do transplante das MSCs (M0) e após o transplante (M2).

5.4 Ressonância magnética

As imagens de RM do encéfalo do paciente 1 no momento M1. As RM foram feitas em tempos ponderados de T1 (Figura 10-A) e T2 (Figura 10-B) e na sequência de inversão-recuperação atenuante de fluido (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*, FLAIR) (Figura 10-C) sem a administração de contraste. Foram observadas lesão no córtex occipital; e lesão no cerebelo.

M1

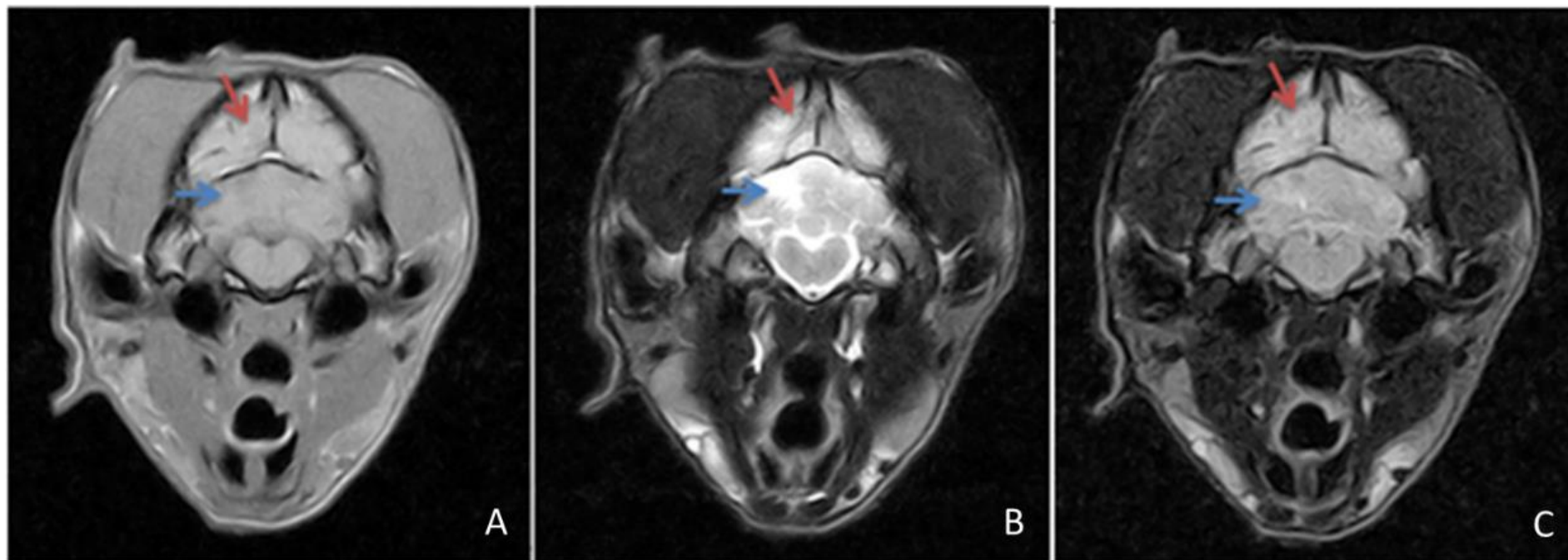


FIGURA 10 – Ressonância magnética do encéfalo antes do transplante intratecal de MSC do paciente 1. (A) tempo ponderado em T1; (B) tempo ponderado em T2; (C) FLAIR. Setas vermelhas indicam lesão no córtex occipital; setas azuis indicam lesão no cerebelo.

As imagens de RM da medula espinhal, região tóracolumbar do animal 2 nos momentos M1 e M2 (Figura 11), sendo que foram observadas antes do transplante das intratecal de MSC, lesões inflamatórias e cicatriz glial caracterizadas pelo hipersinal nas diferentes sequências. Não foi observado melhora das lesões após 30 dias do transplante. As imagens transversais de RM do encéfalo do animal 3, no momento M1 e M2, foram observadas antes do transplante intratecal, áreas de hipersinal no lobo temporal esquerdo em M1 (setas vermelhas) (Figura 12-B e C); e diminuição do hipersinal em M2 (setas) (Figura 12-E e F). Nas imagens sagitais do encéfalo (Figura 13), foi observado aumento do hipersinal, associado à atrofia cerebelar em M2 (seta) (Figura 13-B). Na Figura 13 A e B tem-se sequências ponderadas em T2.

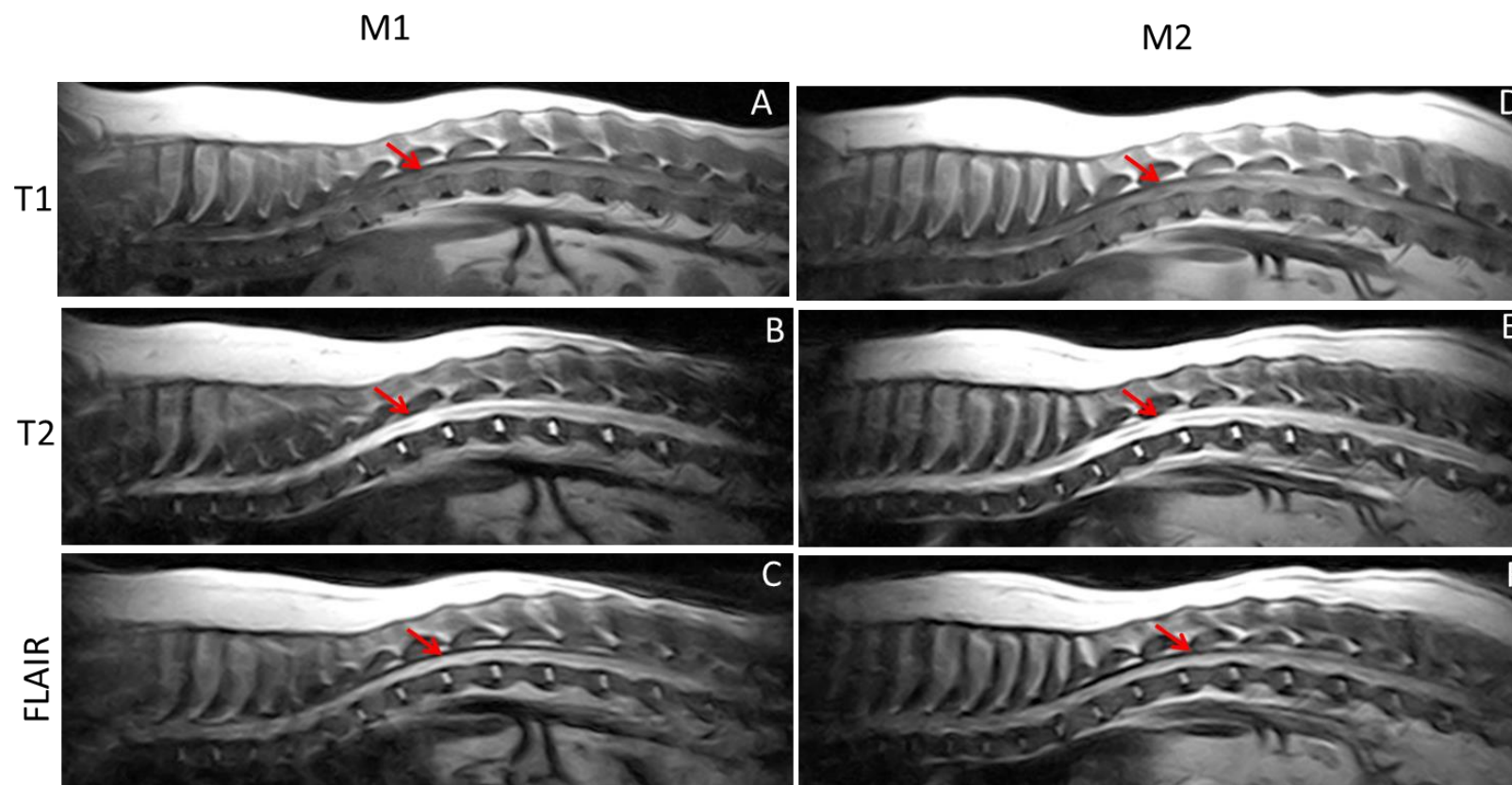


FIGURA 11 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna tóracolombar do paciente 2, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Áreas de hiposinal intramedular em M1 e M2 (setas) (A, D). Áreas de hipersinal intramedular em M1 e M2 (setas) (B, C, E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2; C e F: sequências em Fast Flair.

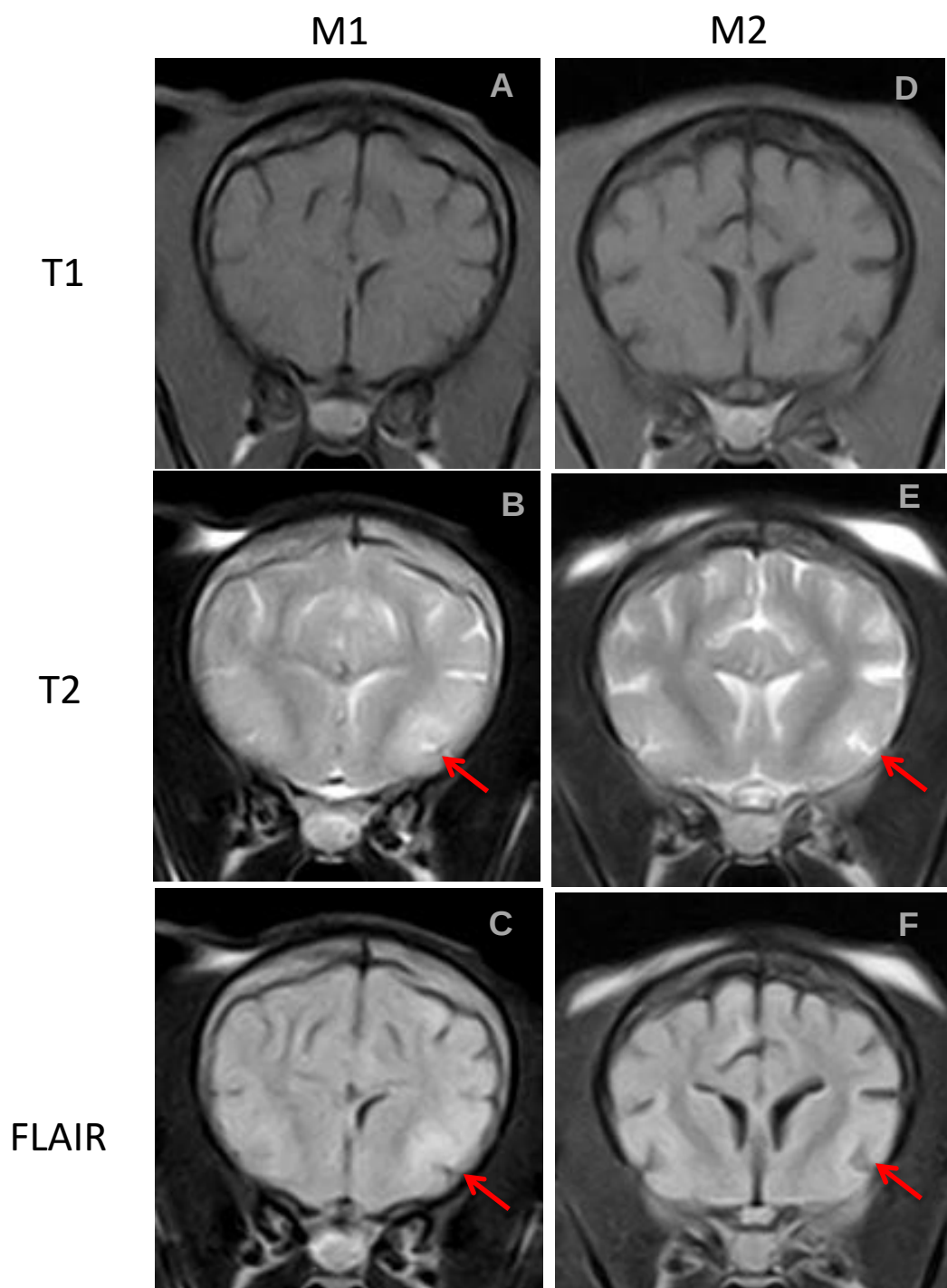


FIGURA 12 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 3, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no lobo temporal esquerdo em M0 (setas) (figuras B, C); diminuição do hipersinal em M2 (setas) (figura E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair.

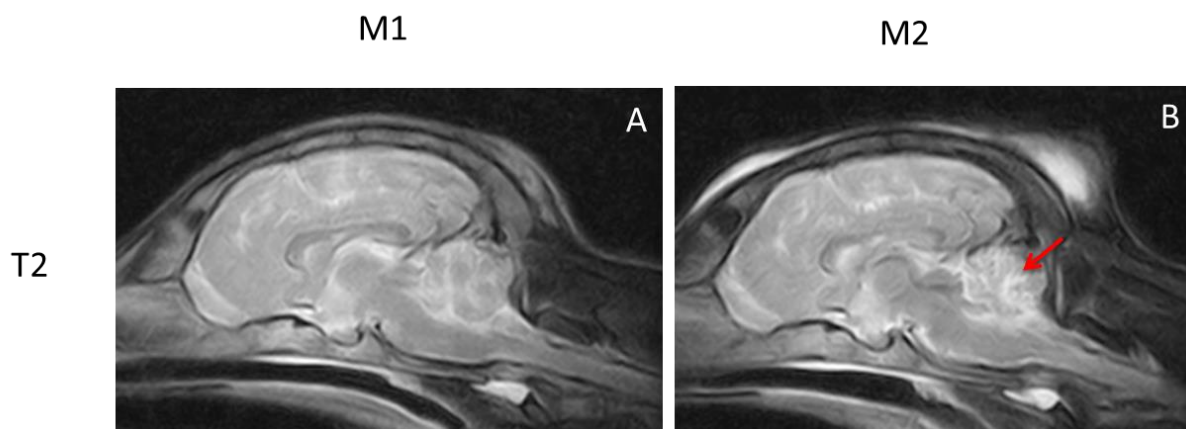


FIGURA 13 – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 3, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Aumento do hipersinal, associado à atrofia cerebelar em M2 (seta) (B). Figuras A e B: sequências ponderadas em T2.

No animal 4, nas imagens transversais do encéfalo (Figura 14) foram observadas uma redução discreta do hipersinal do córtex occipital em M2 (Figura 14-E) em relação ao observado em M1 (Figura B, C). Nas imagens sagitais do encéfalo (Figura 15) foi observada redução do hipersinal do córtex occipital e no cerebelo em M2 (Figura 15-B) comparado com M1 (Figura 15-A).

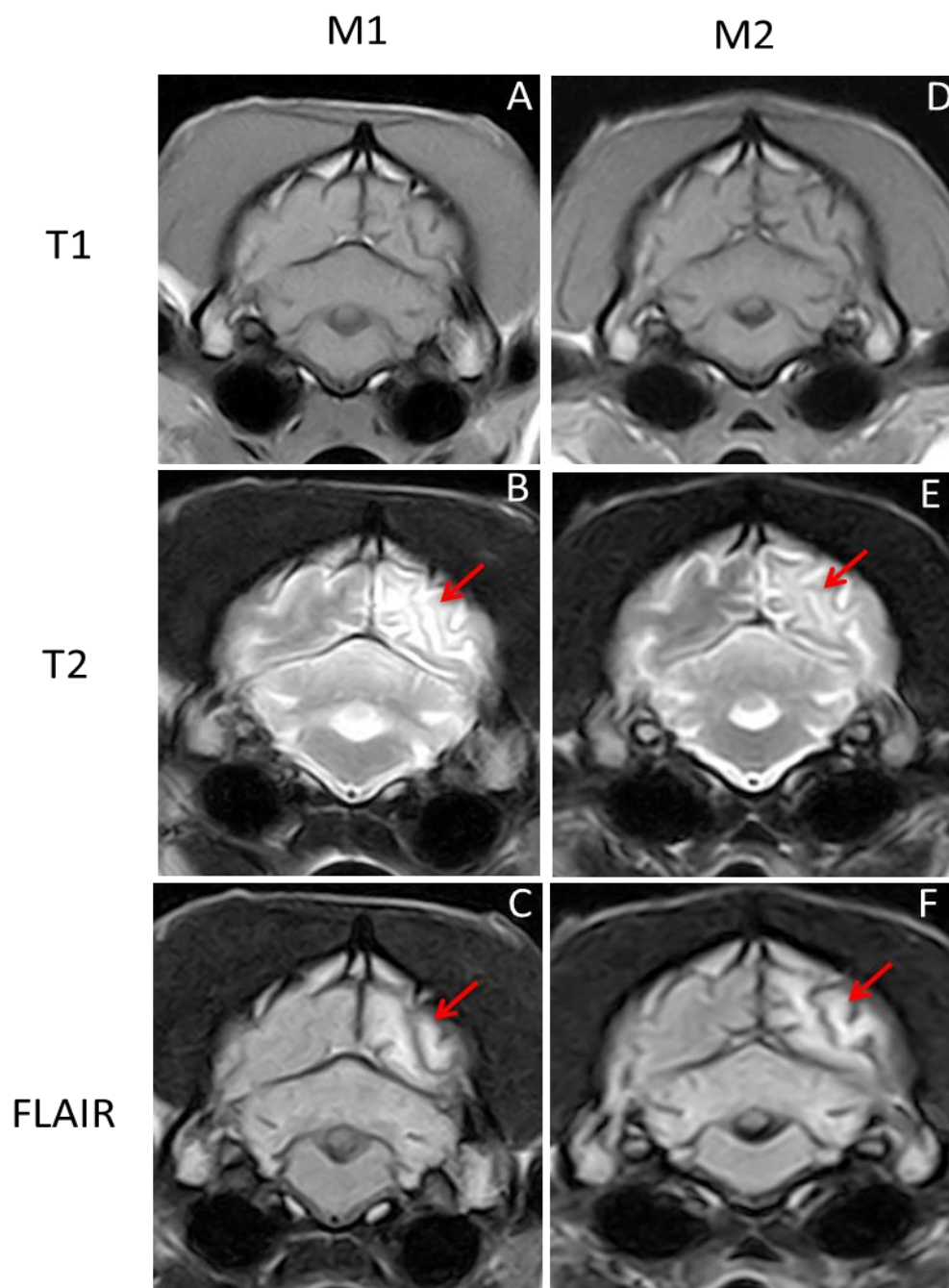


FIGURA 14 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 4, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no córtex occipital em M1 (seta) (B, C); discreta diminuição do hipersinal do córtex occipital em M2 (seta) (E). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair.

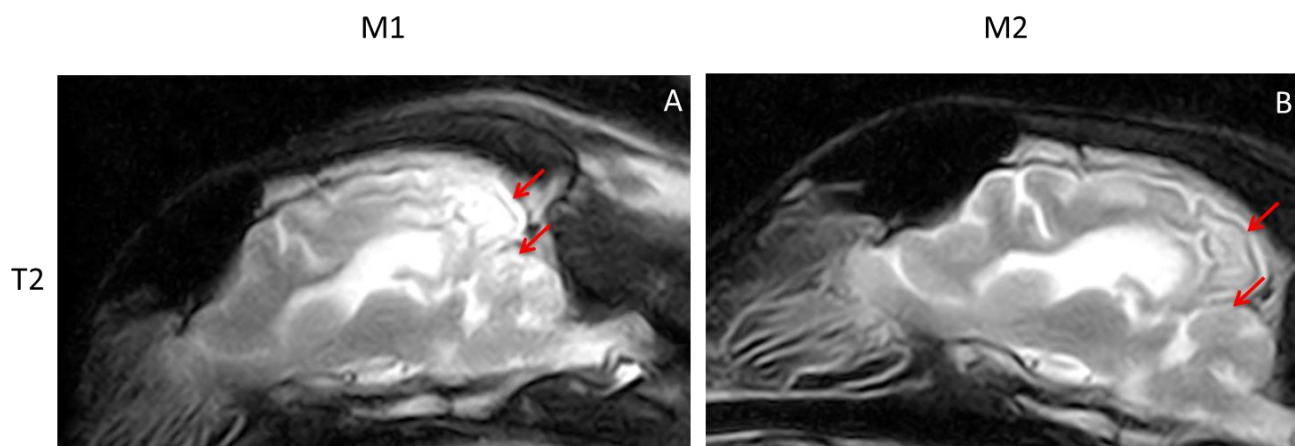


FIGURA 15 – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 4, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no córtex occipital e no cerebelo em M1 (seta) (figura A); diminuição do hipersinal do córtex occipital e no cerebelo em M2 (seta) (figura B). Figuras A e B: sequências com tempo ponderado em T2.

O animal 5, nas imagens sagitais da coluna cervical (Figura 16), realizadas no momento inicial (M1) foram observadas a presença de hipersinal intramedular (Figura 16-A) e no canal central medular (Figura 16-B), e 30 dias após a aplicação das células (M2) as imagens mostraram ausência do hipersinal intramedular (Figura 16-D) e uma redução do hipersinal no canal central medular (Figura 16-E). Nas imagens Flair, observa-se que no M2 (Figura 16-F) o hipersinal intramedular não está mais presente em comparação com M1 (Figura 16-C).

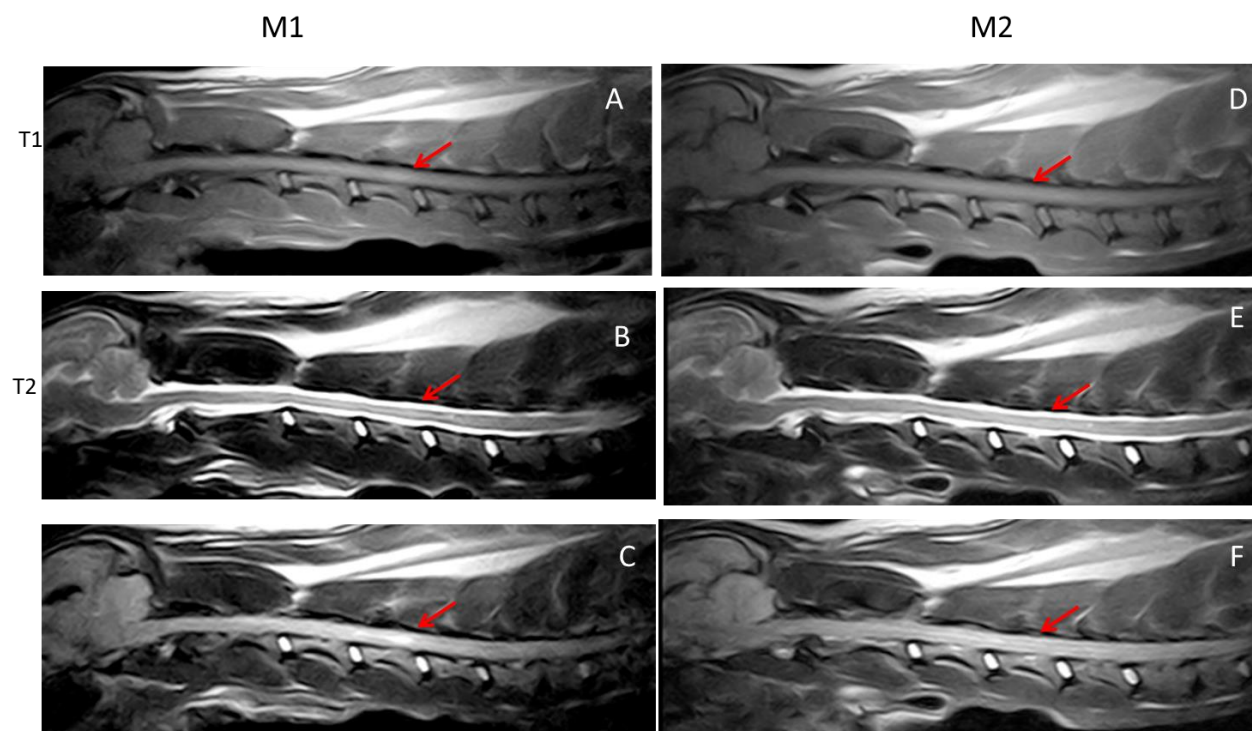


FIGURA 16 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna cervical do cão 5, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal intramedular em M1 (seta) (figura A); ausência do hipersinal em M2 (seta) (figura D). Hipersinal no canal central medular em M1 (seta) (figura B); diminuição do hipersinal no canal central medular em M2 (seta) (figura E). Hipersinal intramedular em M1 (seta) (figura C); ausência do hipersinal em M2 (seta) (figura F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2; C e F: sequências em Fast Flair.

As imagens de RM da medula espinhal, região tóracolumbar do animal 6 nos momentos M1 e M2 (Figura 17). Não foram observadas alterações na medula espinhal toraco-lombar. Imagens ponderadas em T2 (Figura 17- A e C); imagens ponderadas em FLAIR (Figura 17- B e D).

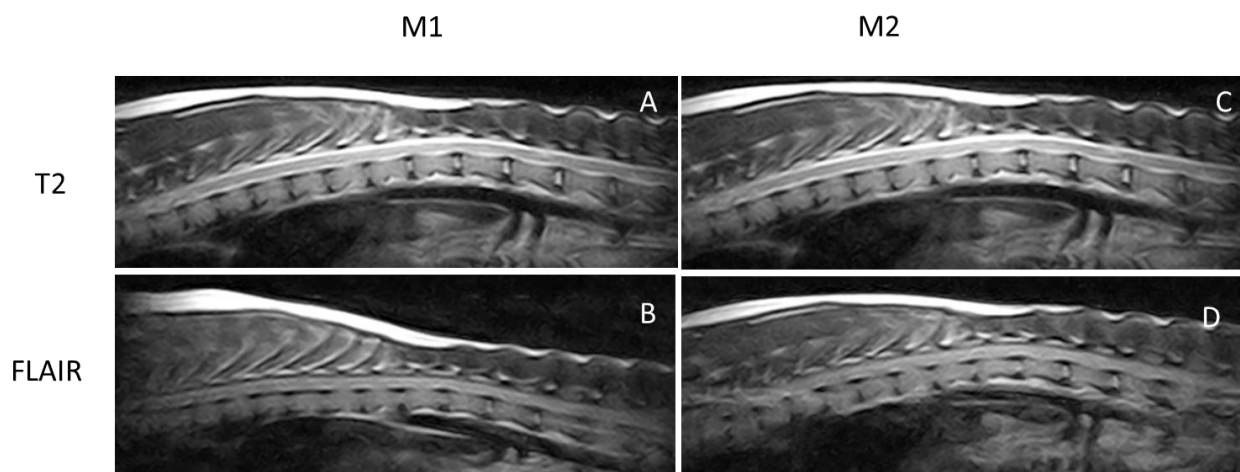


FIGURA 17 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna toraco-lombar do cão 6, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Não foram observadas alterações na medula espinhal toraco-lombar. Imagens ponderadas em T2 (A, C); imagens ponderadas em FLAIR (B, D).

As imagens transversais do encéfalo (Figura 18) do animal 7 mostram hipersinal cerebelar reduzido em M2 (Figura 18 - E e F) em comparação com M1 (Figura 18 - B e C). Nas imagens sagitais (Figura 19) observa-se hipersinal cerebelar em M1 (Figura 19 - B) e ausência do hipersinal cerebelar em M2 (Figura 19 - D). As imagens sagitais da coluna cervical do cão 8 (Figura 20) mostram diminuição do hipersinal intramedular no M2 (Figura 20 - E, F, G e H) em comparação com M1 (Figura 20 - A, B, C e D).

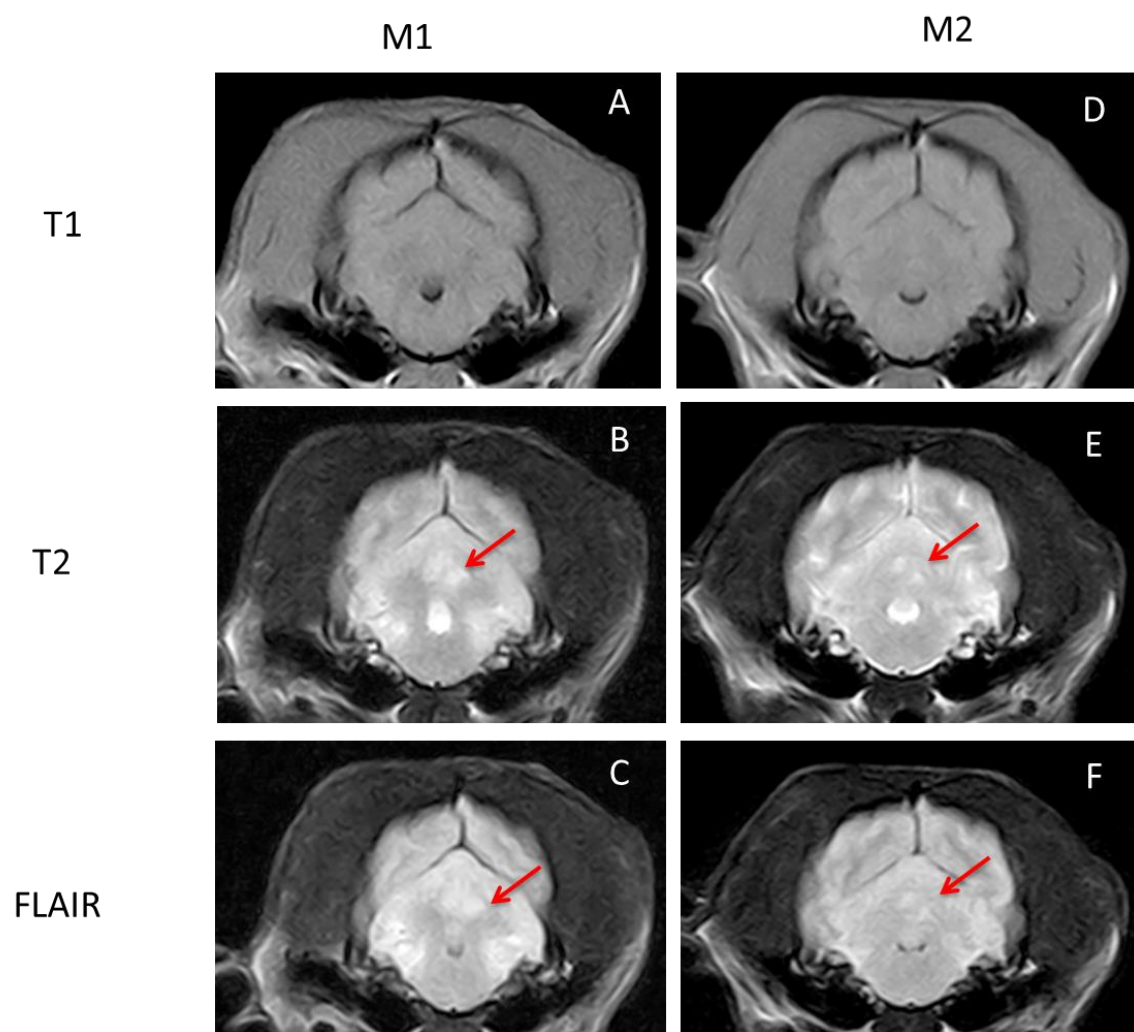


FIGURA 18 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 7, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal cerebelar em M0 (seta) (B, C); diminuição do hipersinal em M2 (seta) (E, F). Figuras A e D: sequências com tempo ponderado em T1; B e E: sequências com tempo ponderado em T2. C e F: sequências em Fast Flair.

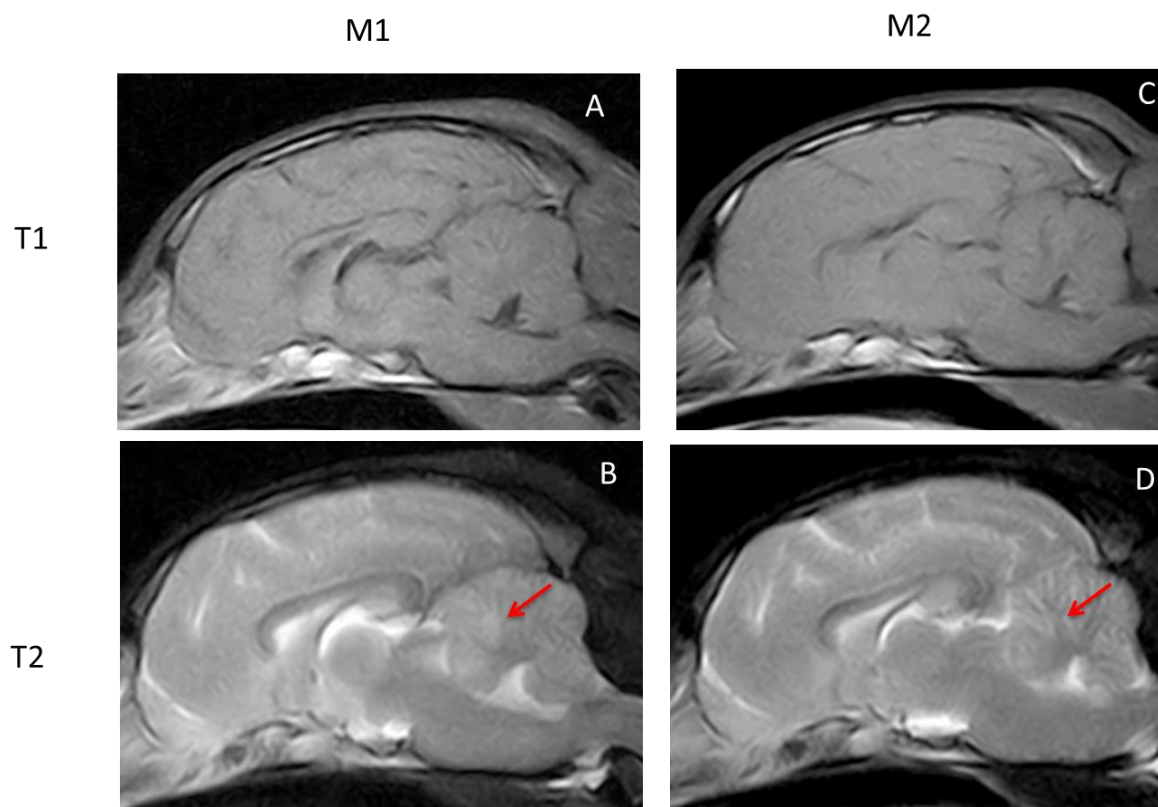


FIGURA 19 – Imagens sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 7, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal cerebelar em M0 (seta) (B); ausência do hipersinal em M2 (seta) (D). Figuras A e C: sequências com tempo ponderado em T1; B e D: sequências com tempo ponderado em T2.

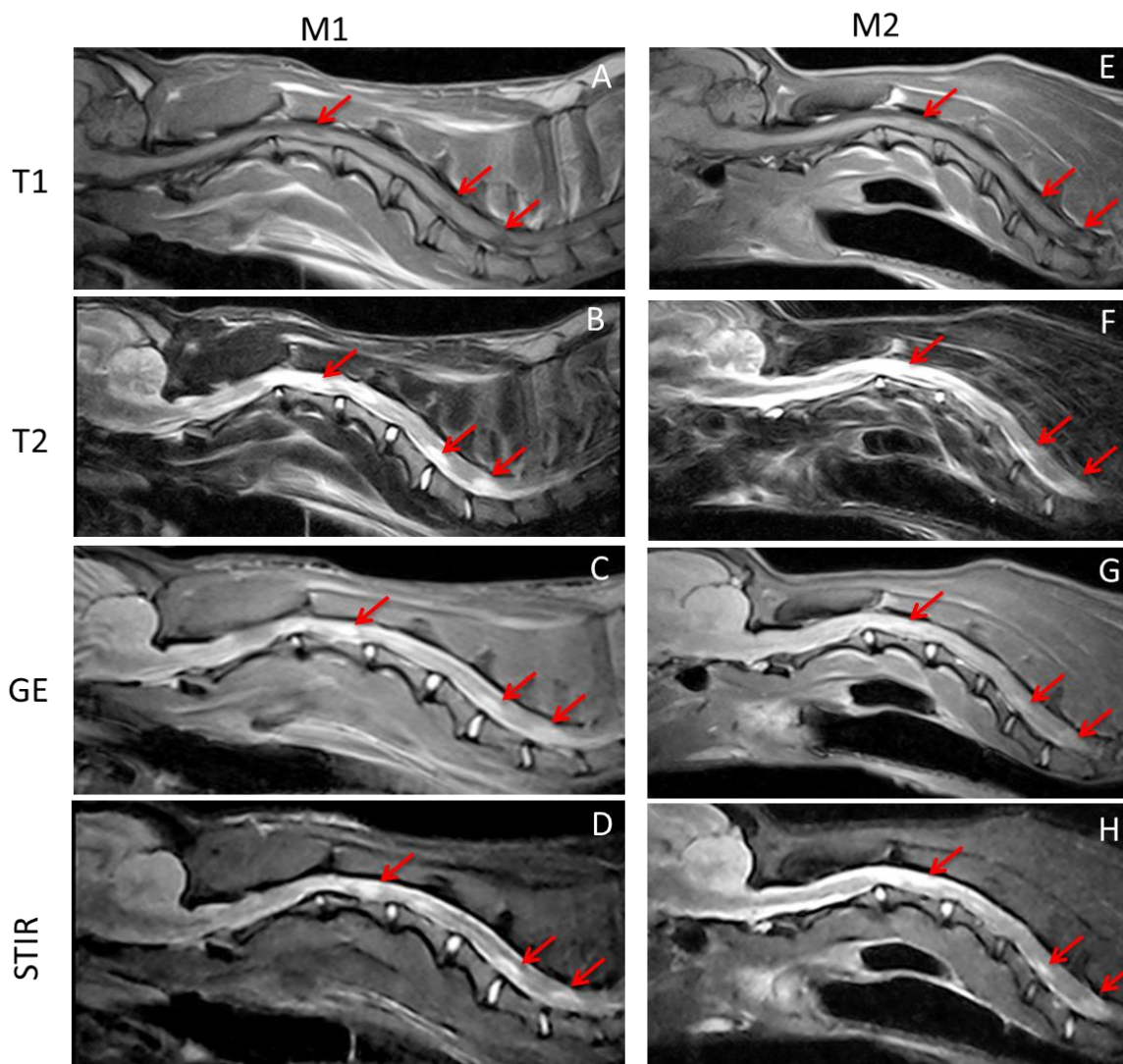


FIGURA 20 – Imagens sagitais de ressonância magnética da coluna cervical do cão 8, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Áreas de hipersinal intramedular em M1 (setas) (A, B, C e D); diminuição do hipersinal intramedular em M2 (setas) (E, F, G e H). Figuras A e E: sequência ponderada em T1; B e F: sequência ponderada em T2; C e G: sequência Gradient Echo; D e H: sequência STIR.

Nas imagens transversais e sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 9, nos momentos M1 e M2, foram observadas permanência de hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M1 (setas) e M2 (Figura 21 A e D) - imagens ponderadas em T2; indicam discreta diminuição do hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M2 (setas) (Figuras B e E) - imagens ponderadas em FLAIR. Diminuição do hipersinal no cortex frontal em M2 (setas) (Figura 21 C e F) - imagens sagitais ponderadas em T2.

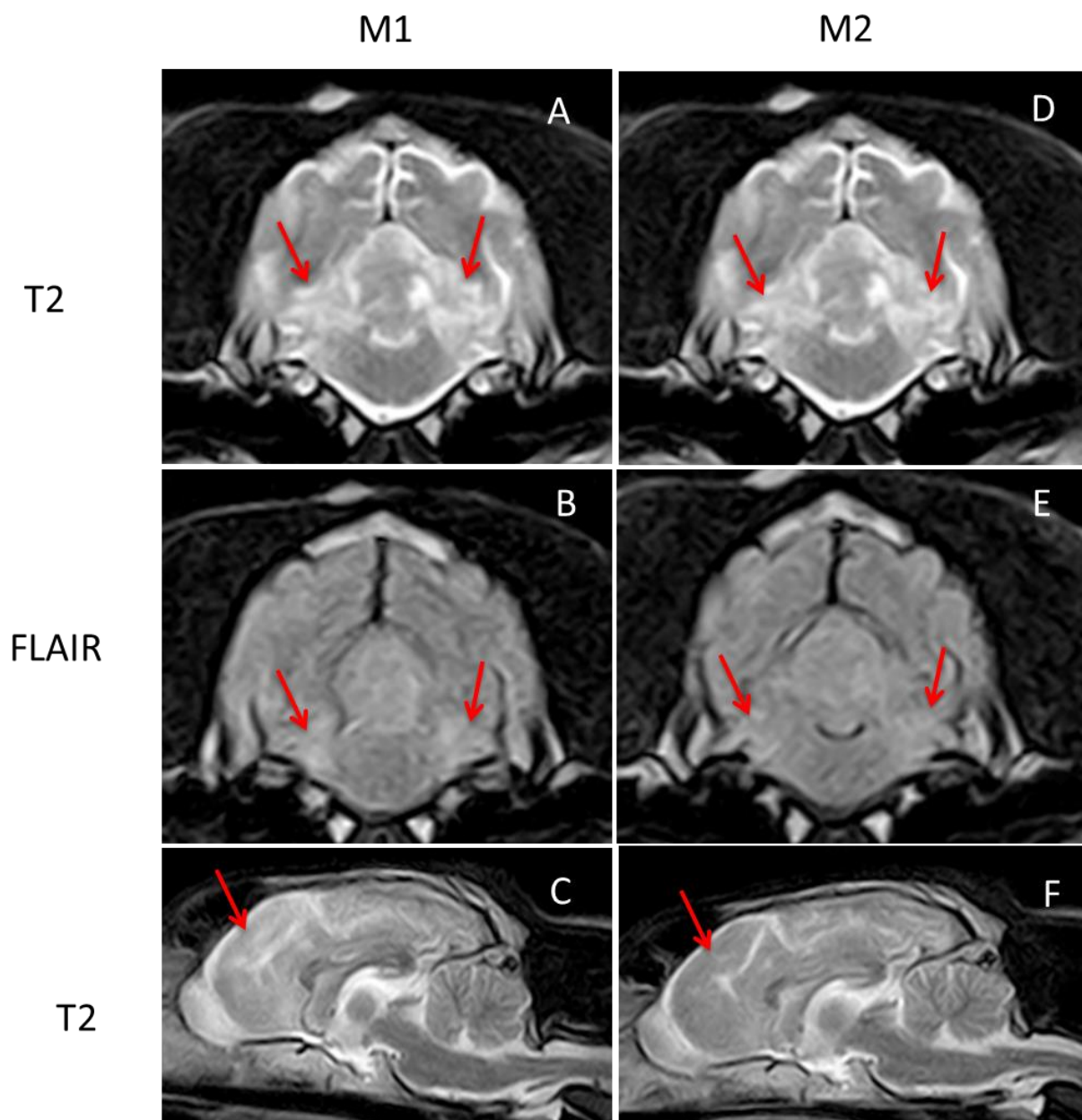


FIGURA 21 – Imagens transversais e sagitais de ressonância magnética do encéfalo do cão 9, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Permanência de hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M1 (setas) e M2 (A, D) - imagens ponderadas em T2; discreta diminuição do hipersinal nos pedúnculos cerebelares em M2 (setas) (B, E) - imagens ponderadas em FLAIR. Diminuição do hipersinal no cortex frontal em M2 (setas) (C, F) - imagens sagitais ponderadas em T2.

As imagens transversais do encéfalo (Figura 22) do cão 10 mostram hipersinal no cerebelo em M2 (Figura 22 - C e D) embora no M1 não houve identificação de área de hipersinal.

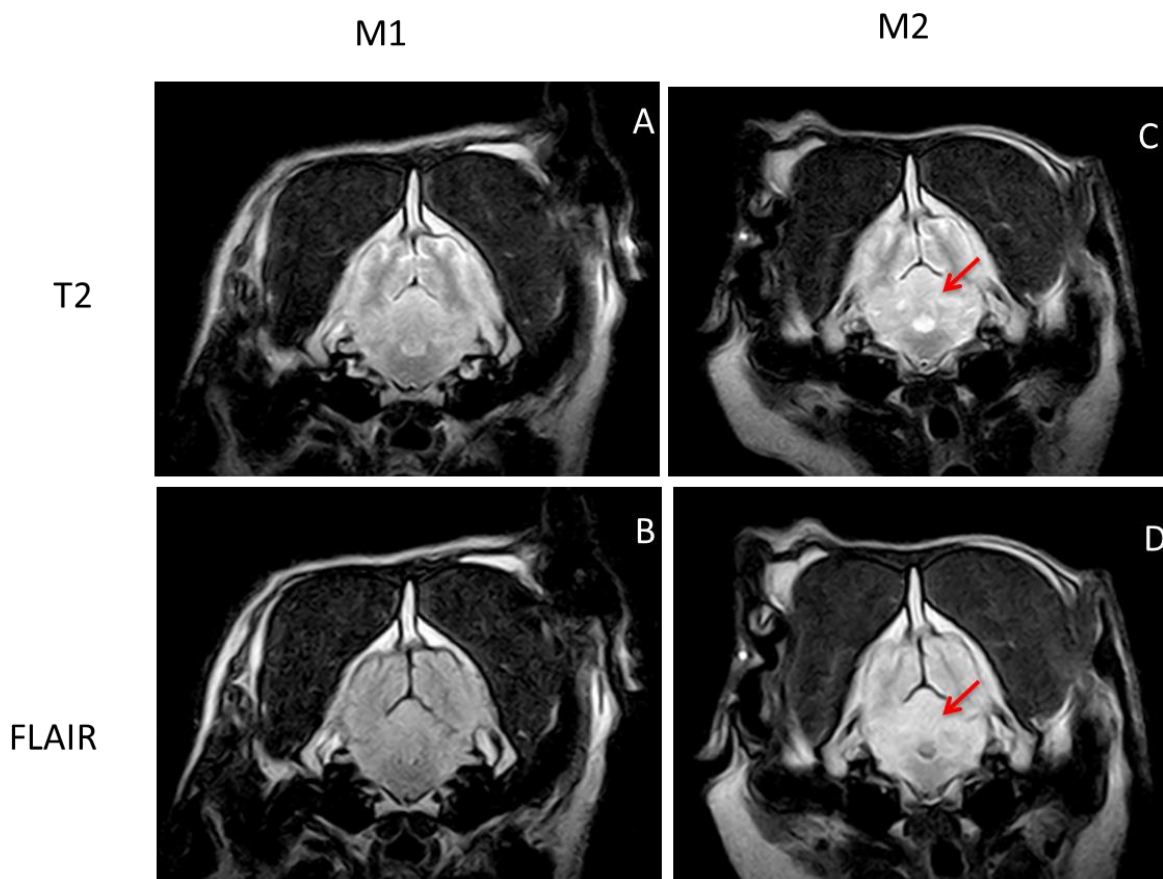


FIGURA 22 – Imagens transversais de ressonância magnética do encéfalo do cão 10, imediatamente antes (M1) e 30 dias após (M2) o transplante intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes. Hipersinal no cerebelo em M2 (setas) (C, D). Figuras A e C: sequências ponderadas em T2; B e D: sequências Fast Flair.

5.5 Análise do LCR

Na análise de LCR pode-se observar que em todos os animais houve a redução do número de células presentes no líquido comparando o M1 com M2, essa redução também pode ser observada em 6 animais em relação à quantidade de proteína, sendo que apenas dois animais (9 e 10) apresentaram um discreto aumento da quantidade de proteína presente no líquido no momento M2 (Tabela 1).

Em relação à pleiocitose no momento M1 apenas três animais (1, 2 e 6) não apresentaram. Pode-se observar também que em 4 animais (5, 7, 8 e 9) houve a reversão da pleiocitose após a aplicação das células, sendo ausente. Curiosamente apenas o animal 4 no M1 apresentava pleiocitose linfocítica e após a aplicação das células no M2 a pleiocitose foi classificada como monocítica (Tabela 1). Outras variáveis analisadas no líquido não apresentaram alteração (APÊNDICE 2).

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

		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10
CÉLULAS (cél/μL)	M1	1	1	77	12	31	2	12	11	6	27
	M2	NR	NR	33	17	2	0	5	1	1	19
PROTEÍNA	M1	Traços (35,5 mg/dL)	Negativo (19,9 mg/dL)	Traços (75mg/dL)	Traços (23,2mg/dL)	Positivo (69,6 mg/dL)	Traços (20 mg/dL)	Traços (41,3mg/dL)	Positivo (63,5 mg/dL)	Positivo (27,1 mg/dL)	Positivo (75 mg/dL)
	M2	NR	NR	Traços (52,5mg/dL)	Traços (19,7mg/dL)	Traços (38.1 mg/dL)	Traços (19,5 mg/dL)	Traços (36,2mg/dL)	Positivo (15,1 mg/dL)	Positivo (32,9 mg/dL)	Positivo (77,5 mg/dL)
PLEOCITOSE	M1	Ausente	Ausente	Linfocítica	Linfocítica	Pleocitose	Ausente	Linfocítica	Neutrofílica	Mista	Mista
	M2	NR	NR	Linfocítica	Monocítica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Mista

*NR: Não realizado

6 DISCUSSÃO

A seleção dos animais foi feita mediante exame clínico, utilizando-se como critérios de inclusão animais que apresentavam sinais clínicos neurológicos, independente da fase da doença, e com histórico vacinal insatisfatório. Adicionalmente como critério definitivo de diagnóstico da cinomose foi utilizado análise Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) em amostra de urina. A técnica de qPCR vem sendo utilizada com sucesso na detecção do CDV em diferentes tipos de amostras biológicas obtidas de cães com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos. Outra forma de detecção é o Kit de Imunoensaio Cromatográfico para detecção de antígeno (Ag) da cinomose em cães. Mas, não é tão eficaz para o diagnóstico da cinomose na forma neurológica quando comparado à técnica de reação em cadeia da polimerase precedida, de transcrição reversa (RT-PCR), além de necessitar de uma grande quantidade de antígeno, podendo levar a um resultado subjetivo (AN et al., 2008; CURTI et al. 2012).

As principais vantagens dessa técnica incluem rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da viabilidade da partícula viral e os altos níveis de especificidade e sensibilidade (Shin et al., 1995; Frisk et al., 1999; Gebara et al., 2004; Elia et al., 2006).

De acordo com Elia et al., (2015), amostras de urina e fezes, independente dos sinais clínicos, são as melhores amostras para o isolamento, identificação e quantificação viral (GEBARA et al., 2004a; NEGRÃO et al., 2007; ALCALDE et al., 2013). Sendo assim, a utilização de amostras de urina nesse estudo demonstrou ser efetiva no teste confirmatório de qPCR para os animais com cinomose como material biológico utilizado em nossa pesquisa. Esse resultado corrobora aos testes obtidos por Negrão et al., (2007) que relataram 90,4% de positividade de todas as amostras urina e sangue, consolidando a técnica.

Adicionalmente, o diagnóstico definitivo para cinomose também pode ser pela pesquisa dos corpúsculos de inclusão conhecidos como corpúsculos de Lentz intracitoplasmáticos ou intranucleares. A pesquisa do corpúsculo de Lentz tem baixo custo e resultado rápido, porém o vírus deve estar em replicação para ser detectado (SILVA et al., 2005). Os corpúsculos de Lentz podem ser

visualizados a partir de esfregaços sanguíneos, no líquido e em impressões das mucosas nasal, prepucial, vaginal e conjuntival de cães com cinomose canina (BRAZ, 2009; WEISS; WARDROP, 2010; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Entretanto nas análises dos esfregaços das amostras sanguíneas coletadas em nosso estudo, não foi observado a presença de corpúsculo de Lentz em hemácias ou leucócitos, portanto não foi possível associar esta prova ao teste confirmatório para o presente estudo.

Curiosamente, durante a fase de seleção dos animais para inclusão na pesquisa, 15 animais apresentando mioclonia em face e membros torácicos foram negativos no teste de q PCR. Estudos consideraram a mioclonia como o sinal clínico mais comum, para cinomose (BREAZILE et al., 1966; TIPOLD et al., 1992; KOUTINAS et al., 2002; LORENZ; KORNEGAY, 2006). Contudo a mioclonia não é um sinal específico da cinomose, pois também pode ocorrer em outras doenças neurológicas, como na degeneração esponjosa no SNC de cães das raças como Labrador Retriever, Saluki, Samoieda e Silky terrier (O'BRIEN, 1981; GREENE; APPEL, 2006; LORENZ; KORNEGAY, 2006). Portanto, interpretar a mioclonia como um sinal exclusivo da cinomose patognomônico é controverso.

De acordo com McCandlish (2001), os sinais clínicos da cinomose são variáveis e podem ser influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos, evoluindo em poucos dias após a infecção (DIAS et al., 2012). Os principais sinais clínicos identificados no momento M0 do nosso estudo foram hiperqueratose e secreção ocular, que são sinais comuns relatados nos casos de cinomose (BEER, 1988; McCANDLISH, 2001; HOSKINS, 2004; SHERDING, 2008; MARTINS et al., 2009; NELSON; COUTO, 2010). No momento M2, houve melhora clínica destes sinais, o que pode ser atribuído a redução da carga viral ou ainda uma possível migração das MSCs de tecido adiposo para os locais de lesão, coxins e glândula lacrimal da terceira pálpebra, promovendo efeito parácrino, o qual possibilitou a recuperação das células nesse local. Embora as células tenham sido aplicadas por via intratecal, existe a possibilidade dessas células migrarem do LCR para a circulação sistêmica e atingir os locais lesionados, recuperando o dano tecidual (FLORES, et al.; 2006, PÉREZ, 2012, ENCISO, 2018).

Esse processo de migração celular é uma característica inerente as MSCs, chamado de homing que é definido como a captura das MSCs pela vasculatura de um tecido, seguido de sua transmigração através do endotélio e migração para outros tecidos (KARP; LENG TEO, 2009) processo de homing é influenciado positivamente pela secreção de diferentes fatores de crescimento secretados pelas células hospedeiras do vírus que se ligam ao receptor CXCR4 das células MSCs. Nas MSCs -TA estão presentes diversas metaloproteinases como MMP2 e MMP9 (ENCISO et al., 2018) que favorecem a migração dessas células a partir de estímulos de citocinas e fatores de crescimento (Sohni; Verfaillie 2013; Shi et al.; 2007; Vieira et al.; 2010. De Becker et al. 2007). Dessa forma esses resultados sugerem que de fato as MSCs contribuíram positivamente para a regeneração da pele do coxim.

A utilização da via intratecal como método para terapia celular em enfermidades do SNC pode ser vantajosa, uma vez que ao atravessar a barreira hematoencefálica, potencializa seus efeitos sobre a imunomodulação tecidual perto do local da lesão, especialmente no tratamento encefalopatias e mielopatias em cães (BAKSHI et al., 2006). O transplante intratecal de MSCs-MO através da cisterna magna ou lombo-sacra em cães (PÉREZ, 2013), equinos (MAIA et al., 2012) e em ratos (BAKSHI, et al., 2006) não apresentaram efeitos adversos, sendo essa via viável, minimamente invasiva e segura, quando comparada com a via intraventricular (ROISEN et al., 2001). Essa via, reduz também a desvantagem sobre os possíveis efeitos do transplante de células pela via intravenosa como perda celular com a microvascularização pulmonar, assim como, o risco de tromboembolismo pulmonar (FISCHER et al., 2008). O procedimento via intratecal, pode apresentar alguns pontos limitantes que podem dificultar a técnica assim como a não utilização dessa via para múltiplos transplantes. Dentre esses pontos, podemos citar a necessidade de anestesia geral, não pode ser utilizado em animais com contraindicação de punção lombar ou atlanto-occipital, além da necessidade de um profissional treinado para técnica,

Fenotipicamente as células obtidas no tecido adiposo e da medula óssea possuem as mesmas características. Considerando a dificuldade de obtenção de células da medula óssea quando se trata de animais de pequeno porte pode –se optar pela utilização de células do tecido adiposo, uma vez que é facilmente

obtida, possui maior capacidade de replicação e possuem a mesma capacidade de migração para a lesão. Sugerindo a substituição da utilização de células provenientes da medula óssea por células provenientes do tecido adiposo (ENCISO et al., 2018).

A população de células isoladas do tecido adiposo é heterogênea e contém uma combinação fisiológica de fibroblastos, células e progenitores endoteliais, pericitos, macrófagos, pré-adipócitos, linfócitos B e T e células musculares lisas. O total da população de células-tronco é estimado em 1 a 3% do total de células nucleadas (DAHLGREN, 2009). Estudos estão sendo realizados no intuito de quantificar o número de células necessárias para exercer um efeito terapêutico no interior da área do órgão alvo para diversas doenças. Em nossa pesquisa foram utilizadas 10×10^6 de células por animal, diferindo de alguns trabalhos feitos com cães por via intravenosa, epidural e intratecal em que o número de células utilizadas foi de 1×10^6 milhão por kg e 5×10^6 por animal. (JUNG et al., 2009; PINHEIRO et al., 2016; MONTEIRO, 2017).

Embora possamos esperar que maior número de células transplantadas conduza a melhores resultados, pode haver um limite após o qual maior número de células não resulte em qualquer benefício. Como um estudo realizado por Otori et al., (2008) em um modelo de isquemia cerebral em ratos, em que houve significativa melhora dos resultados quando foram injetadas doses de 1×10^6 células, ao passo que quando esse número foi aumentado para 3×10^6 células não houve qualquer melhoria, assim como a infusão precoce, logo após a lesão, resultaram em maiores índices de fixação, porém não foi possível detectar qualquer benefício em termos de resultados finais. Entretanto, acreditamos que sucessivos transplantes poderiam levar a uma resposta terapêutica ainda melhor, fato observado por (MONTEIRO, 2017; JARROCHA et al.; 2015)

Em relação as alterações observadas durante a avaliação neurológica no momento M0 e M2 os animais foram classificados dentro de uma escala (Escala de Neurodeficiência), desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, a partir do exame neurológico. Entre os 10 animais avaliados com lesões neurológicas sete apresentaram uma redução no grau da Escala de Neurodeficiência, dois animais progrediram e um não houve alteração do grau. A redução do grau fica evidente pela melhora clínica de sinais neurológicos como: Postura, Marcha, Coordenação, Nervos Cranianos e Crises epiléticas.

A região em que foram obtidas as imagens de ressonância magnética, foram determinadas de acordo com a localização da lesão durante o exame neurológico. A melhora dos sinais clínicos, e portanto do grau de neurodeficiência demonstra ser compatível com as imagens ressonância magnética obtidas no M2 dos animais., em que o animal 4 apresentou (redução do hipsinal em córtex occipital e cerebello), o 5 (ausência do hipsinal intramedular e redução do hipsinal do canal central medular), o 7 (redução do hipsinal cerebelar), o 8 (redução do hipsinal intramedular) e o animal 9 (discreta redução do hipsinal em pedúnculos cerebelares).

Os animais 3 e 10, apresentaram piora dos sinais neurológicos, representado pelo aumento do grau na escala de neurodeficiência. Essa progressão dos sinais clínicos foi compatível com os achados da ressonância, onde o número 3 apresentou atrofia cerebelar e aumento do hipsinal e o animal número 10 apresentou aumento do hipsinal no cerebello. Nestes casos a progressão dos sinais e a não resposta a terapia podem estar relacionados a fase aguda da doença em que estes animais se encontravam, corroborando com os resultados obtidos por Brito et al. 2009 e Pinheiro, 2016 onde o tratamento realizado com cães na fase virêmica da doença demonstrou ser ineficaz.

Por outro lado, o animal 8 demonstrou discreta melhora dos dados obtidos nas imagens de RM, mas manteve-se na mesma escala de graduação de neurodeficiência. O estado crônico com lesões avançadas, como atrofia muscular intensa, poderia justificar a não melhora clínica no período avaliado.

Tecidos lesados secretam TNF-alfa que é associado a apoptose celular, altas concentrações de TNF-alfa dificultam o homing das MSCs, reduz a capacidade de reparo tecidual e a secreção de fatores como VEGF e BDNF que auxiliam na migração das MSCs para o local de lesão (LI et al., 2019). Recentemente foi demonstrado que a utilização de G-CSF em associação com o transplante de MSCs permite a redução dos níveis de TNF-alfa secretado pelo tecido lesionado, o que aumenta o poder de reparo tecidual, reduz a apoptose e aumenta a secreção de fatores que auxiliam na migração das MSCs para o local de lesão (LI et al., 2019).

Dessa forma os resultados avaliados por Li et al., (2019), sugerem que em casos crônicos da doença, onde há uma grande perda celular, a concentração de TNF-alfa no tecido lesado seja alta, dificultando a migração e a

regeneração tecidual adicionalmente tem sido descrito que as MSCs produzem inúmero fatores de crescimento e citocinas que facilitam o reparo endógeno (ENCISO et al., 2018).

O animal 2 apresentou resultados inversos ao paciente 8, não havendo melhora das lesões nas imagens de RM obtidas no M2, mas o grau na escala de neurodeficiência melhorou após o transplante. A manutenção do padrão das imagens de RM pode estar relacionada com a necessidade de um maior tempo para recuperação do tecido ou menor sensibilidade do equipamento de RM utilizado, em detectar lesões menores, que poderiam ter melhorado com o tratamento. Outra explicação seria o fato de que nem sempre há uma correlação forte entre os sinais clínicos e as imagens de RM., fortalecendo dados clínicos observados em outros estudos em que pode-se observar um sinal clínico grave, sem que a imagem de RM esteja grave também (BATHEN et al.; 2008; GRIFFIN; YOUNG; LEVINE, 2009)

Até o momento não havia trabalhos que correlacionassem dados obtidos em ressonância magnética de cães com alterações neurológicas na cinomose antes e após o transplante com MSCs -TA pela via intratecal., além de um número escasso de trabalhos que descrevam lesões no SNC causadas pela cinomose por meio de imagens de ressonância. Isso demonstra a necessidade de mais estudos que incluam imagens de lesões SNC de cães com cinomose resposta clínica ao transplante, além do estabelecimento de protocolos de terapia celular, de acordo com o tipo de célula tronco utilizada por essa via de transplante, quantidade de células transplantadas e frequência de aplicação, visando o tratamento dessa enfermidade.

Na análise de LCR pode-se observar que em todos os animais houve a redução do número de células presentes no líquido comparando o M1 com M2. Essa redução também pode ser observada em seis animais em relação à quantidade de proteína.

No momento M1 apenas três animais (1, 2 e 6) não apresentaram pleocitose. Essa ausência também foi verificada por Chrisman (1985), Abate et al. (1998); Tipold (2003) e Gama et al. (2005) em cães com cinomose apresentando sinais neurológicos, que associaram este achado a cães em estágios iniciais e agudos da fase neurológica da referida enfermidade. Discordando com nosso estudo, pois o animal 1 e 2, já não se encontravam na

fase neurológica inicial da doença e sim na fase crônica. Por outro lado, em situações de afecções, Vandeveld e Spano (1977), Coles (1986) e Feitosa et al. (1997) relataram que, normalmente, em cães portadores de encefalite ocorre hiper celularidade líquórica, cujas infecções virais a pleocitose é caracterizada por maior quantidade de linfócitos, havendo ainda, a presença de monócitos, macrófagos e raros neutrófilos., destacam ainda que, o achado de pleocitose de natureza linfocíticas também pode ocorrer nas infecções crônicas, fato demonstrado pelo paciente número 4 no momento 1.

No presente estudo 7 animais (3, 4,5,7,8,9 e10) apresentaram pleocitose linfocítica no momento M 1 demonstrado pelo aumento da celularidade do LCR concordando com os achados de Vandeveld e Spano (1977), Thomas et al. (1993) e Gama et al. (2005) os quais relacionam este achado à cinomose canina.

Pode-se observar também que em 4 animais (5,7,8 e 9) houve a reversão da pleiocitose após a aplicação das células, sendo essa ausente em M2. Em condições de normalidade e sem contaminações, o número total de células nucleadas geralmente não ultrapassa 5-6 céls/ μ L, dentre as quais são encontrados linfócitos, monócitos e macrófagos, como reportado por Feldman (1989) e Fernandes (1990), Terlizzi e Platt (2009) dado observado no momento M2 do nosso estudo em 4 animais (5,7, 8 e 9) que apresentaram reversão da pleocitose, podendo sugerir que o transplante de células pode ter contribuído ao retorno da normalidade desse.

Em situações de quebra do estado de higidez do SNC, os níveis protéicos podem estar aumentados, principalmente nos casos de encefalites, tal qual descrito por Sorjonem (1987); Braund (1994); Feitosa et al. (1997) e Abate et al. (1998), em cães com cinomose toxoplasmose, meningite, abscessos de medula ou cérebro e, também, em condições não inflamatórias , fato esse observado em um estudo feito por Gama et al.; (2005) e também notado em nosso estudo , em que os animais apresentaram número de proteínas aumentados em M1. No momento M2 houve melhora dos valores de proteína em relação ao momento em M1 dos animais (3, 4, 5, 6, 7, 8), sendo que alguns animais (3, 5, 7 e 10) permaneceram ainda com um número levemente aumento de proteínas. Nos animais 9 e 10 o aumento de proteínas no momento 2 em relação ao momento 1, pode estar relacionado a fase da doença e so fatores neurotróficos e citocinas secretadas pelas células.

No presente estudo, os animais avaliados apresentaram uma boa evolução clínica. Atestando a eficácia do transplante de células estromais

mesenquimais derivadas do tecido adiposo por via intratecal como tratamento coadjuvante para atenuar as sequelas da encefalomyelitis causada pelo vírus da cinomose canina. No entanto a utilização dessa terapia para ser empregada na rotina clínica, pode encontrar alguns pontos limitantes, como o custo da matéria prima e o encarecimento da técnica, acesso financeiro limitado para algumas fatias da população, além da necessidade de um, profissional que tenha conhecimento e treinamento para a execução exata da técnica.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do transplante de células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo por via intratecal como tratamento da encefalomyelite causada pelo vírus da cinomose canina.

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais descritas conclui-se que a via intratecal para o transplante das MSCs - TA alogênicas em cães é viável e segura, pois demonstrou ser minimamente invasiva, rápida e permite transplantar um grande número de células no espaço subaracnóideo.

Nos animais do presente estudo foi realizado um único transplante de 10×10^6 MSCs -TA alogênicas por via intratecal que demonstrou ser efetiva na melhora dos sinais clínicos. Dos dez animais observados na avaliação neurológica, sete apresentaram uma redução considerável no grau da Escala de Neurodeficiência. A redução do grau mostrou-se evidente pela melhora clínica dos sinais neurológicos apresentados na Postura, Marcha, Coordenação, Nervos Cranianos e Crises epiléticas.

As análises das imagens de ressonância magnética demonstraram a evolução e melhora das lesões dos animais, assim como permitiu correlacioná-las aos sinais clínicos neurológicos antes e após o transplante. Além disso, a melhora pode ser detectada mediante análise do LCR que apontou redução do número de células presentes comparando os dois momentos (M1 e M2), essa redução também pode ser observada em relação à quantidade de proteína.

No presente estudo, os animais avaliados apresentaram uma boa evolução clínica. Atestando a eficácia do transplante de células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo por via intratecal como tratamento da encefalomyelite causada pelo vírus da cinomose canina. Todavia, apesar dos bons resultados obtidos o sucesso desse método de tratamento depende da identificação precisa dos mecanismos e moléculas que controlam e mediam a diferenciação de uma determinada linhagem celular, assim como do mecanismo patológico envolvido na desmielinização neurológica, além do estabelecimento de protocolos de terapia celular, de acordo com o tipo de célula tronco utilizada por essa via de transplante, quantidade de células transplantadas e frequência de aplicação, visando o tratamento dessa enfermidade.

8 REFERÊNCIAS

ABATE, O.; BOLLO, E.; LOTTI, D.; BO, S. Cytological, immunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system disorders of dogs. *Journal of Veterinary Medicine*, v.45, p.73-85, 1998.

ALCALDE, R.; KOGIKA, M. M.; FORTUNATO, V. A. B.; COELHO, B. M. P.; LOPES, L. R.; PAIVA, P. B.; DURIGON, E. L. Canine distemper vírus: detection of viral RNA by Nested RT-PCR in dogs with clinical diagnosis. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal*. v. 50, n. 1, p. 74-76, 2013.

ALIPOUR F, PARHAM A, KAZEMI MEHRJERDI H, DEHGHANI H Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell Journal* v. 16 n.4. p. 456–465, 2015

ALMEIDA, M. S.; TEIXEIRA, M. N.; REGO, E. W.; ALMEIDA, T. L. C.; VAZ, S. G.; SANTOS, B. M. et al. Visualização de inclusão viral em hemácias – relato de caso. In: Eventos Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009, Pernambuco. Anais SUFRPE, Pernambuco, 2009.

ALVES, L.; KHOSRAVI, M.; AVILA, M.; ADER-EBERT, N. BRINGOLF, F.; ZURBRIGGEN, A. et al. SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus astrocytes. *Journal of Virology*, v.89, n.10, p.5724-5733, 2015.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. The nervous form of canine distemper. *Veterinária e Zootecnia*, v. 13, n. 2, p. 125-136, 2006.

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

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ARIAS, M. V. B.; ALFIERI, A. F. Clinical syndromes of nervous distemper in dogs initially presented without conventional evidences of CDV infection, *Semina: Ciência Agrárias*, v.33, n.6, p.2347-2358, 2012.

AN, D.J.; KIM, T.Y, SONG, D.S.; KANG, B. K.; PARK, B. K. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *Journal Virological Methods*, v.147, p.244-249, 2008

APPEL, M.J.G.; GIBBS, E.P.J.; MARTIN, S.J.; VER MEULEN, B.K.; RIMA, J.R.; STEPENSON, W. P. Morbillivirus diseases of animals and man. *Comparative diagnosis of viral disease*, v.6, p.235-297, 1981.

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: APPEL, M. J. Virus infection of carnivores. Amsterdam: Elsevier, p. 133–59, 1987.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of Morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiol.* v.44, p.187–91, 1995.

APPEL, M. J. G. Cinomose. In: BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. Doenças Infecciosas e Parasitárias em Cães e Gatos. Consulta em 5 minutos. cap.23, Rio de Janeiro: Revinter, 2010, p.113-118.

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. cap.26, Santa Maria: Editora da UFSM, 2007, p. 659-688.

ASANUMA H.; MELDRIM, D.; MELDRUM, K. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells to repair kidney injury. *Journal of Urology*, v. 184, n 1, p 26-33, 2010.

AUBIN JE, LIU F, CANDELIERE GA PCR methods for studying stem cells and progenitors. *Methods in Molecular Biology* v.185 p.403–415,2002

BARBOSA, J. M.; PASSOS, R. F. B. Análise dos casos de cinomose no HV São Francisco de Assis da Faculdade Latino Americana. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v.12, n.11, p.139-150, 2008.

BARBOSA, T. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIOL, M. A.; SOEIRO, C. S., BONFIM, S. R. M.; CIARLINI, P. C. Avaliação laboratorial da cinomose canina – estudo retrospectivo de 25 casos no município de Araçatuba, SP. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 10, n. 2, p. 1-6, 2011.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology*, v. 69, n. 1-2, p. 3-13, 1999.

BAKSHI, A.; BARSHINGER, A.; SWANGER, S.; MADHVANI, V.; SHUMSKY, J.; NEUHUBER, B.; FISCHER, I. Lumbar Puncture Delivery of Bone Marrow Stromal Cells in Spinal Cord Contusion: A Novel Method for Minimally Invasive Cell Transplantation. *Journal of Neurotrauma*, v. 23, n. 1, p. 55–65. 2006.

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.460-7, 2008.

BEER, J. Doenças causadas por vírus, infecções por clamídeas, richettiose, Micoplasmose. In: BEER, J. Doenças Infecciosas em Animais domésticos. São Paulo: Roca, 1998.

BREAZILE, J. F.; BLAUGH, B. S.; NAIL, N. Experimental study of canine distempermyoclonus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 27, n. 120, p. 1375-1379, 1966.

BEINEKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 127, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

BAJEK A, GURTOWSKA N, OLKOWSKA J, KAZMIERSKI L, MAJ M, DREWA T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* v.64. n.6p.443-454, 2016

BEYTH, S.; BOROVSKY, Z.; MEVORACH, D.; LIEBERGALL, M.; GAZIT, Z.; ASLAN, H. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness, *Blood*, v. 105, p. 2214-2219, 2005.

BICHARD, Stephen J. *Manual Saunders de Clínica de Pequenos Animais*. São Paulo, Roca, 2008, 2048p.

BLACK, L. L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAMS, C.; ARON, D.; HARMAN, S. et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics*. v.8, p. 272-284, 2007.

BLACK, L. L.; GAYNOR, J.; ADAMS, C.; DHUPA, S.; SAMS, A. E.; TAYLOR, R. et al. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary Therapeutics*, v.9, p. 192-200, 2008

BLAKEMORE, W. F.; SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. G. Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica*, v. 77, n. 5, p. 550-553, 1989.

BLANCOU, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? *Historia Medicinae Veterinariae*, v.29, p.35–41, 2004.

BLIXENKRONE-MÖLLER, M.; SVANSSON, V.; APPEL, M.; KROGSRUD, J.; HAVE, P.; ORVELL, C. Antigenic relationship between field isolates of Morbilliviruses from different carnivores. *Archives Virology*. v.123, p.279–94, 1992.

BLIXENKRONE-MÖLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.; PEDERSEN, I. R.; DIETZ, H. H. et al. Studies on manifestation of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology*, v. 37, n.1-2, p.163-173, 1994.

BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.; PADOIN, A. V.; MACHADO, D. C.; GARICOCHEA, B.; COSTA, D. A. et al. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *The Journal of Hand Surgery*, v. 33, p. 488-49, 2008.

BRAUND, K. G. Distemper. In: BRAUND, K. G. *Clinical syndromes in veterinary neurology*. 2 ed. St Louis: Mosby, 1994. p.115-119.

BRAZ, G. F. Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina, 2009. 43 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2009.

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

BRUNNER, J.M.; PLATTET, P.; MAJCHERCZYK, P.; ZURBRIGGEN, A.; WITTEK, R.; HIRLING, H. Canine distemper virus infection of primary hippocampal cells induce increase in extracellular glutamate and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, v.103, p.1184-1195, 2007.

BUDASZEWSKI, R. F.; PINTO, L. D.; WEBER, M. N.; CALDART, E. T.; ALVES, C. D.; MARTELLA, V. et al. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Research*., v.180, p.76-83, 2014

BUDASZEWSKI, R. F.; VON MESSLING, V. Morbillivirus Experimental Animal Models: Measles Virus Pathogenesis Insights from Canine Distemper Virus. *Viruses*. v. 8, n.10, p. 274, 2016.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 31, p. 25-35, 2009.

CALDERON, M. G.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper vírus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.125, p.341-349, 2007.

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

CARVALHO, O. V.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, C. G. T.; SCHERER, P; O; SOARES-MARTINS, J. A. P.; ALMEIDA, M. R. et al. Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. *Advances in Virology*. v.1, n. 1, p.1-10, 2012.

CASTRO-SILVA, I. I.; COUTINHO, L. A. C. R.; GRANJEIRO, J. M. Revisão sistemática sobre o uso de células-tronco mesenquimais em terapias de perdas ósseas. *Innovations Implant Journal*, v. 5, n. 3, p.29-34, 2010.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. of Biochem. Cell Biol.*, v.40, n.5, p.815-820, 2008a.

CHEN, B. K.; STAFF, N. P.; KNIGHT, A. M.; NESBITT, J. J.; BUTLER, G. W.; PADLEY, D. J. et al. A safety study on intrathecal delivery of autologous mesenchymal stromal cells in rabbits directly supporting Phase I human trials. *Transfusion*, 2014.

CHO, Y.; JANG, S.; LEE, S. C.; JEONG, H. S.; PARK, J. S.; HAN, J. Y. et al. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in a acute nerve injury model. *Laryngoscope*, v. 120, p. 907-913, 2010.

CHRISMAN, C.; MARIANI, C.; PLATT, S.; CLEMMONS, R. Neurologia para o clínico de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2005. 336 p.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; SHAKIBAEI, M. Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochem Cell Biol.* v. 131, n.2, p. 251–266, 2009.

COLES, E.H. Cerebrospinal fluid. In: COLES, E.H. Veterinary clinical pathology. Canadá: Saunder, 1986. p.267-278.

CORRÊA, C. N. M. Cinomose. In: CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. (Eds). *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 655-670.

COSTA, B. G. Utilização de terapia celular em afecções neurológicas do sistema nervoso central, 51p. Trabalho de conclusão de curso de medicina veterinária- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CURTI, M.C.; ARIAS, M.V.B.; ZANUTTO, M.S. Avaliação de um *kit* imunoensaio cromatográfico para detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n.6, p. 2383-2390, 2012.

CURTI, M. C.; ARIAS, M. V.B.; ZANUTTO, M. S.; DIAS, M. B. M. C.; LIMA, E. R.; FUKAHORI, F. L. P. et al. Cinomose canina: revisão de literatura. *Medicina Veterinária*, v. 6, n. 4, p. 32-40, 2012.

CRAWFORD, P.C.; SELLON, R.K. Canine Viral Diseases. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 2010. p.958-962.

CHRISMAN, C. L. Investigações auxiliares especiais. In: CHRISMAN, C. L. *Neurologia dos pequenos animais*. São Paulo: Roca, 1985. p.63-96.

DAHLGREN, L. A. Management of tendon injuries. In: ROBINSON, N. E., SPRAYBERRY, K. A. *Current therapy in equine medicine*. 6ed. St. Louis: Saunders, 2009. p.518-23.

DAHLGREN, L.A. Management of tendon injuries. In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K.A. *Current therapy in equine medicine*. St. Louis: Saunders, 2009a. chap. 115, p. 518-523.

DECARO, N.; CAMERO, M.; GRECO, G.; ZIZZO, N.; TINELLI, A.; CAMPOLO, M. et al. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiologica*, v.27, p.177–81, 2004.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood*, v. 99, p. 3838-3843, 2002.

D'INTINO, G.; VACCARI, F.; SIVILIA, S.; SCAGLIARINI, A.; GANDINI, G.; GIARDINO, L. et al., A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis. *Brain Research*, v. 1098, p. 186-195, 2006.

DI TERLIZZI, ROBERTA; PLATT, S. 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.

DE BECKER, A.; VAN HUMMELEN, P.; BAKKUS, M.; VANDE BROEK, I.; DE WEVER, J. D.; WAELE, M. et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*, v. 92, n. 4, p.440–449, 2007.

DE LAHUNTA, A.; GLASS, E.; KENT, M. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 3ed. Philadelphia: Saunders, 2010, 600p.

DE LAHUNTA, A.; GLASS, E.; KENT, M. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 4ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2015. 587p.

DEL CARLO, R. J. Células-tronco: Células da esperança. *Revista CFMV*. v.11, n. 35, p. 60-68, 2005.

DEL PUERTO, H.L.; VASCONCELOS, A.C.; MORO, L.; ALVES, F.; BRAZ, G. F.; MARTINS, A. S. Canine distemper vírus detection in asymptomatic and non-vaccinated dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.30, n.2, 2010.

DE SWART, R. L.; LUDLOW, M.; DE WITTE, L.; YANAGI, Y.; VAN AMERONGEN, G.; MCQUAID, S. et al. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 11, e178, 2007.

DEWEY, C. W. *Neurologia de Cães e Gatos*. 2 ed., São Paulo, Roca, 2008.

DEWEY, C. W. Neuroanatomia funcional e não funcional: a chave para a localização da lesão. In: DEWEY, C. W. (Org) *Neurologia de cães e gatos*. Guia prático. São Paulo: Roca, 2006. cap. 1, p. 1-18.

DEZENGRINI, R.; WEIBEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus e pelo vírus da cinomose canina em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.1, 2007.

DIAS, M. B. M. C.; LIMA, E. R.; FUKAHORI, F. L. P.; SILVA, V. C. L.; RÊGO, M. S. A. Cinomose canina: revisão de literatura. *Medicina Veterinária*. v. 4, n. 6, p. 32-40, 2012.

DIAS-CATÃO, J. L. Biossegurança na manipulação de animais silvestres. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p.178-181, 2008.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.S.; LORUSSO, E. et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.136, n.1, p.171-176, 2006.

ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F.; LUCENTE, M. S.; CARUSO, M.; MARTELLA, V. et al. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiviral Research*, v.77, n.2, p.108-113, 2008.

ELIA, G.; CAMERO, M.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M. S.; LAROCCA, V.; MARTELLA, V. et al. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *Journal of Virological Methods*, v. 213, p.127-130, 2015.

ENCISO, N.; OSTRONOFF, L. L. K.; MEJÍAS, G.; LEÓN, L. G.; FERMÍN, M. L.; MERINO, E. et al. Stem cell factor supports migration in canine mesenchymal stem cells. *Veterinary Research Communications*, v.42, n.1, p.29-38, 2018.

EK-KOMMONEN, C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U.; NUOTIO, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record*, v. 141, n. 14, p. 380-383, 1997.

ESPINAL, M.A.; DÍAZ, F.J.; SAENZ-RUIZ, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Veterinary Microbiology*, v.172, p.168-176, 2014.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna: Moléstias do cão e do gato. 4 ed. São Paulo: Manole, 2005.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna: Moléstias do cão e do gato. 5 ed., v.2. São Paulo:Guanabara Koogan, 2008.

EZEIBE, M. C. O. Canine distemper in local dogs in Nsukka, Nigeria. *Veterinary Record*, v. 156, n. 26, p. 840-842, 2005.

FARIAS, E. A fisioterapia no controle da dor: revisão de literatura. Brasília, 2011. 46 p. Monografia (Graduação) Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, BR-DF, 2011.

FAIRLEY, R. A.; KNESEL, O.; PESAVENTO, P. A.; ELIAS, B. C. Post-vaccinal distemper encephalitis in two Border Collie cross littermates, *NZVJ*. v. 63, n.2, p. 117-120, 2015.

FAWI, M. T.; TAG EL DIN, M. H.; EL-SANOUSI, S. M. Canine distemper as a predisposing factor for *Nocardia asteroides* infection in the dog. *Veterinary Record*, v. 88, n. 13, p. 326-328, 1971.

FEITOSA, M. M.; FEITOSA, F. L. F.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P. R.; MOGAMI, S. R. K. Avaliação física, citológica, conteúdo de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do liquor de cães com encefalite por cinomose. *Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science*, v.34, n.3, p.147-151, 1997.

FELDMAN, B.F. Cerebrospinal fluid. In: KANEKO, J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. 4ed. San Diego: Academic, 1989. p.835-865.

FENNER, W. R. Doenças do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 104, p. 586-638.

FERNANDES, R.W. Determinação dos valores líquidos normais de glicose, proteína, globulina, uréia, creatina fosfoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidez e coagulabilidade em cães saudáveis. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.27, n.2, p.209-216, 1990

FISCHER, U. M.; HARTING, M. T.; JIMENEZ, F.; MONZON-POSADAS, W. O.; XUE, H.; SAVITZ, S. I.; LAINE, G. A.; COX, C. S. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem cell and development*, v. 18, n. 5, p. 883-691, 2008.

FLORES, E. F. Virologia veterinária. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. 888p.

FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcriptionPCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.11, p.3634-3643, 1999.

FRESE, L.; DIJKMAN, P. E.; HOERSTRUP, S. P. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemother* v.43. n.4, p.268–274, 2016

FRITSCH M. et al., Células-tronco: aspectos gerais. In: PASQUALOTTO, F. F. Células-tronco – Visão do especialista. Caxias do Sul: EDUCS, p. 19-82, 2007.

FU, Y.; KARBAAT, L.; WU, L.; LEIJTEN, J.; BOTH, S. K.; KARPERIEN, M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* v 23, n 6, p.515–528, 2017

GADE, N. E.; PRATHEESH, M. D.; NATH, A.; DUBEY, P. K.; SHARMA, G. T. Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Veterinary World*, v. 5, n. 8, p. 499-507, 2012.

GAMA, F. G. V.; NISHIMORI, C. T.; SOBREIRA, M. R.; SANTANA, A. E. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. *Ciência Rural*, v.35, n.3, 2005.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; OLIVEIRA, D. B.; BELONI, S. N. E.; ALFIERI, A. A. et al. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos da cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 4, p. 480-487, 2004.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.2, p.168-174, 2004b.

GELBERG, H. B. Alimentary System. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Pathologic basis of veterinary disease. 4ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 301-391.

GILLESPIE, J. H. The virus of canine distemper. Comparative Virology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 30, n. 101, p. 540-547, 1962.

GEMMA, T.; WATARI, T.; AKIYAMA, K.; MIYASHITA, N.; SHIN, Y-S.; IWATSUKI, K. et al. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 58, n. 6, p. 547-550, 1996.

GRABER, H. U.; MÜLLER, C. F.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica*, v. 90, n. 3, p. 312-318, 1995.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In: GREENE, C. E. (Org.) Infectious diseases of the dog and cat. 3ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. cap. 3, p. 25-41.

GREENE, C. E. Canine distemper: what's new in treatment and prevention. *Proceedings of the International SCIVAC Congress*, Rimini, p. 229-230, 2008.

GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. Canine Distemper. In: GREENE, C. E. Infectious Diseases of the dog and cat. 4ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p.25-41.

GRIOT, C.; VANDEVELDE, M.; SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper, a re-emerging morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. *Animal Health Research Reviews*, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2003.

GRIFFIN, J. F.; YOUNG, B. D.; LEVINE, J. M. Imaging diagnosis—chronic canine distemper meningoencephalitis. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.50, n.2, p.182-4, 2009.

GRÖNE A., ENGELHARDT P. e ZURBRIGGEN A. 2003. Canine distemper virus infection: proliferation on canine footpad keratinocytes. *Veterinary Pathology* v.40 p.574- 578,2003

GUERCIO, A. P.; DI MARCO, S.; CASELLA, V.; CANNELLA, L.; RUSSOTTO, G.; PURPARI, S. et al. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biology International*, v.36, p.189–194, 2012.

HAAS, L.; BARRETT, T. Rinderpest and other animal morbillivirus infections: comparative aspects and recent developments. *Journal of veterinary medicine*, v. 43, p.411-420, 1996.

GUERCIO, A.; DI BELLA, S.; CASELLA, S.; DI MARCO, P.; RUSSO, C.; PICCIONE, G. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int.* v. 37, n. 8, p.789–798, 2013.

HASS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D. et al. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany, *Virus Research*, v.48, p.165-171, 1997.

HARTLEY, W.J. A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Veterinary Pathology*, v.11, n.4, p.301-312, 1974.

HARTMANN, T. L. S.; BATISTA, H. B. C. R.; DEZEN, D.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e da parainfluenza em cães de canis dos municípios de Novo Hamburgo e Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n. 04, 2007.

HEADLEY, S. A.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; BRACARENSE, A. P.; ALFIERI, A. A.; SUMMERS, B. A. Molecular detection of canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.21, n.5, p.588-597, 2009.

HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Canine distemper virus infection with secondary Bordetella bronchiseptica pneumonia in dogs. *Ciência Rural*, v. 29, n. 4, p. 741-743, 1999.

HECKLER, M; PEREZ, F; VALERIANO, R; VERDUGO, M; WODEWOTZKY, T; MACHADO, V; DA CRUZ, F; MARTINS, R. Perineural mesenchymal stem cells inoculation on the sciatic nerve of a dog. In: Braziliam congress on stem cells and cell therapy.7, 2012, São Paulo. Abstracts, São Paulo, Brazil, 2012.

HIGGINS, R. J.; KRAKOWKA, S. G.; METZLER, A. E.; KOESTNER, A. Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. A sequential ultrastructural study. *Acta Neuropathologica*, v. 57, n. 4, p. 287-295, 1982.

HIGGINS, R.J.; CHIL, G.; VANDEVELDE, M. Chronic relapsing demyelinating encephalomyelitis associated with persistent spontaneous canine distemper virus infection. *Acta Neuropathology*, v.77, n.4, p.441-444, 1989.

HIRSH, Dwight C.; ZEE, Yuan Chung. Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HOFFMAN, A. M.; DOW, S. W. Concise review: stem cell trials using companion animal disease models. *Stem cells*. v.34, n.7.p.1709–1729, 2016.

HOSKINS, J. D. Doenças virais caninas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 1, p. 440-446

HU, N.; WU, H.; XUE, C.; GONG, Y.; WU, J.; XIAO, Z. et al. Long-term outcome of the repair of 50 mm long median nerve defects in rhesus monkeys with marrow mesenchymal stem cells-containing, chitosan-based tissue engineered nerve grafts. *Biomaterial*, v.34, p. 100-111, 2013.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 24 de agosto de 2017.

IMHOFF, H.; VON MESSLING, V.; HERRLER, G.; HAAS, L. Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *Journal of Virology*, v. 81, n. 8, p.4158-4165, 2007.

INNES, J. R. M.; SAUNDERS, L. Z. Viral and rickettsial encephalomyelitides. In: INNES, J. R.M.; SAUNDERS, L. Z. Comparative neuropathology. New York: Academic Press, 1962. cap. 8, p. 337-450.

JARROCHA, D; MILCZAREK, O; WEDRYCHOWICZ, A; KWIATKOWSKI,S; MAIKA,M. Continuous Improvement After Multiple Mesenchymal Stem Cell Transplantations in a Patient With Complete Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*. V. 24, p. 661–672, 2015

JOZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Veterinary Research Communication*, v. 29, p. 347–359, 2005

JUNG, D. I.; HA, J.; KANG, B.T.; KIM, J.W.; QUAN, F.S.; LEE, J.H.; WOO, E.J.; PARK, H.M. A Comparison of Autologous and Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Canine Spinal Cord Injury. *Journal of the Neurologic Sciences*, v. 285, n1-2, p.67-77, 2009

KAPIL, S.; ALLISON, R. W.; JOHNSTON, L.; MURRAY, B. L.; HOLLAND, S; MEINKOTH, J. et al. Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 4, p. 707-712, 2008.

Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. v. 4, n.3, p. 206-16, 2009

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, n. 1–2, p. 1-9, 2013.

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

KIM, D.; JEOUNG, S.Y.; AHN, S.J.; LEE, J. H.; PAK, S, I.; KWON, H. M. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.68, n. 8, p. 877-879, 2006.

KOESTNER, A. Animal model of human disease: Subacute esclerosing panencephalitis, multiple sclerosis. *The American Journal of Pathology*, v. 78, n. 2, p. 361-364, 1975.

KOSSAK-ROMANACH, A. Homeopatia em 1000 conceitos. 3 ed, São Paulo: Elcid, 2003, 639p.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; BAUMGAERTNER, W.; LEKKAS, S.; KONTOS, V. Relation of Clinical Signs to Pathological Changes in 19 Cases of Canine Distemper Encephalomyelitis. *Journal of Comparative Pathology*, v.126, p. 47-56, 2002.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *Journal of Infections Diseases*, v.134, n.6, p.629-632, 1976.

KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.J.; KOESTNER, A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Americam Journal of Veterinary Research*, v.41, p.284-292, 1980.

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

KRAKOWKA, S., RINGLER, S. S., LEWIS, M.; OLSEN, R. G.; AXTHELM, M. K. Immunossuppression by canine distemper virus: modulation of *in vitro* immunoglobulin synthesis, interleukin release and prostaglandin E₂ production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 15, p. 181-201, 1987b.

KRAKOWKA, S. Canine virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v.21, p.75-80, 1989.

KUIKEN, T.; KENNEDY, S.; BARRETT, T.; VANDEBILDT, M. W.; BORGSTEEDE, F. H.; BREW, S. D. et al., The 2000 canine distemper epidermic in Caspian seals (*Phoca caspica*): pathology and analysis of contributory factors. *Veterinary Pathology*, v. 43, p. 321-338, 2006.

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

LAMB R.A.; PARKS G.D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 41, p. 1449-1485.

LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; INOMATA, A.; FURUYA, Y.; UCHIDA, K.; SUGANO, S.; TATEYAMA, S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 115, p. 32-42, 2006

LAPPIN, R.M. Doenças virais polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p.1235-1237.

LAPPIN M. R. Doenças infecciosas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 1193-1284.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R. B. Development of recombinant nucleocapsid proteinbased IgM-ELISA for the early detection of distemper infections in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 119, p. 278-286, 2007.

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

LEMON, K.; DE VRIES, R. D.; MESMAN, A. W.; MCQUAID, S.; VAN AMERONGEN, G.; YÜKSEL, S. et al. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 1, 2011.

LEMP, C.; SPITZBARTH, I.; PUFF, C.; CANA, A.; KEGLER, K.; TECHANGAMSUWAN, S. et al. New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. *Viruses* v. 6, p.2571-2601; 2014.

LEVINE, D.; MILLIS, D. L.; MARCELLIN LITTLE, D. Introdução a reabilitação física em veterinária. In: LEVINE, D. Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2008. cap.1, p. 1-8.

LI, J.; CHEN, L.; CHEN, Q.; HU, D.; LIN, J. Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilizing bone marrow mesenchymal stem cells homing to injury sites in spinal cord injury of rats. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, v.33, n.1, p.93-100, 2019.

LIANG, C.T.; CHUEH, L.L.; PANG, V.F.; ZHUO, Y. X.; LIANG, S. C.; YU, C. K. et al. A non-biotin polymerized horseradishperoxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. *Journal of Comparative Pathology*, v. 136, p. 57-64, 2007.

LIANG, J.; ZHANG, H.; HUA, B.; WANG, H.; WANG, J.; HAN, Z. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, v. 15, n. 5, p. 644-646, 2009.

LIM, JI-HEY; BYEON, YE-EUN; RYU, HAK-HYUN; JEONG, YUN-HYEOK; LEE, YOUNG-WON; KIM, WAN HEE; KANG, KYUNG-SUN; KWEON, OHKYEONG. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dog. *Journal of Veterinary. Science*. v. 8, n. 3, p275-282, 2007.

LITFALLA, F.; HAMZÉ, A. L.; PACHECO, A. M.; SOUZA, C. C.; RODRIGUES, C. A. L. S. et al. Cinomose e o processo de desmielinização. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 11, 2008.

LOPES JÚNIOR, C. G. Avaliação do perfil hematológico, bioquímico e eletroforese das proteínas séricas de cães com cinomose atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

LÓPEZ, A. Respiratory System. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p.463-542.

LORENZ, M. D.; KORNEGAY, J. N. Neurologia veterinária. 4. ed. São Paulo: Manole, 2006. 467p.

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; SOUZA, M.S.; MACHADO, A.A.; MIGLIOLO, D.S.; MORAES, O.C. et al. Zymographic Patterns of MMP-2 and MMP-9 in the CSF and Cerebellum of Dogs with Subacute Distemper Leukoencephalitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.154, p. 68–74, 2013

McCANDLISH, I. A.P. Infecções específicas caninas. In: DUNN, J. K. Tratado de medicina de pequenos animais. São Paulo: Editora Roca, 2001. p. 915-952.

MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; TAFFAREL, M. O.; MORAES, C. N.; MACHADO, G. F.; MELO, G. D. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 63, 2015.

MANGIA, S. H.; PAES, A. C. Neuropatologia da cinomose. *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, n. 3, p. 427- 427, 2008.

MANGIA, S.H. Avaliação do tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase Neurológica com ribavirina, prednisona e DMSO através da RT-PCR. 253f. (Tese Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP. 2011.

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.

MANUAL Merck de Veterinária. Cinomose Canina. 9 ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 528-529.

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

MARX C, SILVEIRA MD, BEYER NARDI N (2015) Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev* 24(7):803–813

MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M. et al. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology*, v.116, p.301–309, 2006.

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.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZOO, L.; LACOPETTI, I.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F. et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v.16, p.771-81, 2010.

MARTINS, B. C. Características da cinomose canina em cães naturalmente infectados em Belo Horizonte (2012-2014): aspectos clínico-neurológicos e sua correlação com a carga viral e apoptose no encéfalo. 2016. 91p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS, D. B.; LOPES, S. T. D. A.; FRANÇA, R. T. Cinomose canina: Revisão de literatura. *Acta Veterinária Brasilica*, v.3, n.2, p.68-76, 2009.

McGRATH, J. D. Inflammatory and infectious diseases. In: McGRATH, J. D. The neurologic examination of the dog with clinic-pathological observations. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1960. cap. 12, p. 123-147.

MEIRELLES, L., CHAGASTELLES, P., NARDI, N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, n. 119, p. 2204-2213, 2006.

MELLO, F. C.; AMARAL, G. A. C.; RODRIGUES, C. F. M.; PINTO, E. A. T.; Lot, R. F. E. Aspectos clinicopatológicos da cinomose em cães. *Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária*, v.6, n.10, 2008.

MENDEZ-OTERO, R.; VALLE, C. Z.; GUBERT, F.; FREITAS, G. R.; SANTIAGO, M. F. Terapias celulares em neurologia. In: MORALES, M. M. (Org.). Terapias Avançadas - Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde. São Paulo: Atheneu, 2007, p. 55-71.

MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, Y.; ISHIGURO, S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.2936–2942, 1999.

MONTEIRO, M.V.B.; SANTOS, M.P.; COSTA, C.T.C.; WHITEMAN, C.W.; MONTEIRO, F.O.B. Cinomose canina nos animais domésticos e silvestres. *Revista de Ciências Agrárias*, v.53, n.2, p. 216-223, 2010

MONTEIRO, B. A. Efeitos da terapia com células tronco mesenquimais em afecções do sistema nervoso de cães. 2017 Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

MONTI, F. S.; VIANA, J. A.; BEVILACQUA, P. D.; MORAES, M. P.; SALCEDO, J. H. P. Anticorpos contra o vírus da cinomose de cães vacinados em diferentes estabelecimentos. *Revista Ceres*, v.54, n. 311, p. 14-19, 2007.

MORETTI, L. D.; RIBEIRO, M. G.; AGUIAR, D. M.; SILVA, A. V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.

MORETTI, L.D.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and *Ehrlichiosis rickettsia*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n. 6, p. 359-363, 2006.

MUTINELLI, F.; VANDEVELDE, M.; GRIOT, C.; RICHARD, A. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathologica*, v. 77, n. 3, p. 333-335, 1988.

Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003) Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(12):3464–3474

MCCARTHY, A. J.; SHAW, M. A.; GOODMAN, S. J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 274, p. 3165–3174, 2007.

McVEY, D. S.; KENNEDY, M. Vaccines for emerging and re-emerging viral diseases of companion animals. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v. 38, n. 4, p. 903-917, 2008.

NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genética na Escola*, v. 2, n. 2, p. 25-29, 2007.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; GODOY, A. V. Quantificação de células CD34+ do sangue do cordão umbilical de cães. *Ciência Rural*, v. 39, n. 2, p. 434-441, 2009.

NARAZAKI, D. J.; CRISTANTE, A. F. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 46, n. 4, p.359-67, 2011.

NEGRÃO, F. J.; WOSIACKI, S. H.; AÇFERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 6, p. 1099-1166, 2006.

NEGRÃO, F.J.; AMUDE, A.M.; BARRY, A.F.. et al.; Naturally occurring canine distemper: different clinical outcomes in dogs infected by the same wild-type CDV strain. *Virus Review and Research*, vol.12, p.114, 2007a.

NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.59, n.1, p.253-257, 2007.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 1128p.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 2464p.

NESSELER, A.; BAUMGÄRTNER, W.; GAEDKE, K.; ZURBRIGGEN, A.; ORVELL, C. Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body polioencephalitis. *Journal of Comparative Pathology*, v.116, n.3, p. 291-301, 1997.

NERY, A. A.; NASCIMENTO, I. C.; GLASER, T.; BOSSANEZE, V.; KRIEGER, J. E.; ULRICH, H. Human mesenchymal stem cells. From immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Internacional Society for advancement of cytometry*, v.83, p. 48-61, 2013.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. v.14, n.6. p.1007–1015, 2008.

NICOLLE, C. La maladie du jeune age des chiens est transmissible expérimentalement a l'homme sous forme inapparent. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, v. 20, p.312-323, 1931.

NORRIS, J. M.; KROCKENBERGER, M. B.; BAIRD, A. A.; KNUDSEN, G. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. *Australian Veterinary Journal*, v. 84, n. 10, 2006.

O'BRIEN, D. P.; COATS, J. R. Brain disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds) *Veterinary internal medicine*. 7ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2010, p. 668-725.

O'BRIEN, D. P. Lead toxicity in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 29, p. 845-847, 1981.

OLBY, N.; HALLING, K. B.; GLICK, T. R. Reabilitação neurológica. In: LEVINE, D. *Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2008. Cap.7, p. 157-171.

OLIVEIRA, A. C. Considerações constitucionais sobre a pesquisa terapêutica das células-tronco. *Revista de Direito Privado*, n. 30, p. 74-90, 2007.

OLIVEIRA G. K. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão (Dissertação) Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2008.

OLIVEIRA, A. C.; ANTONIO, N. S.; ZAPPA, V. Cinomose Canina – Relato de Caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. v.7, n. 12, 2009.

OLIVEIRA, L. H.; OLIVEIRA, F. *Guia de Saúde do Pet*. São Paulo: Ed. Abril, 2010.

OMORI, Y.; HONMOU, O.; HARADA, K.; SUZUKI, J.; HOUKIN, K.; KOCSIS, J.D. Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cell after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Research*, v.1236, p. 30-8, 2008.

ORSINI, H.; BONDAN, E.F.; SANCHEZ, M.; LALLO, M. A.; MAIORKA, P. C.; DAGLI, M. L. Z. et al. Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. *Arquivo de Neuropsiquiatria*, v.65, p. 1070-1077, 2007.

ORSINI, H.; BONDAN, E. F. Patogenia das lesões no sistema nervoso central (SNC) na cinomose canina. *Clínica Veterinária*, n. 74, p. 28-34, 2008.

PANZERA, Y.; CALDERÓN, M.G.; SARUTE, N.; GUASCO, S.; CARDEILLAC, A.; BONILLA, B. et al. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research*, v.163, p.401–404, 2012.

PARDO, I. D. R.; JOHNSON, G. C.; KLEIBOEKER, S. B. Phylogenetic characterization of canine distemper virus detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 10, p. 5009-5017, 2005.
PENDERIS, J. Spinal cord injury in the dog: features of neurological examination affecting prognosis. In: *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress*, Dublin, Ireland, 2008.

PARR, A.M.; TATOR, C.H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow transplant.*, v. 40, p.609-619, 2007.

PAUL G, ANISIMOV SV. The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. *Biochimie* v.95, n.12. p.2246-56, 2013

PÉREZ, B. F. Viabilidade e Segurança do Transplante Intratecal de Células-Tronco Mesenquimais Autólogas e Alogênicas Provenientes da Medula Óssea de Cães (*lupus canis familiaris*) Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013.

PEREIRA, I. S. O.; PONTES, P.; EÇA, L. P.; FERREIRA, A. T.; MAZZETTI, P. M. V.; SILVA, L.; SOUZA, F. C. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. *Acta ORL*, v. 26, n. 3, p. 11-16, 2008.

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

PINHEIRO, A.O.; CARDOSO, M.T.; VIDANE, A.S.; CASALS, J.B.; PASSARELLI, D.; ALENCAR, A.L.F. et al. 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.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells*, v.25, n.11, p.2896-2902, 2007.

REID, J.; NOLAN, A. M.; HUGHES, J. M. L.; LASCELLES, D.; PAWSON, P.; SCOTT, E. M. Development of the short-form Glasgow Composite Measure Pain Scale (CMPS-SF) and derivation of an analgesic intervention score. *Anim Welf.* v.16, p:97–104, 2007.

PLATT, S.R., OLBY, N.J. Neurological emergencies. In: Platt SR, Olby NJ (eds), BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology 3ed. *British Small Animal Veterinary Association*, 2004.

PLATT, S.; GAROSI, L. Small Animal Neurological Emergencies. London: Manson Publishing, 2012. 672p.

PRATELLI, A. Canine distemper virus: The emergence of new variants. *The Veterinary Journal*, v.187, p.290-291, 2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; LEONARD, F. C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 375-376.

QUINN, P. J. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2ed. Wiley-Blackwell, 2011. 2498p

QUINTANILHA, L. F.; TAKAMI, T.; HIROSE, Y.; FUJISAWA, K.; MURATA, Y.; YAMAMOTO, N. et al. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatol Res.* v.44, n.10, p.E206–E21, 2014.

RIORDAN, N. H; ICHIM, T. E.; MIN, W. P.; WANG, H; SOLANO, F., et al.; Nonexpanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, v. 7, p. 29, 2009.

RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L. Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990–1996 in Finland. *Science Direct*, v. 25, p.7994-7998, 2007.

RODRIGUEZ-TOVAR, L. E. R.; RAMÍREZ-ROMERO, R.; VALDEZ-NAVA, Y.; NEVARÉZ-GARZA, A. M.; ZÁRATE-RAMOS, J. J.; LÓPEZ, A. Combined distemper adenoviral pneumonia in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 48, p. 632-634, 2007.

REICH, C. M.; RAABE, O.; WENISCH, S.; BRIDGER, P.; KRAMER, M.; ARNHOLD, S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells—a comparative study. *Vet Res Commun.* v.36, n.2, p.139–148, 2012.

ROISEN, F.J.; KLUEBER, K.M.; LU, C.L.; HATCHER, L.M.; DOZIER, A.; SHIELDS, C.B.; MAGUIRE, S. Adult human olfactory stem cells. *Brain Research*, v.890, n.1, p.11-22, 2001.

RUDD, P. A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Journal of Virology*, v. 80, n. 19, p. 9361-9370, 2006.

RYU, HAK-HYUN; LIM, JI-HEY; YE-EUN BYEON; JEONG-RAN PARK; MINSOO SEO; YOUNG-WON LEE; WAN HEE KIM; KYUNG-SUN KANG; OHKYEONG KWEON. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J. Vet. Sci.*, v. 10, n. 4, p.273-284, 2009.

SAHMEDDINI, M. A.; Traditional Theory. In: Acupuncture – concepts and physiology. Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 2011.

SANTOS, B. M. Cinomose canina – revisão de literatura. 2006. 18 f. Monografia (Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais) Universidade Castelo Branco. Goiânia, 2006.

SÁNCHEZ, C. M., BLÁZQUEZ, J. R.T. Homeopatia Veterinária. Matéria Médica, Casos Clínicos e comentários. Madrid: Dilema Editora, 2006. p. 9-33, 2006.

SATTI, H. S.; WAHEED, A.; AHMED, P.; AHMED, K.; AKRAM, Z.; AZIZ, T. et al. Autologous mesenchymal stromal cell transplantation for spinal cord injury: A Phase I pilot study. *Cytotherapy*, v. 18, n. 4, p. 518-522, 2016.

SCHERMA, M. R. Reabilitação através da acupuntura em cães acometidos por cinomose. 35f. Monografia (Especialização *Lato sensu* Curso de Clínica Médica em Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco Instituto de Pós-Graduação Quallitas, 2009.

SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A.; DOHERR, M. G.; WEISSENBOCK, H.; VANDEVELDE, M.; LASSMANN, H. et al. Demyelination precedes oligodendrocytes loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathologica*, v. 103, n. 1, p. 11-19, 2002.

SCREVEN, R.; KENYON, E.; MYERS, M. J.; YANCY, H. F.; SKASKO, M.; BOXER, L. et al. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.161, p.21–31, 2014.

SEEHUSEN, F.; ORLANDO, E.A.; WEWETZER, K.; BAUMGÄRTNER, W. Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelination lesion? *Acta Neuropathologica*, v. 114, p. 597-608, 2007.

SHI, M.; LI, J.; LIAO, L.; CHEN, B.; LI, B.; CHEN, L. et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/ SCID mice. *Haematologica*, v.92, n.7, p.897–904, 2007.

SHIN, Y.J.; CHO, K.O.; CHO, H.S.; KANG, S. K.; KIM, H. J.; KIM, Y. H. et al. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for detection of canine distemper virus in clinical samples. *Australian veterinary journal*, v.82, n.1, p.83-86, 2004.

SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

SILVA, I.N.G.; GUEDES, M.I.F.; ROCHA, M.F.G.; OLIVEIRA, L. C.; MOREIRA, O. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.1, p.136-139, 2005.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F. et al.; Aspectos clinicopatológico de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n.5, p. 215 – 220, 2007.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; MAZZANTI, A.; BRUM, J.S.; PIEREZAN, F.; BARROS, C.S.L. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, p. 643-652, 2009.

SILVA, M. C. Neuropatologia da cinomose canina. 116p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SILVA, C. C. F. Acupuntura no tratamento da cinomose nervosa. 40f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS, 2011.

SILVA A.P. et al.; Aspectos moleculares do vírus da cinomose canina e seus impactos na epidemiologia da infecção na América do sul. *Revista CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v. 21, n. 66, p.72-77, 2015.

SIPS, G.F.; CHESIK, D.; GLASENBURG, L.; WILSCHUT, J.; DE KEYSER, J.; WILCZAK, N. Involvement of demyelinating disease. *Reviews in Medical Virology*, v.17, p.223-244, 2007.

SONNE, L. Achados patológicos e imunoistoquímicos de cães infectados pelo vírus da cinomose canina. 2008. 60f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E. C.; PESCADOR, C. A.; SANTOS, A. S.; PAVARINI, S. P.; CARISSIMI, A. S. et al. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 2, p.143-149, 2009.

SORJONEM, D.C. Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders. *American Journal of Veterinary Research*, v.48, n.2, p.301-305, 1987.

SORRELLS, S.F.; SAPOLSKY, R.M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS, *Brain Behavior Immunity*, v.21, n.3, p.259-272, 2007.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. G. Canine distemper encephalomyelitis :variation with virus strain. *Journal of Comparative Pathology*, v. 94, n. 1, p. 65-75, 1984.

SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. G. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 20, n. 6, p. 525-534, 1994.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; De LAHUNTA, A. Veterinary Neuropathology. St. Louis: Mosby, 1995. 527 p.

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

SCHODER, D.; BENETKA, V.; SOMMERFELD-STUR, I.; KOPF, N.; WEISSENBACHER, E.; PALLAN, C. et al. A study of the immune status of dogs in Lower Austria and Vienna, Austria, vaccinated against canine distemper virus and canine parvovirus-2 followed varying vaccination intervals. *European Journal of Companion Animal Practice*, v. 17, n. 2, p. 176-182, 2007.

SCOGNAMILLO-SZABO, M. V. R.; BECHARA, G. H. Acupuntura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em Medicina Veterinária. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p.491-500, 2010.

SHEN, J.; DUAN, X. H.; CHENG, L. N.; ZHONG, X. M.; GUO, R. M.; ZHANG, F. et al. *In vivo* MR imaging tracking of transplanted mesenchymal stem cells in a rabbit model of acute peripheral nerve traction injury. *Journal of magnetic resonance imaging*, v. 32, p.1076-1085, 2010.

SHERDING, R. G. Cinomse canina. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Sanders-Clínica de pequenos animais. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 2048.

SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheal blood mononuclear cells by RTPCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.57, n.3, p.439-445, 1995.

STEISS, J. E.; LEVINE, D. Modalidades de agentes físicos. In: LEVINE, D. Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2008. cap. 4, p. 75-94.

STERN, L. B.; GREENBERG, M.; GERSHONI, J. M.; ROZENBLATT, S. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *Journal of Virology*, v.69, n. 3, p. 1661-1668, mar. 1995.

STEWART, M. C. Cell-based Therapies: Current Issues and Future Directions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 27, n. 2, p. 393-399, 2011.

TILLEY, L.P.; SMITH, F.W.K. Consulta Veterinária em 5 Minutos – Espécie Canina e Felina. São Paulo, Editora Manole, 2008, 3. ed., p.224-225.

TIPOLD A., VANDEVELDE M.; JAGGY A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal Small Animal Practice*, n.33, p.466-470, 1992.

TIPOLD, A. Cerebrospinal fluid. In: VITE, C.H.; BRAUND, K.G. Braund's clinical neurology in small animals: localization, diagnosis and treatment. Ithaca NY: International Veterinary Information Service, 2003.

TRINDADE, A.B.; VELASQUE, A.; SILVA, P. G.; CIRNE-LIMA, E. O.; CORTESINI, E. A. Células-tronco e sua utilização na regeneração de nervo periférico –revisão. *Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v. 10, n. 35, p. 1-637, 2013.

THOMAS, W.B.; SORJONEN, D. C.; STEISS, J. E. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.29, p.129-33, 1993.

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.

VANDEVELDE, M.; SPANO, J.S. Cerebrospinal fluid cytology in canine neurologic disease. *American Journal of Veterinary Research*, v.38, n.11, p.1827-1832, 1977.

VANDEVELDE, M.; FANKHAUSER, R.; KRISTENSEN, F.; KRISTENSEN, B. Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta Neuropathologica*, v. 54, n. 1, p.31-41, 1981.

VANDEVELDE, M.; KRISTENSEN, F.; KRISTENSEN, B.; STECK, A. J.; KIHLM, U. Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus. *Acta Neuropathologica*, v. 56, n. 1, p. 1-8, 1982.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; HIGGINS, R. J.; PALMER, D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathologica*, v.67, p.211–218, 1985.

VANDELVELDE, M.; ZURBRIGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology*, v.44, n.2-4, p.271-280, 1995.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.

VIDAL M.A., KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery*, v.36, 613–22, 2007.

VIEIRA, N. M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B. E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*, v.19, p.279–289, 2010

VILLANOVA, M.; BACH, J. R. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy Outcomes for Three Patients with Spinal Muscular Atrophy Type 1. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, v. 94, n. 5, p. 410-415, 2015.

VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *Journal of Virology*, v.80, p.6084-6092, 2006.

XIE, H.; PREAST, V. Acupuntura veterinária Xie. São Paulo: MedVet, 2011.

WANG, Y.; ZHAO, Z.; REN, Z.; ZHAO, B.; ZHANG, L.; CHEN, J. et al. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Letters*, v. 514, p. 96-101, 2012.

WENZLOW, N.; PLATTET, P.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A.; GRÖNE, A. Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. *Veterinary Pathology*, v.44, p.943-948, 2007.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology, 6ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2010. 1232p.

Wang W, Cao W (2014) Treatment of osteoarthritis with mesenchymal stem cells. *Sci China Life Sci* 57(6):586–595

WILD, T. F.; NANICHE D.; RABOURDIN-COMBE, C.; GERLIER, D.; MALVOSIN, E.; LECOUTURIER, V.; BUCKLAND, R. Mode of entry of morbillivirus. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 267-270, 1995.

WOMA, T.Y.; VAN VUUREN, M.; BOSMAN, A.M.; QUAN, M.; OOSTHUIZEN, M. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Veterinary Microbiology*, v.143, p.126–132, 2010.

WU, J. Z.; LARSON, G.; WALKER, H.; SHIM, J. H.; HONG, Z. Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-Nucleotidase II: implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, n. 49, p. 2164-2171, 2005.

YOUSSEF, S.; STÜVE, O.; PATARROYO, J.C.; RUIZ, P. J.; RADOSEVICH, J. L.; HUR, E. M. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*, v.420, n.6911, p.78-84, 2002.

YARAK, S; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

YU, X. L.; CHENG, Y. M.; SHI, B. S.; QIAN, F. X.; WANG, F. B.; LIU, X. N. et al. Measles virus infection in adults induces production of IL-10 and is associated with increased CD4⁺ CD25⁺regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, v.181, p.7356–7366, 2008.

ZAMPROGNO H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da união de fraturas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, n. 2, p. 289-290, 2007.

ZANINI, M. S.; SILVA, S. C. Material didático: Doenças virais. Departamento de Zootecnia e Engenharia Rural. Universidade Federal do Espírito Santo, Cinomose. Espírito Santo: 2006.

ZEE, Y. C.; MacLACHLAN, N. J. Paramyxoviridae, Filoviridae, and Bornaviridae. In: HIRSH, D. C.; MacLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. *Veterinary microbiology*. 2nd ed. Iowa: Blackwell, 2004. cap. 60, p. 369-376.

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

ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M. Canine distemper virus-induced glial cell changes in vitro. *Acta Neuropathologica*, v. 62, n. 1-2, p. 51-58, 1983.

ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; DUMAS, M. Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro. *Laboratory Investigation*, v. 54, n. 4, p. 424-431, 1986.

ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; DUMAS, M.; GRIOT, C.; BOLLO, E. Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro. *Acta Neuropathologica*, v. 74, n. 3, p. 366-373, 1987.

ZURBRIGGEN, A.; SCHMID; I.; GRABER, H. U.; VANDEVELDE, M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathologica*, New York, v. 95, n. 1, p. 71-77, Dec. 1998.

ZURBRIGGEN, A.; YAMAWAKI, M.; VANDEVELDE, M. Restricted canine distemper virus infection on oligodendrocytes. *Laboratory Investigation*, v. 68, n. 3, p. 277-284, 1993.

ZUBRIGGEN, A.; GRABER, H.U.; WAGNER, A.; VANDEVELDE, M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with non-cytolytic selective virus spread. *Journal of Virology*, v.69, n.3, p.1678-1686, 1995.

9 TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo preparado para ser submetido para publicação na revista Cell
Transplantation Journal

<https://journals.sagepub.com/home/cll>

1 Title: Effects of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Therapy in Dogs
2 Naturally Infected with Canine Distemper Virus

3

4 Running Head: ASCs therapy effect on infeccious encephalomyelitis in dogs

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **Title:** Effects of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Therapy in Dogs
2 Naturally Infected with Canine Distemper Virus

3 **Abstract**

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

31
32 **Key Words:** Stem Cell, Morbillivirus, central nervous system, treatment

33
34
35
36
37
38
39

1 INTRODUCTION

2 Distemper is an infectious disease caused by the canine distemper virus
3 (CDV), a *Morbillivirus* of the Paramyxoviridae family, highly contagious^{1,2}. Dogs
4 infected with VCV may manifest a combination of severe systemic and
5 neurological conditions³. After hematogenous and cerebrospinal fluid (CSF)
6 infection, the neurological lesions are demyelinating and inflammatory lesions in
7 the central nervous system (CNS), by viral replication into oligodendrocytes and
8 microglia cells and infiltration of inflammatory cells⁴⁻⁷.

9 The immune system appears to stimulate the disease progression and the
10 demyelinating lesions, this can aggravate and accelerate the destruction of
11 myelin in the disease advanced stages⁸⁻¹⁰. The neurological manifestations
12 depend on the CNS region affected¹¹⁻¹³. There are several syndromes described,
13 as well as the encephalitis of elderly dogs, the chronic relapsing encephalitis and
14 the post-vaccinal encephalitis with an unfavorable prognosis¹.

15 One treatment option is stem cell therapy^{14,15}. This therapy was used in the
16 treatment of human multiple sclerosis, neurodegenerative autoimmune disease,
17 with sequelae similar to that of canine distemper¹⁶. Mesenchymal stem cells
18 (MSCs) have generated great interest in the field of regenerative medicine
19 because of their biological properties^{17,18}. MSCs are undifferentiated, self-
20 renewing adult cells with high proliferation capacity, resulting in differentiated and
21 functional cells¹⁹. MSCs have been described primarily derived from bone
22 marrow (BMMSCs) but, in recent years, MSCs derived from adipose tissue have
23 also been extensively studied, since they can be easily obtained in culture with
24 high proliferation rate²⁰. Among the main mechanisms of action are the secretion
25 of soluble factors that stimulate the migration, mitosis and differentiation of local

1 stem cells, besides the stimulation of angiogenesis and immunomodulation of the
2 microenvironment, favoring tissue regeneration and repair^{21,22}. Although
3 controversial, MSCs have the potential to differentiate into several cell lines that
4 can originate muscle, neuronal and hepatocyte cells²³. The International Society
5 of Cell Therapy (SITC) defined criteria for the characterization of human MSCs.
6 Among the criteria included adherence to plastic in cell culture and express or
7 not specific cluster designation (CD) surface markers, besides the in vitro
8 demonstration for chondrogenic, adipogenic and osteogenic differentiation²⁴.
9 In domestic animals as well as humans, injuries to the nervous system are
10 disabling and because of the limited regenerative capacity of the neural system,
11 MSCs have been studied in some diseases of the central nervous system²⁵
12 Based on experimental evidence from its preclinical models, Uccelli et al. (2011)²⁶
13 suggest that MSCs represent a promising approach in repair and neural
14 protection. It has been shown that adult MSCs have the ability to migrate to
15 damaged areas, such as hypoxia, apoptotic or inflamed areas²⁷. The attenuation
16 of the clinical neurological signs of several diseases is due to the fact that MSCs
17 are immunomodulatory being trophic for vascular epithelial growth factor (VEGF)
18 because it stimulates angiogenesis, prevents the release of proinflammatory
19 cytokines and allows the tissue regeneration. Other therapeutic mechanisms are
20 based on their paracrine, neuro/axonioprotective, genetic manipulation and
21 apoptosis modulation²⁸⁻³⁰.

22 The potential of MSCs to improve nerve regeneration with morphological
23 and functional recovery after CNS and peripheral lesions has been evidenced in
24 several species, such as rodents^{31,32}, non-human primates³³, swine³⁴, humans³⁵,
25 however, studies are needed to clarify the therapeutic effect in dogs.

1 It is believed that most of the cells administered via the IV pathway are
2 retained in the lungs, lymph nodes and other tissues, reducing the number of
3 cells available to the CNS²⁵. In this way, the intrachial pathway is a promising
4 alternative and has shown to be effective and safe for the application of
5 autologous MSCs³⁷⁻³⁹, and allogeneic^{40,41}
6 The aim of this study was evaluate the efficacy of intrathecal ASCs
7 transplantation to improve neurological signs due encephalomyelitis caused by
8 canine distemper virus.

9

10 **MATERIALS AND METHODS**

11 ***Animals and Ethic***

12 Ten adults, mixed breed dogs, from both genders were selected according
13 to the inclusion criteria of the study and submitted to intrathecal transplantation
14 with mesenchymal stromal cells.

15 The procedures were approved by the Comissão de Ética no Uso de
16 Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
17 Estadual Paulista – UNESP – Botucatu/SP, process nº 0232/2017.

18 ***Inclusion Criteria***

19 Dogs should be positive for distemper by qPCR test in urine, clinical
20 neurological signs and history of unsatisfactory immunization. The dogs were
21 selected (zero moment) and scored according to the degree of clinical
22 neurological dysfunction; magnetic resonance imaging and CSF analysis were
23 taken in two moments: (M1) day of transplantation; (M2) 30 days after
24 transplantation.

25

1 ***Harvest and isolation of MSCs***

2 The mesenchymal stromal cells from adipose tissue (ASCs)'s bank were
3 donated by Advanced Reproduction Laboratory and Stem Cell Therapy, the cells
4 were previously isolated, cultured and characterized. The protocols performed by
5 the laboratory are described below.

6 Adipose tissue was collected from the abdominal region of healthy dogs
7 that underwent elective ovary-hysterectomy surgery at the surgical center
8 Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/UNESP – Botucatu, negative
9 qPCR for Adenovírus tipo 1, *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp.,
10 *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii* e Morbilivírus.

11 The adipose tissue was dissected into small fragments (1-2 mm³),
12 washed with HBSS and digested with 0.04% type 1 collagenase (Sigma-Aldrich,
13 Saint Louis, USA) and maintained in a water bath at 37 °C and shaken every 10
14 minutes. Subsequently, the enzyme was neutralized using the culture medium
15 containing 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose, 10%
16 fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin / streptomycin (10,000 U / mL; Invitrogen,
17 São Paulo, Brazil), 0.005% amikacin (250 mg / mL; Novafarma, Anápolis, Brazil)
18 and 1.2% amphotericin B (3 µg / mL). The material was then filtered with a 70 µm
19 filter, centrifuged at 340 g for 10 minutes, the supernatant aspirated and added
20 with the culture medium and homogenized for subsequent centrifugation. The
21 supernatant was again removed and culture medium was added. Cells were
22 counted in the Neubauer chamber by the trypan blue exclusion technique
23 (Invitrogen, São Paulo, Brazil).

24

25

1 ***Differentiations and Immunophenotyping of MSCs***

2 The differentiation induction of the culture cells *in vitro* in adipogenic,
3 chondrogenic and osteogenic lines was necessary to confirm the mesenchymal
4 lineage. Therefore, in the second passage, the samples were trypsinized and
5 conditioned in 24-well plates for osteogenic and adipogenic differentiation.
6 Further, it was used the Stempro Adipogenesis® and Stempro Osteogenesis®
7 differentiation sets (Invitrogen, São Paulo, Brazil), following the manufacturer's
8 recommendations.

9 The MSCs-TA samples were immunophenotyped using the FACS Calibur
10 flow cytometer (Becton Dickinson Company, San Jose, USA) for evaluation of
11 the expression of CD34 surface marker (CD34-FITC anti-human mouse, Becton
12 Dickinson Company, (Mouse anti-mouse CD45, Abd-Serotec, Raileigh, USA),
13 CD44 (mouse anti-mouse CD44, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), CD90
14 (Becton Dickinson Company, San Jose, USA) and CD105 (mouse anti-human
15 CD105, Abcam, Cambridge, USA).

16 ***Clinical Evaluation***

17 Anamnesis, physical exam and, additionally, lacrimal production were
18 evaluated by the Schirmer's Lacrimal Test (TLS; Schirmer's Tear Test,
19 Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda) before (M0) and after
20 intrathecal transplantation of MSCs (M2).

21 ***Neurological Exam***

22 Neurological evaluation it was performed before (M0) and after intrathecal
23 transplantation of MSCs (M2). The parameters evaluated were the mental state,
24 behavior, posture and coordination of the head and trunk, cranial nerves, gait,
25 postural reactions, proprioception, spinal reflexes, nociception and epaxial

palpation. To record the findings the neurodeficiency scale were used to follow-up the clinical picture. The patient's classification was according to their clinical presentation in mild, moderate and severe, in which the first had mild and moderate dysfunction of their normal functions and the last one with severe dysfunction, with loss of normal functions. The score varies from 0 to 4 according to the severity of the neurological signs. Animals with normal neurological examination were assigned grade 0, animals with mild deficits to grade 1, animals with moderate deficits to grade 2, severe deficits to grade 3, and very severe grade 4. (Chart 1)

Magnetic Resonance Imaging

MRI images were performed in the brain's regions or spinal cord (cervical or thoracolumbar region), considering the location of the lesion on the basis of the neurological examination in the pre- and post-transplant moments, under general anesthesia (pre-anesthesia, meperidine 4 mg / kg intramuscular, induction, midazolam 0.3 mg / kg intramuscular + propofol 5 mg / kg intravenous, maintenance with isofluorane).

MRI images, at weighted times T1 with and without contrast, T2 and Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) were performed. The MRI position were from the dorsal, sagittal and transverse sections in open field equipment (Vet-MR Grande, 0.25 Tesla, Esaote, Italy) and analyzed with digital medical imaging system (PACS, Synapse, Fuji Medical System, Tokyo, Japan).

CSF collection and analysis

After MRI, dogs in lateral decubitus were trichotomized and the antisepsis of the atlanto-occipital region, and a 25 Gx31 / 2 " spinal needle

1 (0.50x90 mm) was introduced into the atlanto-occipital region to obtain of CSF
2 samples for pre- and post-transplant analysis, as described by De Lahunta;
3 Glass, 2010⁴²

4 ***MSCs Transplantation***

5 Shortly after CSF collection, anesthetized and maintained dogs were
6 transplanted slowly from 10x10⁶ cells diluted in 0.5 mL of saline phosphate (PBS)
7 intrathecally.

8

9 **RESULTS**

10

11 ***Clinical Evaluation***

12 The information collected before and after MSCs transplantation and
13 during physical examination such as temperature, heart rate, respiratory rate,
14 palpation of lymph nodes, mucosal staining, capillary filling time, pulse and
15 hydration degree were within normal limits. The presence of lacrimal production
16 deficit and cushion hyperkeratosis were observed in the animals evaluated at M0
17 and at M2, they showed a clinical improvement of these signs.

18 ***Neurological Evaluation***

19 The neurological evaluation was performed previously (M0) at the MSCs
20 transplantation, and 30 days after the transplant at the time (M2) and scored
21 according to the neurodeficiency scale (Figure 1). Initially, in M0 in all animals the
22 level of consciousness was alert, while the quality of consciousness, epaxial
23 behavior and palpation were normal, although all presented some gait change.
24 In the first animal, the neurolocalization was multifocal, indicating a frontal cortical
25 syndrome, with epileptic and bilateral occipital (cortical blindness) and cervical
26 spine (c1-c5 bilateral) grade 2, compromising the ventral and dorsolateral fungi

1 of the spinal cord. 30 days after transplantation of MSC IT The animal showed
 2 lower myoclonus in the head, trunk and thoracic limbs region and increased
 3 interictal interval of epileptic seizures. Based on the neurodeficiency scale the
 4 lesion was multifocal, indicating a frontal and cortical frontal and central occipital
 5 (central blindness) and cervical spine (c1-c5 bilateral) grade 3. There was
 6 improvement in the neurodeficiency scale from 12 pre-transplantation to 3 post-
 7 transplantation.

8 In animal 2 the lesion was classified as a symmetric bilateral thoraco-
 9 lumbar spine syndrome (t3-l3) grade 3 compromising the ventral and dorsolateral
 10 funiculi. In addition, myoclonus was present in the thoracic limbs. 30 days after
 11 MSC IT transplantation. Occur an improvement of the extensor force of the pelvic
 12 limbs and less severe myoclonus in the thoracic limbs based on the
 13 neurodeficiency scale. The lesion was classified as bilateral symmetric
 14 thoracolumbar spine (T3-L3) grade 3, however, there was an improvement in the
 15 pre-transplant score of 17 to 3 post-transplantation.

16 In the third, case the neurological examination revealed lesions in the
 17 cortex and cerebellum, grade 13 according to the scale of neurodeficiency at M1.
 18 However, 30 days after MSCT transplantation, the presence of multifocal lesions
 19 of the prosencephalic, brainstem and cerebellum (predominantly epileptic
 20 seizures, intention tremor, motor and propicective deficits and head deviation)
 21 were present. Thus, consistent with the lesion in the cortex and cerebellum region
 22 17 according to the neurodeficiency scale.

23 In the fourth animal, multifocal signs were present, classified with a score
 24 of 29 according to the neurodeficiency scale. 30 days after transplantation of
 25 MSC IT, the animal remained with non-ambulatory tetraparesis, pelvic and left

1 limb atrophy and proprioceptive deficits in pelvic limbs, however, myoclonus
2 improved and muscle tone improved. These changes were consistent with a
3 multifocal lesion, but there was improvement to grade 16 on the neurodeficiency
4 scale.

5 The fifth animal showed multifocal changes of the procencephalus,
6 brainstem and spinal cord. These changes were consistent with a multifocal
7 medullary lesion in the left cervical, thoracolumbar and brainstem regions, grade
8 10 on the neurodeficiency scale. After transplantation of MSCs (M2), occurred a
9 clear proprioceptive and motor improvement. These changes were consistent
10 with a multifocal lesion; however, there was a reduction in neurodeficiency score,
11 grade 5.

12 At M0 in the sixth the animal showed an asymmetric cervical spinal cord
13 injury, classified as grade 2 on the neurolearning scale. However, after
14 transplantation of MSCs (M2), there was a sensory and motor improvement being
15 classified as still a cervical lesion on the left side, grade 1 on the neurodeficiency
16 scale.

17 At the M0 of the seventh animal, presented restricted sinuses in the
18 cerebellum, classified as grade 9 on the neurodeficiency scale. However, after
19 the transplantation of MSCs (M2), cerebellar ataxia and hypermetria still
20 persisted in less intensity as was grade 2 grade.

21 The eighth animal presented changes in the neurological examination
22 consistent with multifocal lesions (cervical and thoracolumbar) grade 7 on the
23 neurodeficiency scale. The animal had non-ambulatory tetraparesis, tetrataxia,
24 with proprioceptive deficits in thoracic and pelvic limbs. After transplantation of

1 MSCs (M2), the alterations still persisted being classified as multifocal (cervical
2 and thoracolumbar) grade 7 on the neurodeficiency scale.

3 The ninth animal multifocal signs, in the regions of cortex, cerebellum,
4 cervical and thoracic grade 18 doram determined. After transplantation of MSCs
5 (M2), based on the neurodeficiency scale the lesion was multifocal, in the cortex,
6 cervical cerebellum and thoracic grade 2 regions.

7 The tenth animal showed multifocal lesions predominantly in the
8 thoracolumbar spinal cord with grade 9 of pontunation. After transplantation of
9 MSCs (M2), worsening of neurological signs, with proprioceptive, sensory and
10 motor worsening, it was classified as grade 14 on the neurodeficiency scale.

11 ***Count blood cells and serum biochemistry***

12 The results of the erythrogram, leukogram and plaquetogram, as well as
13 albumin, total protein, GGT, FA, ALT, creatinine, urea and globulin of the animals
14 included in the study were within the parameters of normality before
15 transplantation of MSCs (M0) and after transplantation (M2).

16 ***Magnetic Resonance Imaging***

17 The MRI images of the brain of patient 1 at moment M1. MRIs were done
18 at weighted times of T1 (Figure 2 A) and T2 (Figure 2B) and in the Fluid
19 Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) (Figure C) sequence without contrast
20 administration. Injury was observed in the occipital cortex; and damage to the
21 cerebellum. MRI images of the spinal cord, thoracolumbar region of the animal 2
22 at moments M1 and M2 (Figure 3) were observed before transplantation of
23 intrathecal MSC, inflammatory lesions and glial scar characterized by the
24 hypersignal in the different sequences. No improvement was present in lesions
25 after 30 days of transplantation.

1 The MR transverse images of the brains of animal 3 at time M1 and M2.
 2 (Figure4) Intrathecal transplants were observed in the left temporal lobe
 3 hypersignal areas in M1 (arrows) (Figures B, C); and decrease of the hypersignal
 4 in M2 (arrows) (Figure E, F). In the sagittal images of the encephalon (Figure5)
 5 an increase of the hypersignal occurred, associated to cerebellar atrophy in M2
 6 (arrow) (Figure B). Figures A and B: T2-weighted sequences. In the animal 4,
 7 transverse images of the encephalon (Figure 6) showed a discrete reduction of
 8 the hypersignal of the occipital cortex in M2 (Figure E) in relation to that observed
 9 in M1 (Figures B, C). In the sagittal images of the encephalon (Figure 7). a
 10 reduction of the hypersignal of the occipital cortex and cerebellum in M2 (Figure
 11 B) compared to M1 (Figure A)

12 The animal 5, the sagittal images of cervical spine, at M1 showed the
 13 presence of intramedullary hypersignal (Figure A) and in central medullary
 14 channel (Figure B), 30 days after the application of the cells (M2) the images
 15 showed absence of the intramedullary hypersignal (Figure D) and a reduction of
 16 the hypersignal in the central medullary channel (Figure E). In the Flair images
 17 shown the intramedullary hypersignal in M2 (Figure. F). MRI images of the spinal
 18 cord, the thoracolumbar region of the animal 6 at moments M1 and M2 (Figure
 19 9) . No changes were observed in the thoraco-lumbar spinal cord. T2-weighted
 20 images (A, C); images in FLAIR (B, D).

21 Cross-sectional images of the encephalon (Figure 10) of animal 7 show
 22 reduced cerebellar hypersignal in M2 (Figures E and F) compared to M1 (Figures
 23 B and C). In the sagittal images (Figure 11) we observe cerebellar hypersignal in
 24 M1 (Figure B) and absence of cerebellar hypersignal in M2 (Figure D). The
 25 sagittal images of the cervical spine of dog 8 (Figure 12) show decreased

intramedullary hypersignal at M2 (Figures E, F, G and H) compared to M1 (Figures A, B, C, and D).

In the transverse and sagittal magnetic resonance images of the brains of the dog 9, (Figure 13) at moments M1 and M2 they show the presence of hypersignal in the cerebellar peduncles in M1 (arrows) and M2 (Figures A, D) - T2-weighted images; indicate a slight decrease of the hypersignal in the cerebellar peduncles in M2 (arrows) (Figures B, E) - FLAIR weighted images. Decreased hypersignal in the frontal cortex in M2 (arrows) (Figures C, F) - sagittal images weighted in T2. The transverse images of the brain (Figure 14) of dog 10 show hypersignal in the cerebellum in M2 (Figures C and D) although in M1 there was no identification of hypersignal area.

CSF analysis

In the analysis of CSF it can be observed that in all the animals there was a reduction in the number of cells present in the CSF comparing M1 with M2, this reduction can also be observed in 6 animals in relation to the amount of protein, with only two animals (9 and 10) showed a slight increase in the amount of protein present in the CSF at the moment M2.

Regarding pleocytosis at moment M1 only three animals did not present (1, 2 and 6). It can also be observed that in 4 animals there was reversion of pleocytosis (5, 7, 8 and 9) after the application of the cells, being absent. Interestingly, only animal 4 in M1 presented lymphocytic pleocytosis and, after application of the cells in M2, pleocytosis was classified as monocytic. The values are described in table 1.

1 **Discussion**

2 The selection of the animals was done by clinical examination, using as
3 criteria for inclusion animals that presented clinical neurological signs
4 independent of the stage of the disease and with an unsatisfactory vaccine
5 history. Additionally, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis in
6 urine samples was used as the definitive criterion for the diagnosis of distemper.
7 The qPCR technique has been successfully used in the detection of CDV in
8 different types of biological samples obtained from dogs with systemic and
9 neurological signs. Another form of detection is the Chromatographic
10 Immunoassay Kit for antigen (Ag) detection of distemper in dogs. However, it is
11 not as effective for the diagnosis of distemper in the neurological form when
12 compared to the polymerase chain reaction technique preceded by reverse
13 transcription (RT-PCR), in addition to requiring a large amount of antigen, which
14 can lead to a result^{43,44}.

15 The main advantages of this technique include the rapidity of obtaining the
16 results, the non-requirement of viability of the viral particle and the high levels of
17 specificity and sensitivity^{45,46}.

18 According to Elia et al., (2015)⁴⁷, urine and faeces samples, independent of
19 clinical signs, are the best samples for isolation, identification and viral
20 quantification^{4,48,49}. Therefore, the use of urine samples in this study proved to be
21 effective in the confirmatory test of qPCR for animals with distemper as biological
22 material used in our research. This result corroborates the tests obtained by
23 Negrão et al., (2007)⁴⁸ who reported 90.4% positivity of all urine and blood
24 samples, consolidating the technique.

1 Additionally, the definitive diagnosis for canine distemper may also be by
2 the investigation of the inclusion corpuscles known as intracytoplasmic or
3 intranuclear Lentz corpuscles. The Lentz corpuscle research has low cost and
4 rapid results, but the virus must be in mitosis to be detected⁵⁰. Lentz corpuscles
5 can be visualized from blood smears, cerebrospinal fluid and impressions of the
6 nasal, preputial, vaginal and conjunctival mucosae of dogs with canine
7 distemper^{51,52,1}. However, in the analysis of blood sample smears collected in our
8 study, it was not observed the presence of Lentz corpuscle in red blood cells or
9 leukocytes, so it was not possible to associate this test with the confirmatory test
10 for the present study.

11 Interestingly, during the selection phase of the animals for inclusion in the
12 research, 15 animals presenting with myoclonus in the face and thoracic limbs
13 were negative in the PCR test. Studies have considered myoclonus as the most
14 common clinical sign for distemper⁵³⁻⁵⁶. However myoclonus is not a specific sign
15 of distemper, as it can also occur in other neurological diseases, such as in the
16 CNS of dogs of the breeds such as Labrador Retriever, Saluki, Samoyed and
17 Silky Terrier^{1,57}. Therefore, interpreting myoclonus as a unique sign of
18 pathognomonic distemper is controversial.

19 According to McCandlish (2001)⁵⁸, clinical signs of distemper are variable
20 and can be influenced by intrinsic and extrinsic factors, evolving within a few days
21 after infection⁵⁹. The main clinical signs identified at the M0 moment of our study
22 were hyperkeratosis and ocular secretion, which are common signs reported in
23 cases of distemper⁶⁰⁻⁶⁴. At the moment M2, there was a clinical improvement of
24 these signs, which can be attributed to the reduction of the viral load or even a
25 possible migration of adipose tissue MSCs to the lesion sites, cushions and

1 lacrimal gland of the third eyelid, promoting paracrine effect, made the cells
2 recover there. Although the cells have been applied intrathecally, there is a
3 possibility that these cells migrate from the CSF to the systemic circulation and
4 reach the injured sites, recovering the tissue damage⁶⁵⁻⁶⁷.

5 This cellular migration process is an inherent characteristic of MSCs, called
6 homing which is defined as the capture of MSCs by the vasculature of a tissue,
7 followed by its transmigration through the endothelium and spongy degeneration
8 to other tissues⁶⁸. The homing process is positively influenced by the secretion
9 of different growth factors secreted by the host cells of the virus that bind to the
10 CXCR4 receptor of MSCs cells. In the MSCs-TA, several metalloproteinases
11 such as MMP2 and MMP9⁶⁷ favor the migration of these cells from cytokine
12 stimuli and growth factors⁶⁹⁻⁷². Thus, these results suggest that in fact MSCs
13 contributed positively to the regeneration of cushion skin.

14 The use of the intrathecal route as a method for cell therapy in CNS
15 disorders may be advantageous, since when it crosses the blood brain barrier, it
16 potentiates its effects on tissue regeneration near the lesion site, especially in the
17 treatment of encephalopathies and myelopathies in dogs⁷³. Intrathecal
18 transplantation of MSCs-MO through the magna or lombo-sacra cisternae in
19 dogs⁶⁶, equines³⁸ and in rats⁷³ showed no adverse effects. this viable, minimally
20 invasive and safe route when compared with the intraventricular route⁷⁴. This
21 pathway also reduces the disadvantage over the possible effects of intravenous
22 cell transplantation as a cellular loss with pulmonary microvascularization, as well
23 as the risk of pulmonary thromboembolism⁷⁵. The intrathecal procedure may
24 present some limiting points that may hamper the technique as well as the non-
25 use of this route for multiple transplants. Among these points we can mention the

1 need for general anesthesia, it can not be used in animals with contraindication
2 of lumbar puncture or atlanto -occipital, in addition to the need for a professional
3 trained for technique.

4 Phenotypically the cells obtained in adipose tissue and bone marrow have the
5 same characteristics. Considering the difficulty of obtaining bone marrow cells
6 when it comes to small animals, one can choose to use adipose tissue cells, since
7 it is easily obtained, has a higher replication capacity and has the same migration
8 capacity for to injury. We suggest the replacement of bone marrow cells by
9 adipose tissue cells⁶⁷.

10 The cell population isolated from adipose tissue is heterogeneous and
11 contains a physiological combination of fibroblasts, endothelial cells and
12 progenitors, pericytes, macrophages, preadipocytes, B and T lymphocytes and
13 smooth muscle cells. The total population of stem cells is estimated to be 1 to 3%
14 of total nucleated cells⁷⁶. Studies are being carried out in order to quantify the
15 number of cells needed to exert a therapeutic effect within the target organ area
16 for various diseases. In our research, 10×10^6 cells per animal were used, differing
17 from some intravenous, epidural and intrathecal work in dogs in which the number
18 of cells used was 1×10^6 million per kilo and 5×10^6 per animal⁷⁷.

19 Although we can expect that more transplanted cells will lead to better
20 results, there may be a threshold after which a higher number of cells does not
21 result in any benefit. As a study by Omori et al. (2008)⁷⁸ in a model of cerebral
22 ischemia in rats, there was a significant improvement in the results when doses
23 of 1×10^6 cells were injected, whereas when that number was increased to $3 \times$
24 10^6 cells there was no improvement, as well as early infusion, shortly after injury,
25 resulted in higher fixation indices, but no benefit could be detected in terms of

1 final results. However, we believe that successive transplants could lead to an
2 even better therapeutic response, a fact observed by ^{79,80}

3 Regarding the changes observed during the neurological evaluation at the
4 moment M0 and M2 the animals were classified into a scale (Neurodeficiency
5 Scale), developed by our research group, from the neurological examination.
6 Among the 10 animals evaluated with neurological lesions seven presented a
7 reduction in the degree of the Neurodeficiency Scale, two animals progressed and
8 one did not change the degree. The reduction of the degree is evident by the
9 clinical improvement of neurological signs such as: Posture, March, Coordination,
10 Cranial Nerves and Epileptic Crises. The region where the magnetic resonance
11 imaging was obtained was determined according to the location of the lesion
12 during the neurological examination.

13 The improvement of the clinical signs, and therefore of the degree of
14 neurodeficiency, shows to be compatible with the magnetic resonance images
15 obtained in the M2 of the animals, in which animal 4 presented (reduction of the
16 hypersignal in occipital cortex and cerebellum), 5 (absence of the hypersignal
17 intramedullary and medullary central channel hypersignal reduction), 7 (reduction
18 of the cerebellar hypersignal), 8 (reduction of the intramedullary hypersignal) and
19 animal 9 (discrete reduction of the hypersignal in cerebellar peduncles).

20 Animals 3 and 10 presented worsening of the neurological signs,
21 represented by the increase of the degree in the neurodeficiency scale. This
22 progression of the clinical signs was compatible with the findings of the
23 resonance, where the number 3 presented cerebellar atrophy and increase of the
24 hypersignal and the animal number 10 presented increase of the hypersignal in
25 the cerebellum. In these cases the progression of the signs and the non-response

1 to therapy may be related to the acute phase of the disease in which these
2 animals were found, corroborating with the results obtained by Brito et al. 2009⁸¹
3 and Pinheiro, 2016⁸² where treatment with dogs in the viraemic stage of the
4 disease was shown to be ineffective.

5 On the other hand, the animal 8 showed a slight improvement of the data
6 obtained in the MRI images, but it remained in the same scale of graduation of
7 neurodeficiency. The chronic state with advanced lesions, such as intense
8 muscular atrophy, could justify the lack of clinical improvement in the period
9 evaluated.

10 TNF-alpha secretes TNF-alpha which is associated with cellular apoptosis,
11 high concentrations of TNF-alpha hinder the homing of MSCs, reduce tissue
12 repair capacity and secretion of factors such as VEGF and BDNF that assist in
13 the migration of MSCs to the site of lesion⁸³. It has recently been shown that the
14 use of G-CSF in combination with MSCs transplantation allows the reduction of
15 TNF-alpha levels secreted by the injured tissue, which increases the tissue repair
16 power, reduces apoptosis and increases the secretion of factors that assist in the
17 migration of MSCs to the site of injury⁸³. Thus, the results evaluated by Li et al.,
18 (2019)⁸³, suggest that in chronic cases of the disease, where there is a great
19 cellular loss, the concentration of TNF-alpha in the injured tissue is high, making
20 tissue migration and regeneration difficult it has been described that MSCs
21 produce innumerable growth factors and cytokines that facilitate endogenous
22 repair⁶⁷.

23 Animal 2 presented inverse results to patient 8, with no lesion
24 improvement in the MR images obtained in M2, but the degree on the
25 neurodeficiency scale improved after transplantation.

1 The maintenance of the MR imaging pattern may be related to the need
2 for a longer tissue recovery time or lower sensitivity of the MRI equipment used,
3 to detect minor lesions that could have improved with the treatment. Another
4 explanation would be the fact that there is not always a strong correlation
5 between clinical signs and MRI images, strengthening clinical data observed in
6 other studies in which a serious clinical sign can be observed without the MRI
7 image being severe⁸⁴.

8 To date, there were no studies to correlate magnetic resonance imaging
9 of dogs with neurological changes in distemper before and after intrathecal
10 transplantation with MSCs-TA, in addition to a scarce number of studies
11 describing CNS lesions caused by distemper of resonance images. This
12 demonstrates the need for further studies that include images of CNS lesions of
13 dogs with distemper, clinical response to transplantation, and the establishment
14 of cell therapy protocols, according to the type of stem cell used by this
15 transplantation route, amount of cells and frequency of application, aiming at the
16 treatment of this disease.

17 In the analysis of CSF it can be observed that in all the animals there was
18 a reduction in the number of cells present in the CSF comparing the M1 with M2.
19 This reduction can also be observed in six animals in relation to the amount of
20 protein.

21 At the moment M1 only three animals (1, 2 and 6) did not present
22 pleocytosis. This absence was also verified by different authors^{54,85-87} in dogs
23 with distemper showing neurological signs, which associated this finding with
24 dogs in the early and acute stages of the neurological phase of said disease,

1 disagreeing with our study, since animal 1 and 2, were no longer in the initial
2 neurological phase of the disease but in the chronic phase.

3 On the other hand, in situations of affections⁸⁸⁻⁹⁰ reported that, in dogs with
4 encephalitis, there is a presence of cerebellar hypercellularity, the viral infections
5 of pleocytosis being characterized by a larger number of lymphocytes, and the
6 presence of monocytes, macrophages and rare neutrophils of lymphocytic
7 pleocytosis may also occur in chronic infections, a fact demonstrated by patient
8 number 4 at the time 1. In the present study 7 animals (3, 4,5,7,8,9 and 10)
9 presented lymphocytic pleocytosis at the moment M 1 demonstrated by
10 increased CSF cellularity in agreement with the findings of ^{87,88,91} which relate this
11 finding to canine distemper.

12 It can also be observed that in 4 animals (5,7,8 and 9) there was reversion
13 of pleocytosis after the application of the cells, being absent in M2. In normal and
14 non-contaminated conditions, the total number of nucleated cells generally does
15 not exceed 5-6 cells/ μ L, among which are lymphocytes, monocytes and
16 macrophages, as reported by different authors^{92,93,94}, observed at the M2 moment
17 of our study in 4 animals (5,7, 8 and 9) that showed reversion of pleocytosis,
18 suggesting that cell transplantation may have contributed to the return of
19 normalcy.

20 In situations of breakdown of the CNS hygiene state, protein levels may
21 be increased, especially in cases of encephalitis, as described by different
22 authors ^{86,90,95,96} in dogs with distemper toxoplasmosis, meningitis, abscesses of
23 bone marrow or brain, and also in noninflammatory conditions, a fact observed in
24 a study by Gama et al; (2005)⁸⁷ and also noticed in our study, in which the animals
25 presented increased number of proteins in M1.

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

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

14

15 **CONCLUSION**

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

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

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

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

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

20 **ACKNOWLEDGEMENT**

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

24

25

1 **ETHICAL APPROVAL**

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

5 **STATEMENT OF HUMAN AND ANIMAL RIGHTS**

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

9 **STATEMENT OF INFORMED CONSENT**

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

12 **CONFLICTING INTEREST**

13 The authors have no competing interests.

14 **REFERENCES**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1 **FIGURE 1:** Animals Score in the Neurodeficiency Scale at time M0 (before
2 transplantation MSCs, black bars) and at time M2 (30 days after transplantation
3 MSCs; white bars). The numbers above the bars represent the exact score of
4 each animal in the experiment.

5 **FIGURE 2:** Magnetic resonance imaging of the brain before intrathecal MSC
6 transplantation. (A) time weighted in T1; (B) T2-weighted time; (C) FLAIR. Red
7 arrows indicate injury to the occipital cortex; Blue arrows indicate lesions in the
8 cerebellum.

9 **FIGURE 3:** Magnetic resonance imaging of the thoracolumbar spine of patient 2,
10 immediately after (M1) and 30 days after (M2) the intrathecal transplantation of
11 multipotent mesenchymal stromal cells. Intramedullary hyaline areas in M1 and
12 M2 (arrows) (Figures A, D). Intramedullary hypersignal areas in M1 and M2
13 (arrows) (figures B, C, E, F). Figures A and D: time-weighted sequences in T1; B
14 and E: sequences with T2-weighted time; C and F: sequences in Fast Flair

15 **FIGURE 4:** Magnetic resonance cross-sectional images of the brains of animal
16 3, immediately before (M1) and 30 days after (M2) intrathecal transplantation of
17 multipotent mesenchymal stromal cells. Hypersignal in the left temporal lobe in
18 M1 (arrows) (figures B, C); decrease of the hypersignal in M2 (arrows; figure E,
19 F). Figures A and D: time-weighted sequences in T1; B and E: time-weighted
20 sequences in T2. C and F: Fast Flair sequences.

21 **FIGURE 5:** Magnetic resonance imaging of the brain of dog 3, immediately before
22 (M1) and 30 days after (M2) intrathecal transplantation of multipotent
23 mesenchymal stromal cells. Increase of the hypersignal, associated to cerebellar
24 atrophy in M2 (arrow) (Figure B). Figures A and B: T2-weighted sequences.

25 **FIGURE 6:** Magnetic resonance imaging of dog's 4 brain, immediately before
26 (M1) and 30 days after (M2) intrathecal transplantation of multipotent
27 mesenchymal stromal cells. Hypersignal in the occipital cortex in M1 (arrow)
28 (Figures B, C); slight decrease of the hypersignal of the occipital cortex in M2
29 (arrow) (figure E). Figures A and D: time-weighted sequences in T1; B and E:
30 time-weighted sequences in T2. C and F: Fast Flair sequences.

31 **FIGURE 7:** Magnetic resonance imaging from dog's brain 4, immediately before
32 (M1) and 30 days after (M2) the intrathecal transplantation of multipotent
33 mesenchymal stromal cells. Hypersignal in the occipital cortex and cerebellum in
34 M1 (arrow) (figure A); decreased hypersignal of the occipital cortex and in the

1 cerebellum in M2 (arrow) (Figure B). Figures A and B: T2-weighted time
2 sequences.

3 **FIGURE 8:** Magnetic resonance imaging of the cervical spine of dog 5,
4 immediately before (M1) and 30 days after (M2) the intrathecal transplantation of
5 multipotent mesenchymal stromal cells. Intramedullary hypersignal in M1 (arrow)
6 (Figure A); absence of the hypersignal in M2 (arrow) (Figure D).

7 Hypersignal in medullary central channel in M1 (arrow) (Figure B); decreased
8 hypersignal in the medullary central channel in M2 (arrow) (figure E).
9 Intramedullary hypersignal in M1 (arrow) (figure C); absence of hypersignal in M2
10 (arrow) (Figure F). Figures A and D: time-weighted sequences in T1; B and E:
11 sequences with T2-weighted time; C and F: sequences in Fast Flair.).

12 **FIGURE 9:** Magnetic resonance images of the thoraco-lumbar spine of dog 06,
13 immediately before (M1) and 30 days after (M2) the intrathecal transplantation of
14 multipotent mesenchymal stromal cells. No changes were observed in the
15 thoraco-lumbar spinal cord. T2-weighted images (A, C); images in FLAIR (B, D).

16 **FIGURE 10:** Magnetic resonance imaging of dog's 7 brain, immediately before
17 (M1) and 30 days after (M2) intrathecal transplantation of multipotent
18 mesenchymal stromal cells. Cerebellar hypersignal in M0 (arrow) (Figures B, C);
19 decreased hypersignal in M2 (arrow) (Figure E, F). Figures A and D: time-
20 weighted sequences in T1; B and E: time-weighted sequences in T2. C and F:
21 Fast Flair sequences.

22 **FIGURE: 11** Magnetic resonance imaging of dog's 7 brain immediately before
23 (M1) and 30 days after (M2) intrathecal transplantation of multipotent
24 mesenchymal stromal cells. Cerebellar hypersignal in M0 (arrow) (figure B);
25 absence of hypersignal in M2 (arrow) (Figure D). Figures A and C: T1-weighted
26 time sequences; B and D: time-weighted sequences in T2

27 **FIGURE: 12** Magnetic resonance imaging of the cervical spine of dog 8,
28 immediately before (M1) and 30 days after (M2) intrathecal transplantation of
29 multipotent mesenchymal stromal cells. Areas of intramedullary hypersignal in
30 M1 (arrows) (figures A, B, C, D); decreased intramedullary hypersignal in M2
31 (arrows) (figure E, F, G, H). Figures A and E: T1-weighted sequence; B and F:
32 T2-weighted sequence; C and G: Gradient Echo sequence; D and H: STIR
33 sequence.

1 **FIGURE: 13** Transverse and sagittal magnetic resonance imaging of the brains
2 of dog 9, immediately before (M1) and 30 days after (M2) the intrathecal
3 transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells. Hypersignal stay in the
4 cerebellar peduncles in M1 (arrows) and M2 (Figures A, D) - T2-weighted images;
5 Discrete decrease of the hypersignal in the cerebellar peduncles in M2 (arrows)
6 (Figures B, E) - weighted images in FLAIR. Decreased hypersignal in the frontal
7 cortex in M2 (arrows) (Figures C, F) - sagittal images weighted in T2.

8 **FIGURE: 14** Magnetic resonance imaging of dog's 10 brain, immediately before
9 (M1) and 30 days after (M2) the intrathecal transplantation of multipotent
10 mesenchymal stromal cells. Hypersignal in the cerebellum in M2 (arrows) (figures
11 C, D). Figures A and C: T2-weighted sequences; B and D: Fast Flair sequences.

FIGURA 1

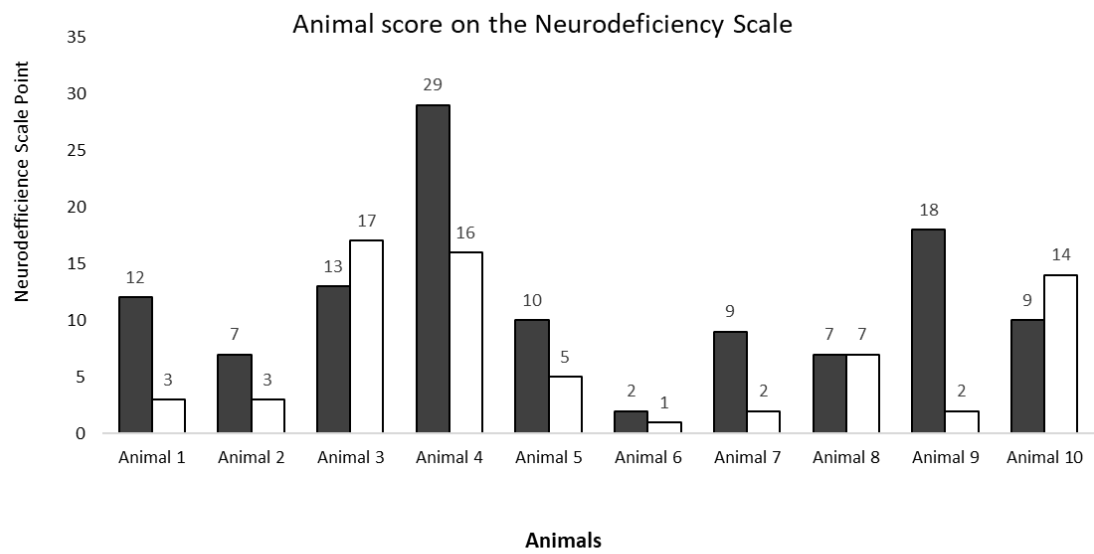


FIGURA 2

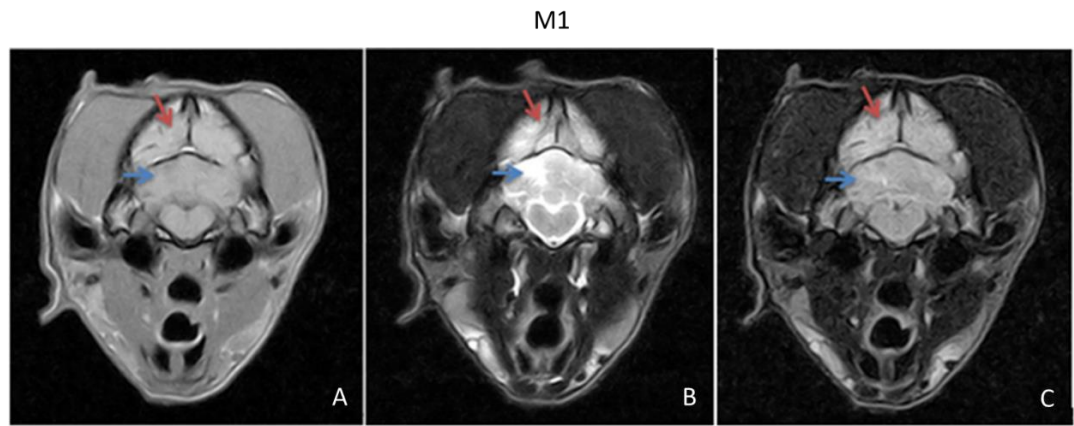


FIGURA 3

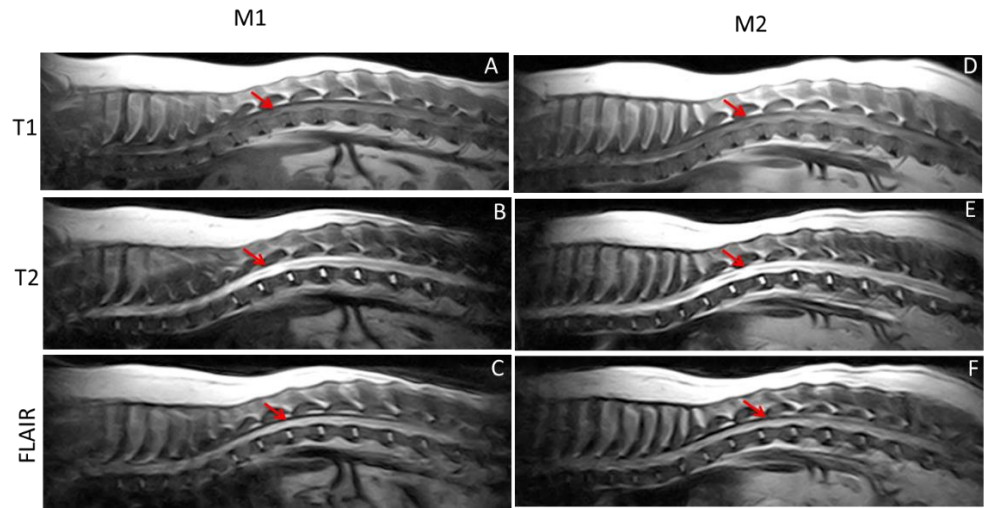


FIGURA 4

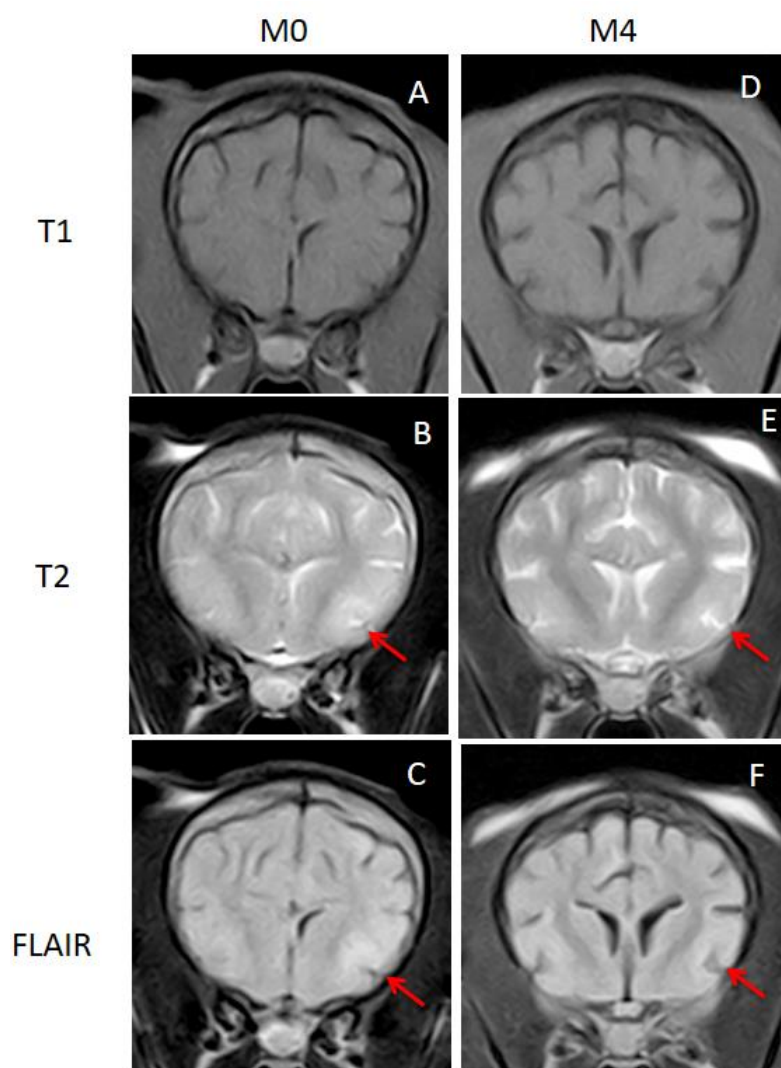


FIGURA 5

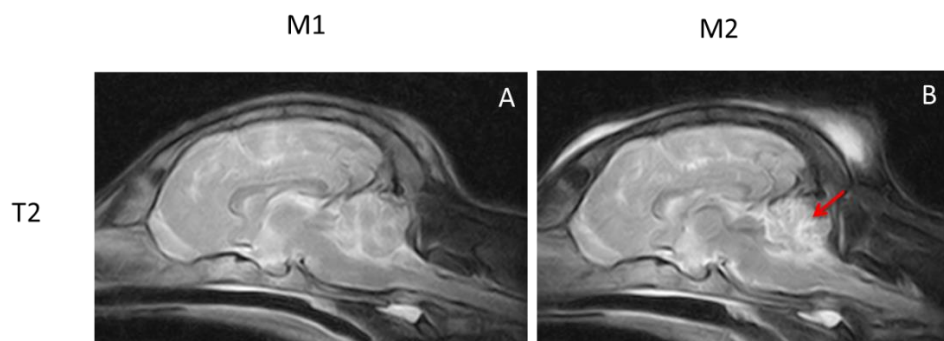


FIGURA 6

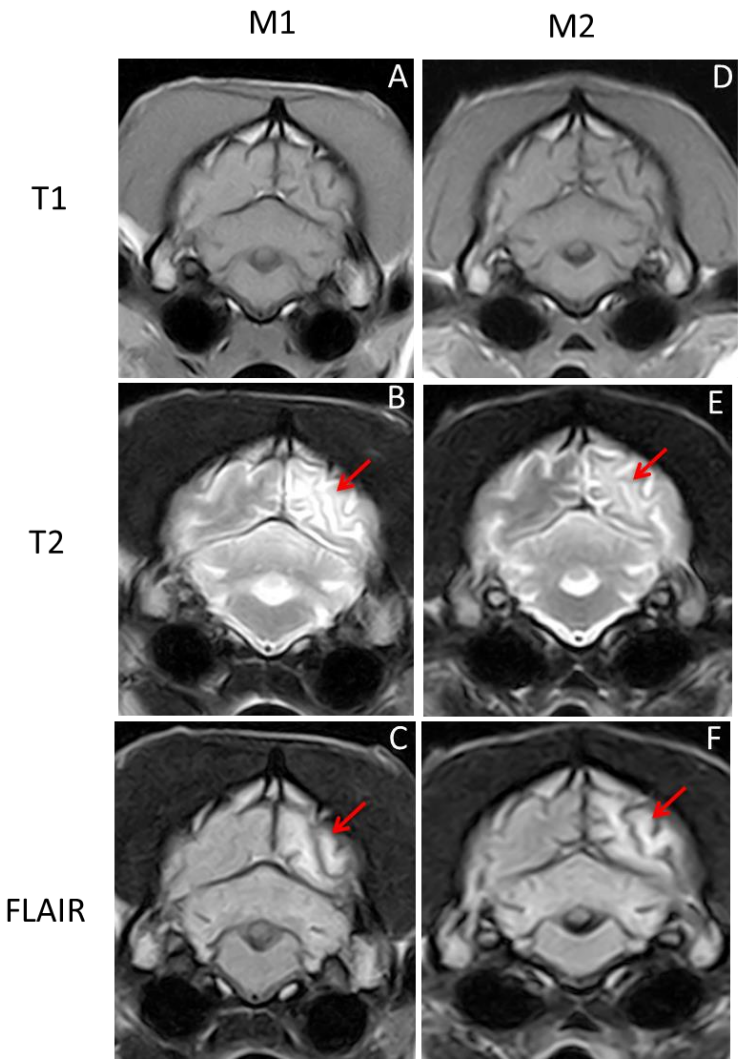


FIGURA 7

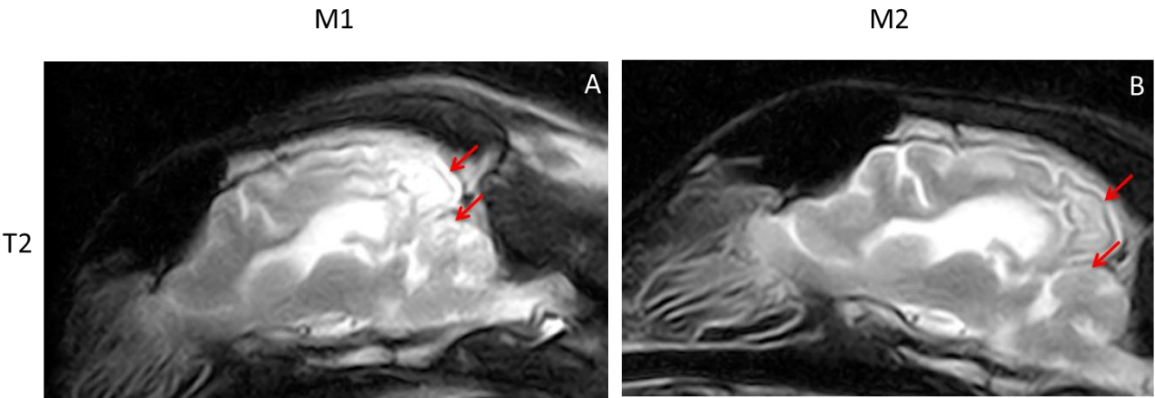


FIGURA 8

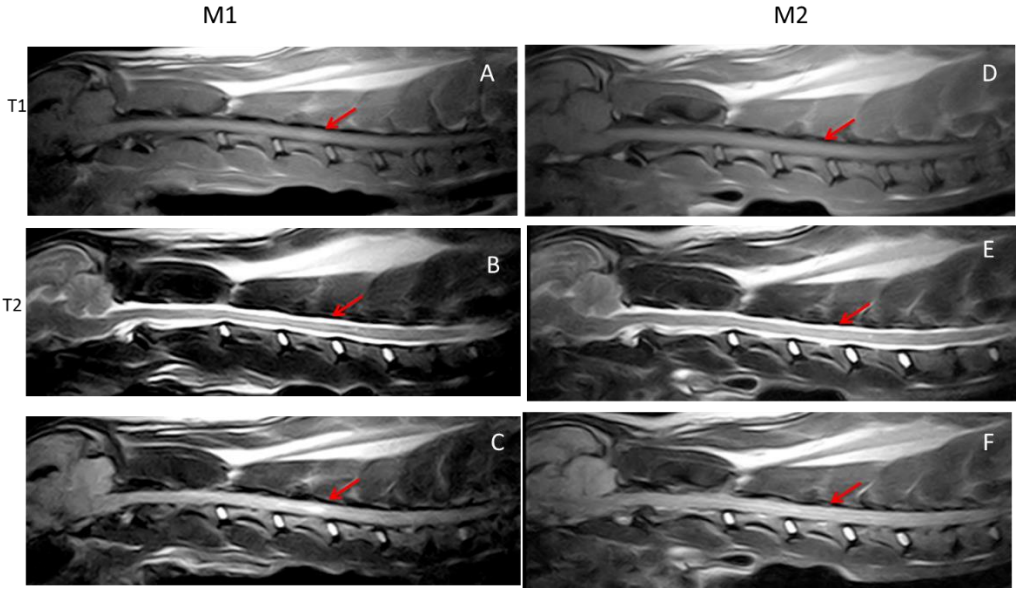


FIGURA 9

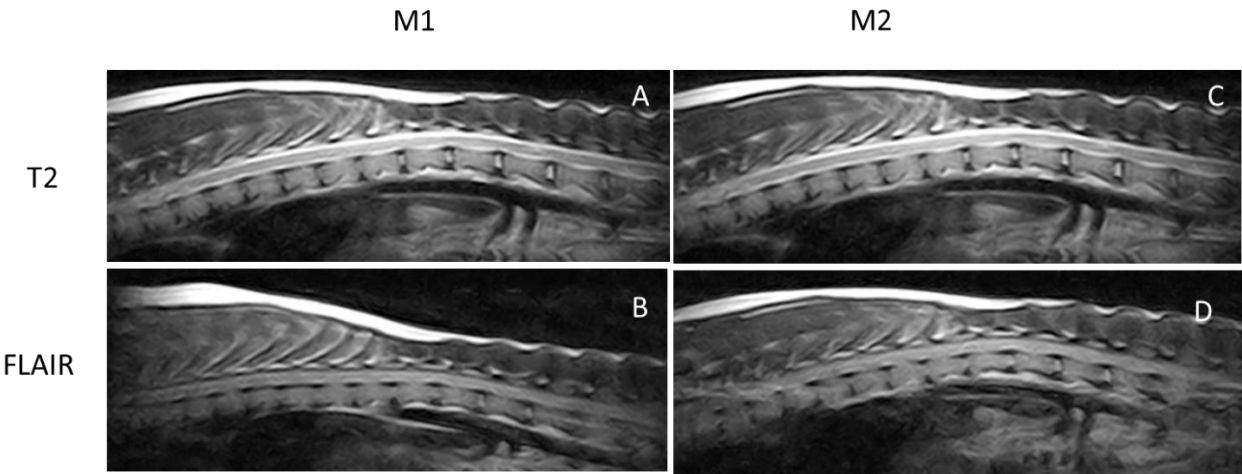


FIGURA 10

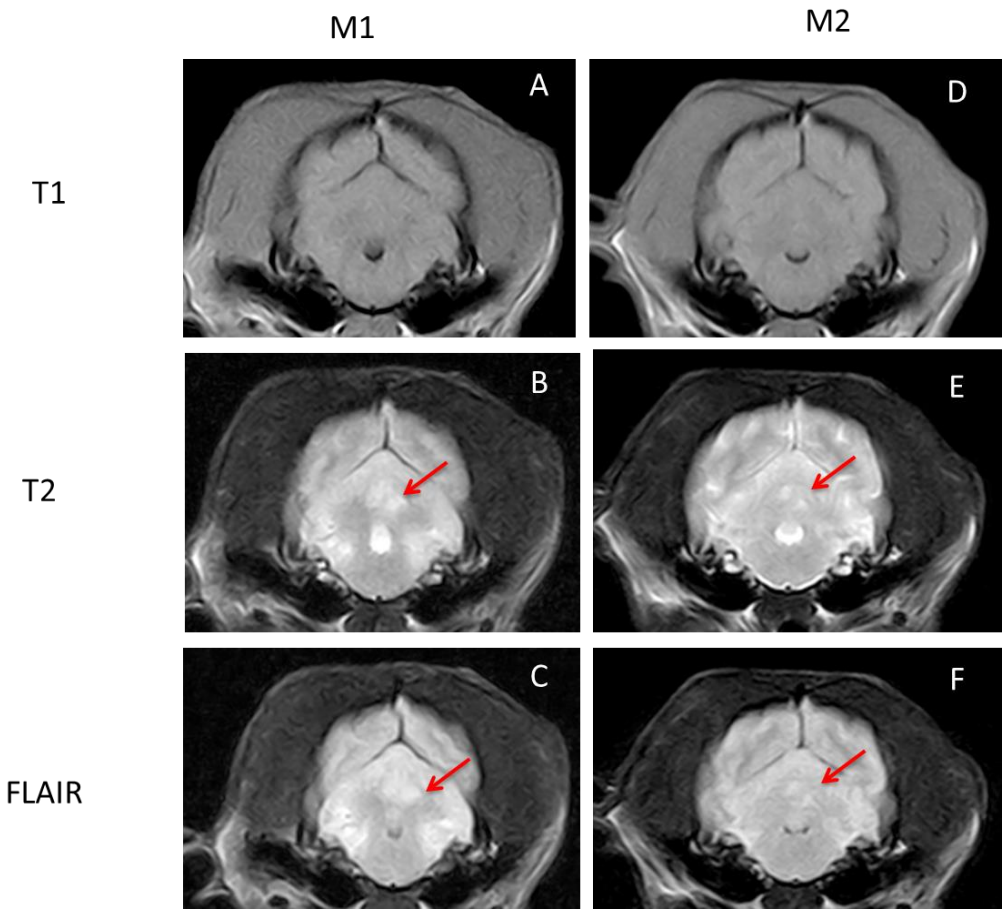


FIGURA 11

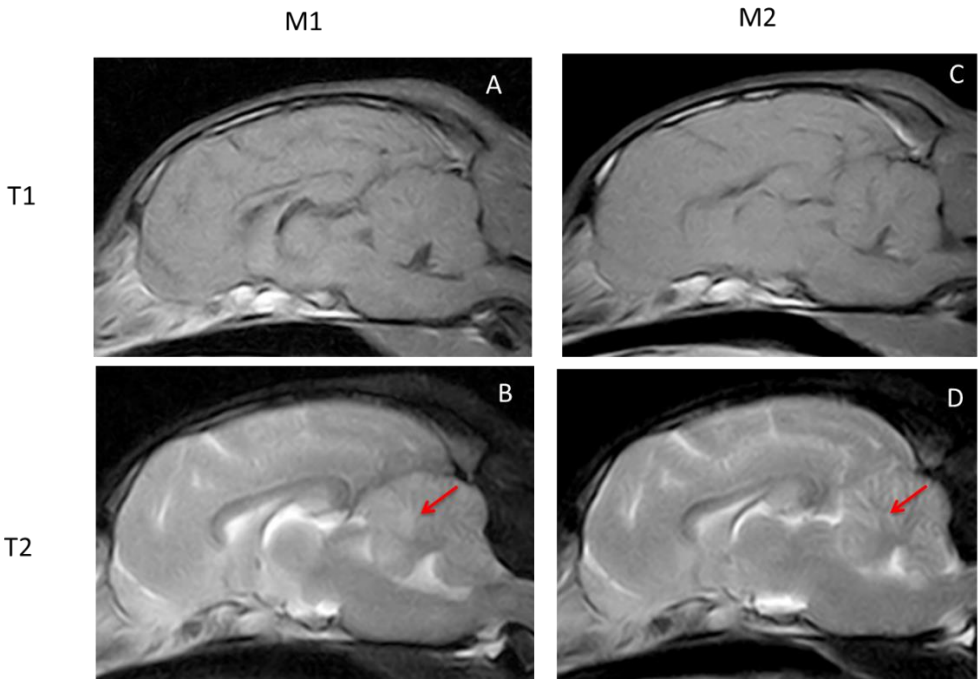


FIGURA 12

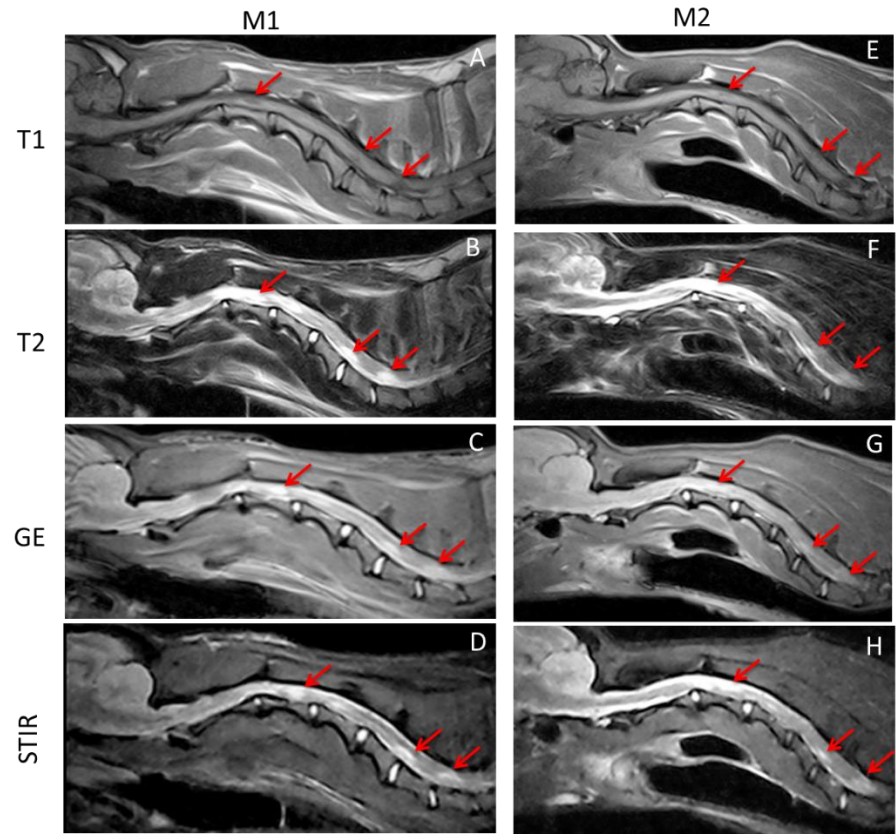


FIGURA 13

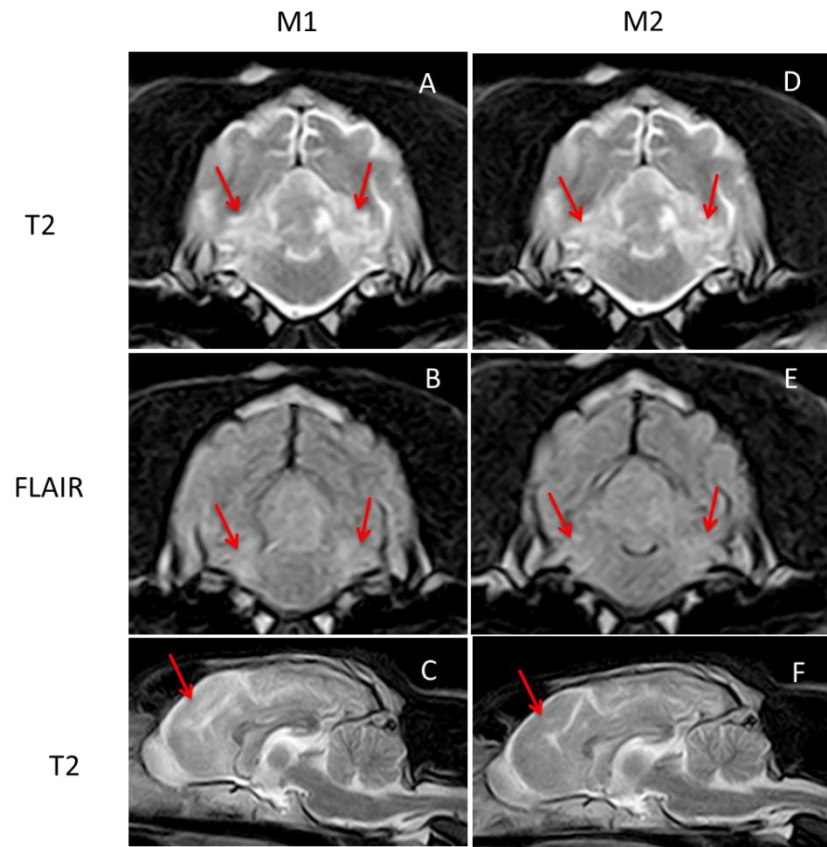


FIGURA 14

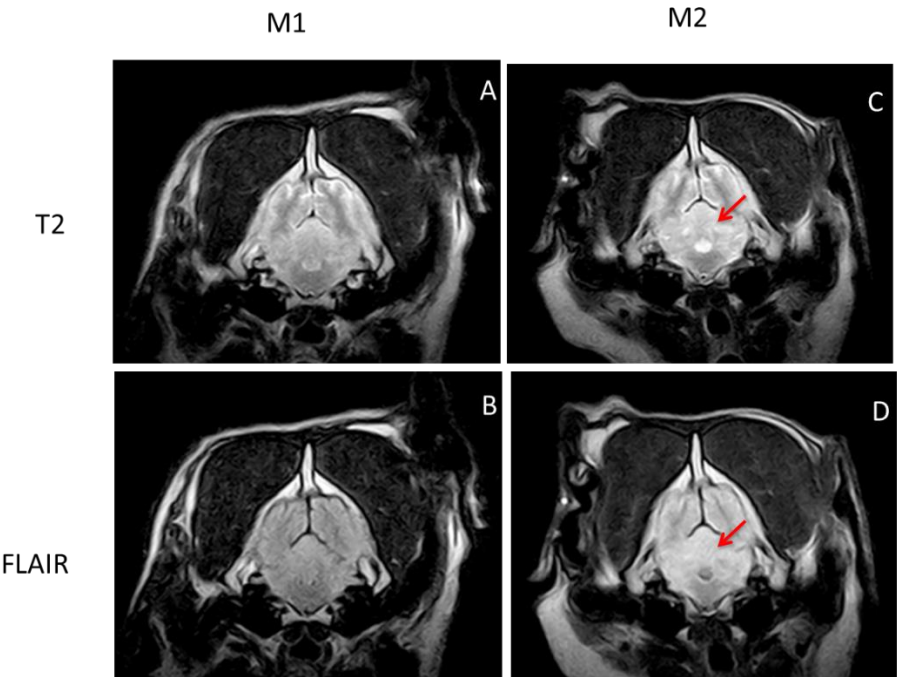


TABLE 2: LCR analysis data from each animal. Values obtained at M1 (before transplant) and at M2 (after transplant) of number of cells (cel/ μ L), protein (mg/dL) and in relation to pleocytosis.

		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10
CELLS (cel/ μ L)	M1	1	1	77	12	31	2	12	11	6	27
	M2	NR	NR	33	17	2	0	5	1	1	19
PROTEIN	M1	Traces (35,5 mg/dL)	Negative (19,9 mg/dL)	Traces (75mg/dL)	Traces (23,2mg/dL)	Positive (69,6 mg/dL)	Traces (20 mg/dL)	Traces (41,3mg/dL)	Positive (63,5 mg/dL)	Positive (27,1 mg/dL)	Positive (75 mg/dL)
	M2	NR	NR	Traces (52,5mg/dL)	Traces (19,7mg/dL)	Traces (38.1 mg/dL)	Traces (19,5 mg/dL)	Traces (36,2mg/dL)	Positive (15,1 mg/dL)	Positive (32,9 mg/dL)	Positive (77,5 mg/dL)
PLEOCYTOSIS	M1	Absent	Absent	Lymphocytic	Lymphocytic	Pleocitose	Absent	Lymphocytic	Neutrophilic	Mixed	Mixed
	M2	NR	NR	Lymphocytic	Monocytic	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Mixed

CHART 1: Neurodeficiency Scale Sheet

1. M0		Points	Escore
Consciousness	watchful	0	
	Depressed	1	
	Delusion / disorientation	2	
	Semicomatous	3	
	Comatous*	4	
Behavior	Normal Behavior	0	
	Abnormal behavior**	2	
Total			0

2. EPILEPTICAL SEIZURE		Points	Escore
Absent		0	
Focal		1	
Generalizadas ou focais com generalização secundária		2	
Series		3	
Epileptic Seizure		4	
Total			0

3. HEAD AND BODY POSITION		Points	Escore
Normal		0	
Head deviation		1	
Pleurothotic		1	
Opisthoton		2	
Posture of Schiff-sherrington		2	
Decerebellation stiffness		3	
Decerebration rigidity		4	
Total			0

4. MARCH		Points	Escore
Normal		0	
Hemi / ambulatory paraparesis; monoparesia		1	
Hemi / non-ambulatory paraparesis, ambulatory tetraparesis or monoplegia		2	
Hemi / non-ambulatory paraplegia or tetraparesis		3	
Tetraplegia		4	
Light ataxia (hemi / para / mono)		1	
Moderate ataxia (hemi / para / mono) and mild tetrataxis		2	
Severe ataxia (hemi / para / mono) and moderate tetrataxis		3	
Severe Tetrataxis		4	
Total			0

5. COORDINATION		Points	Escore
Normal		0	
Mild involuntary movements ***		1	
Moderate involuntary movements		2	
Severe involuntary movements		3	
Dismetria, intention tremor, broad base		2	
Total			0

6. CRANIAL NERVES

Points	Escore
Normal	0
Injury inNC II	3
Injury inNC III-IV	2
Injury inNC V ramo motor	3
Injury in NC V sensitive branch	2
Injury in NC VI-XII	4
Multiple injuries in NC. VI-XII	+ 4 pts
Total	0

7. REFLEXES

Normal with normal gait	0	
Normal with abnormal gait	1	
Decreased / missing thoracic or pelvic limbs	2	
Increased in thoracic or pelvic limbs	2	
Perineal / anal decreased	2	
Total		0

8. NOCICEPTION

Superficial	Normal	0	
	Decreased (hemi / para / mono)	1	
	Decreased (tetra)	2	
	Absent (hemi / para / mono)	3	
Profunda	Absent (tetra)	4	
	Normal	0	
	Decreased (hemi/para/mono)	2	
	Decreased (tetra)	3	
	Absent (hemi/para/mono)	4	
Hyperesthesia / allodynia	Absent (tetra)	4	
		1	
Total			0

9. EPAXIAL PALPATION / URINARY VESICLE

Epaxial	Normal	0	
	Painful	1	
Urination	Normal	0	
	Incontinence / intermittent urinary retention (manual compression)	1	
	Incontinence / constant urinary retention	2	
	Incontinence / constant urinary retention requiring permanent catheterization	3	
Total			0

APÊNDICE 1

Animal	SEXO	IDADE	RAÇA	Estado de vacinação	Tempo com sinais clínicos (meses)
Animal 1	FÊMEA	1 ANO	SRD	não satisfatório	10 meses
Animal 2	FÊMEA	4 ANOS	LHASA	não satisfatório	12 meses
Animal 3	FÊMEA	4 MESES	SRD	não satisfatório	1 mês
Animal 4	MACHO	7 ANOS	SRD	não satisfatório	2 meses
Animal 5	FÊMEA	10 ANOS	SRD	não satisfatório	1 mês
Animal 6	MACHO	1 ANO	SRD	não satisfatório	2 semanas
Animal 7	FÊMEA	7 ANOS	SRD	não satisfatório	2 semanas
Animal 8	MACHO	1 ANO	SRD	não satisfatório	8 meses
Animal 9	MACHO	7,2MESES	SRD	não satisfatório	1 mês
Animal 10	MACHO	1, 9 MESES	SRD	não satisfatório	1 mês

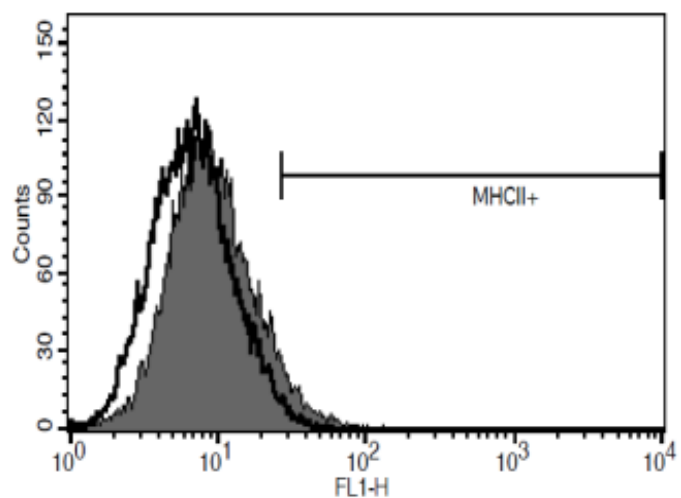
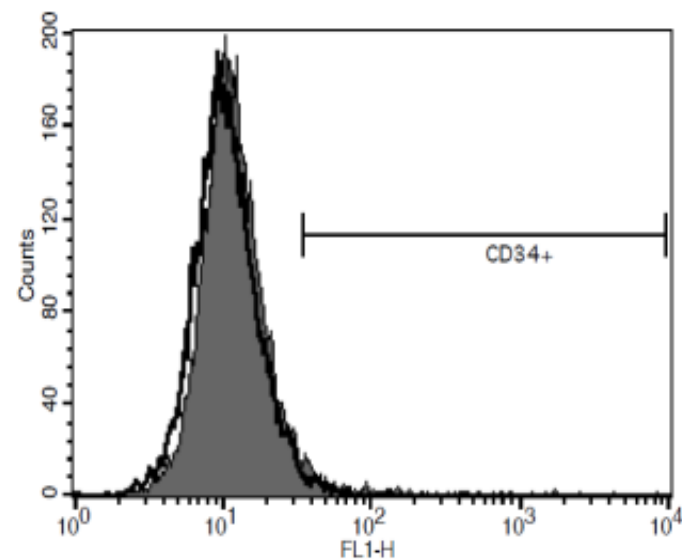
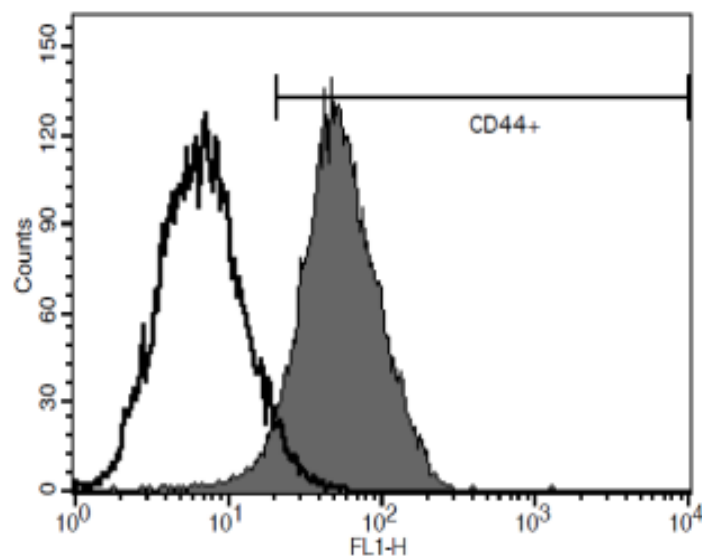
APÊNDICE 2

		Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10
CÉLULAS (cél/μL)	M1	1	1	77	12	31	2	12	11	6	27
	M2	NR	NR	33	17	2	0	5	1	1	19
PROTEÍNA	M1	Traços (35,5 mg/dL)	Negativo (19,9 mg/dL)	Traços (75mg/dL)	Traços (23,2mg/dL)	Positivo (69,6 mg/dL)	Traços (20 mg/dL)	Traços (41,3mg/dL)	Positivo (63,5 mg/dL)	Positivo (27,1 mg/dL)	Positivo (75 mg/dL)
	M2	NR	NR	Traços (52,5mg/dL)	Traços (19,7mg/dL)	Traços (38.1 mg/dL)	Traços (19,5 mg/dL)	Traços (36,2mg/dL)	Positivo (15,1 mg/dL)	Positivo (32,9 mg/dL)	Positivo (77,5 mg/dL)
PLEIOCILOSE	M1	Ausente	Ausente	Linfocítica	Linfocítica	Pleocitose	Ausente	Linfocítica	Neutrofílica	Mista	Mista
	M2	NR	NR	Linfocítica	Monocítica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Mista
pH	M1	8.5	9	9	8,5	9	9	9	9	9	8
	M2	NR	NR	8	9	9	9	9	9	8,5	9
FIBRINOGENIO	M1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	M2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GLICOSE	M1	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +	2 +
	M2	NR	NR	3 +	2 +	3 +	2 +	3 +	2 +	2 +	2 +
PANDY	M1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1	Negativo	Negativo	1	Negativo	Negativo
	M2	NR	NR	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1
SANGUE OCULTO	M1	Traços	2 +	Negativo	Negativo	2 +	Negativo	4 +	4 +	Negativo	4 +
	M2	NR	NR	Traços	Negativo	4 +	4 +	4 +	3 +	1 +	Traços
HEMÁCIAS	M1	0	570	1	0	3	0	71	46.500	1	3.900
	M2	NR	NR	6	5	28	5	594	68	2	2
COAGULAÇÃO	M1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	M2	NR	NR	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
ASPECTO	M1	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Turvo	Límpido	Turvo
	M2	NR	NR	Límpido	Límpido	Turvo	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido
COR	M1	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Avermelhado	Incolor	Róseo
	M2	NR	NR	Incolor	Incolor	Róseo	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor	Incolor
VOLUME	M1	0,8	2	1	2	3	1	1	2,5	1	1
	M2	NR	NR	2	1	1	1	1	3	6	4

APÊNDICE 3

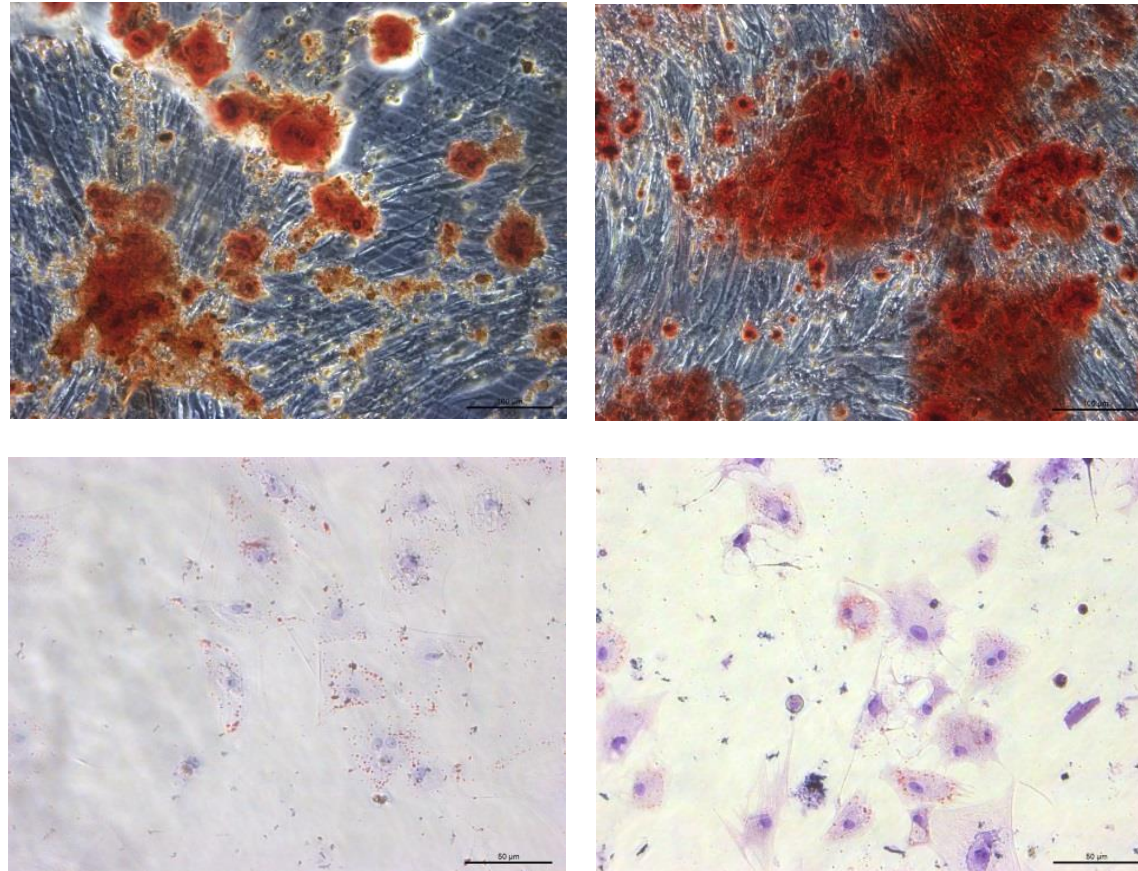
[illegible]

APÊNDICE 4

**Citometria de fluxo**

Observa-se expressão significativa do marcador de células mesenquimais CD44 (86,7%) e uma expressão moderada para CD90 (53,2%). Já os marcadores CD34 e MHCII apresentaram uma baixa expressão (2,1 e 1,2% respectivamente).

APÊNDICE 5



Diferenciação *in vitro*: osteogênica e adipogênica. Na diferenciação osteogênica aos 15 dias, todas as amostras cultivadas com o meio de indução apresentaram intensa deposição de cálcio extracelular corado com o *Alizarin Red*. Já as amostras induzidas à diferenciação para a linhagem adipogênica foram positivas apresentando gotículas lipídicas dentro do citoplasma celular quando coradas com o *Oil Red*.