

ANA RAQUEL PEREIRA ABREU MARQUES

**TERAPIA COM CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS
DO TECIDO ADIPOSEO EM CÃES COM SEQUELAS
NEUROLÓGICAS DA ESGANA**

Orientador: Prof. Doutor João Filipe Requicha

Coorientador: Prof. Doutor Daniel de Moura Murta

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2016**

ANA RAQUEL PEREIRA ABREU MARQUES

**TERAPIA COM CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS
DO TECIDO ADIPOSEO EM CÃES COM SEQUELAS
NEUROLÓGICAS DA ESGANA**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado
Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Constituição do júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Faísca

Arguente: Prof. Doutor Pedro Carvalho

Orientador: Prof. Doutor João Filipe Requicha

Coorientador: Prof. Doutor Daniel de Moura Murta

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016

A única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.

(Steve Jobs)

A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.

(Mahatma Gandhi)

Dedico esta Dissertação aos meus queridos pais por todo o amor e apoio incondicional durante esta deslumbrante jornada.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Diretora, Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Doutor João Filipe Requicha, por ter sido extremamente profissional, prestável e interessado no tema da minha Dissertação. Não poderia ter sido melhor premiada com um Professor tão competente e perfeccionista. Muito obrigada por todo o apoio.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Daniel de Moura Murta, pela entejuda e prontidão em esclarecer dúvidas que surgiram durante a fase de escrita desta Dissertação.

Quero agradecer do fundo do coração aos meus pais, Rui e Teresa, pela oportunidade de ter feito um intercâmbio no Brasil, o que me permitiu realizar este trabalho. Além disso, quero agradecer por todo o suporte, apoio, amor e confiança que sempre me transmitiram. Sem eles, este sonho não teria sido possível!

Aos meus 2 irmãos, Duarte e Carlota, por todo o carinho e incentivo. Vocês são os melhores, muito obrigada!

Ao meu companheiro de todas as horas, Gabriel, com quem partilhei todas as palavras, vírgulas e pontos finais desta Dissertação. Quero deixar o meu agradecimento especial para aquele que me ofereceu o seu ombro nos momentos de angústia e insegurança. Obrigada por toda a força natural com a qual me presenteaste e por todo o teu amor genuíno!

À Prof.^a Michele Andrade de Barros e a toda a equipa do laboratório *Regenera Stem Cells*, em Campinas, por gentilmente me terem disponibilizado os casos clínicos e por me apresentarem a esta belíssima área da Medicina Veterinária.

À minha supervisora no local de estágio, Prof.^a Doutora Aline Emerim Pinna, por me ter mostrado os melhores caminhos e hospitais veterinários do Rio de Janeiro para estagiar e, conseqüentemente, evoluir profissionalmente.

A todos os Professores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e da Universidade Federal Fluminense (Niterói, Rio de Janeiro) por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Às minhas queridas amigas, Marta Pereira, Inês Neto, Inês Magalhães, Patrícia Xavier e Bruna Cerdeira por todo o apoio, encorajamento e amizade verdadeira que nos une, mesmo eu estando a milhares de quilómetros de distância.

A todos os colegas da Medicina Veterinária que tive o prazer de conhecer, tanto em Lisboa, como em Niterói. Obrigada por todas as experiências vivenciadas.

E, por último, mas não menos importante, a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de um sonho tão desejado!

RESUMO

A esgana canina é uma doença cosmopolita e enzoótica causada por um vírus da família *Paramixoviridae* e do género *Morbillivirus*. Não existem, atualmente, medicamentos antivirais específicos no combate ao vírus da esgana, pelo que o seu tratamento é apenas sintomático. Esta doença provoca, frequentemente, sequelas neurológicas decorrentes de um processo de apoptose e desmielinização dos oligodendrócitos, astrócitos e neurónios.

As células estaminais são células com capacidade de diferenciação, autorrenovação e proliferação. De entre estas, distinguem-se as de origem mesenquimatosa que podem diferenciar-se em células de linhagem mesodérmica e precursoras de tecido conjuntivo. As células estaminais mesenquimatosas podem ser obtidas a partir do tecido adiposo, permitem a regeneração de tecidos lesados, têm capacidade imunomoduladora e, por este motivo, têm interesse terapêutico.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial das células estaminais derivadas do tecido adiposo no tratamento de sequelas neurológicas da esgana.

Este trabalho foi realizado durante o período entre janeiro e junho de 2015, numa população constituída por 7 cães com sequelas neurológicas da esgana e submetidos a terapia celular em Campinas (Brasil). As células estaminais mesenquimatosas foram obtidas no laboratório da *Regenera Stem Cells* a partir do tecido adiposo de cães dadores jovens e saudáveis. A terapia celular consistiu na administração destas células a cada 30 dias, por via intravenosa, perfazendo na maioria dos casos clínicos estudados, um total de 3 aplicações.

Os 7 cães estudados eram de idades e raças distintas, sendo que 4 eram machos e 3 eram fêmeas. As sequelas observadas com maior frequência foram alteração da locomoção, mioclonias, convulsões e ataxia vestibular. No final da terapia celular, 3 animais apresentavam ausência total das sequelas previamente observadas, tendo recuperado completamente. Nos restantes 4 animais verificou-se uma recuperação parcial. As mioclonias, a ataxia cerebelar e a ataxia vestibular foram consideradas as sequelas neurológicas com menor possibilidade de recuperação, ou seja, com pior prognóstico.

Os resultados obtidos apontam a terapia celular como uma opção promissora no tratamento ou na melhoria da qualidade de vida de animais com sequelas da esgana.

Palavras-chave: esgana, sequelas neurológicas, terapia celular, células estaminais derivadas do tecido adiposo, cães.

ABSTRACT

Canine distemper is a cosmopolitan and enzootic disease caused by a virus of the family *Paramyxoviridae* and genre *Morbillivirus*. Currently, there are not specific antiviral drugs to combat the distemper virus, and therefore its treatment is only symptomatic. Frequently, this disease causes neurological sequelae resulting from a process of apoptosis and demyelination of oligodendrocytes, astrocytes and neurons.

Stem cells have capacity for differentiation, self-renewal and proliferation. Among these, those with mesenchymal origin are distinguished and can be distinguished into mesodermal lineage cells and connective tissue precursor. The mesenchymal stem cells can be obtained from adipose tissue, allow the regeneration of damaged tissues, have immunomodulatory capacity and, for this reason, they have therapeutic interest.

This study aimed to evaluate the potential of stem cells derived from adipose tissue in the treatment of distemper neurological sequelae.

This work was carried out between January and June 2015, in a population composed by seven dogs with distemper neurological sequelae and submitted to cell therapy in Campinas (Brazil). The mesenchymal stem cells were obtained in the laboratory of *Regenera Stem Cells* from adipose tissue of young and healthy donors dogs. The cell therapy consisted in the intravenous administration of these cells, every thirty days, meaning a total of three applications in most of the studied clinical cases.

From the seven studied dogs with different ages and races, four were males and three were females. The most frequently observed sequels were locomotion changes, myoclonus, seizures and vestibular ataxia. At the end of cell therapy, three animals didn't show any of the sequelae previously observed, having completely recovered. The remaining four animals partially recovered. The myoclonus, cerebellar ataxia and vestibular ataxia were considered the neurological sequelae with lower chance of recovery, that is, with worse prognosis.

The obtained results show cell therapy as a promising option for the treatment or improvement of the quality of animals' life with distemper sequelae.

Keywords: distemper, neurological sequelae, cell therapy, adipose-derived stem cells, dogs.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

°C – Graus Celsius

ASCs – Células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo (do Inglês: *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês: *Deoxyribonucleic Acid*)

ESCs – Células estaminais embrionárias (do Inglês: *Embryonic Stem Cells*)

kg – Quilograma

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetro

MSCs – Células estaminais mesenquimatosas (do Inglês: *Mesenchymal Stem Cells*)

nm – Nanómetro

RNA – Ácido ribonucleico (do Inglês: *Ribonucleic Acid*)

RSC – *Regenera Stem Cells*

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (do Inglês: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

SCs – Células estaminais (do Inglês: *Stem Cells*)

SNC – Sistema nervoso central

SRD – Sem raça definida

SSCs – Células estaminais somáticas (do Inglês: *Somatic Stem Cells*)

VE – Vírus da esgana

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS.....	7
ÍNDICE GERAL.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. ESGANA CANINA.....	13
1.1.1. Etiologia.....	13
1.1.2. Epidemiologia.....	14
1.1.3. Patogenia.....	15
1.1.4. Sinais clínicos.....	17
1.1.5. Exames complementares de diagnóstico.....	20
1.1.5.1. Técnica da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa.....	21
1.1.6. Tratamento convencional.....	21
1.1.7. Prevenção.....	24
1.2. CÉLULAS ESTAMINAIS.....	25
1.2.1. Tipos de células estaminais.....	26
1.2.2. Células estaminais somáticas ou adultas.....	28
1.2.3. Células estaminais mesenquimatosas.....	31
1.2.4. Células estaminais derivadas do tecido adiposo.....	34
1.3. TERAPIA CELULAR EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	35
1.3.1. Aplicações clínicas das células estaminais mesenquimatosas.....	36
1.3.2. Terapia celular em cães com sequelas neurológicas da esgana.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1. OBJETIVOS.....	40
2.2. POPULAÇÃO ESTUDADA.....	40
2.3. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO.....	40
2.4. RECOLHA DE DADOS CLÍNICOS ANTES DA TERAPIA.....	41

2.5. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DO	
TECIDO ADIPOSEO.....	42
2.6. PROTOCOLO DE TERAPIA CELULAR.....	43
2.7. MONITORIZAÇÃO DA TERAPIA CELULAR.....	44
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
3. RESULTADOS.....	46
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	46
3.2. DESCRIÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	51
4. DISCUSSÃO.....	60
5. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS.....	I
ANEXO I – FICHA DE RECOLHA DE DADOS.....	II

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das características dos 7 animais estudados.....	46
Tabela 2 – Informação dos 7 animais estudados em relação ao tempo de sequela neurológica, realização de terapias complementares e número de aplicações de ASCs	48
Tabela 3 – Resumo da evolução clínica do animal 1.....	51
Tabela 4 – Resumo da evolução clínica do animal 2.....	52
Tabela 5 – Resumo da evolução clínica do animal 3.....	53
Tabela 6 – Resumo da evolução clínica do animal 4.....	54
Tabela 7 – Resumo da evolução clínica do animal 5.....	55
Tabela 8 – Resumo da evolução clínica do animal 6.....	55
Tabela 9 – Resumo da evolução clínica do animal 7.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Progressão da infecção sistêmica para a infecção nervosa na esgana canina.....	15
Figura 2 – Cão com secreção nasal mucopurulenta causada pela esgana.....	18
Figura 3 – Cão de raça Pitbull com hiperqueratose nasal e nas almofadas plantares	18
Figura 4 – Cão com dermatopatia provocada pela esgana. Observa-se alopecia na região da cabeça e membros.....	18
Figura 5 – Fotomicrografia de citologia sanguínea corada com hematoxilina e eosina, demonstrando os corpúsculos de Lentz intracitoplasmáticos, indicados pelas setas, em leucócitos de um cão com 10 dias de idade.....	20
Figura 6 – Processos de divisão celular das SCs.....	27
Figura 7 – Diagrama da obtenção das SSCs a partir da medula óssea e a capacidade de diferenciação em diversos tecidos.....	29
Figura 8 – Funções naturais das MSCs na medula óssea.....	32
Figura 9 – Riscos potenciais associados com o transplante de MSCs.....	38
Figura 10 – Laboratório da empresa responsável pela terapia celular regenerativa.....	42
Figuras 11 – Procedimento de preparação das ASCs para posterior administração intravenosa no animal pelo Médico Veterinário.....	44
Figura 12 – Distribuição da população em estudo em relação ao sexo (frequência absoluta)....	46
Figura 13 – Distribuição etária dos cães incluídos no estudo.....	47
Figura 14 – Distribuição racial dos cães incluídos no estudo (frequência absoluta).....	47
Figura 15 – Distribuição da população em estudo em relação ao tipo de vacina utilizada (frequência absoluta).....	48

Figura 16 – Distribuição do tempo de sequela neurológica dos cães incluídos no estudo.....	49
Figura 17 – Distribuição dos cães incluídos no estudo que realizaram ou não as terapias complementares (frequência absoluta).....	49
Figura 18 – Distribuição dos cães incluídos no estudo que revelaram melhora ou não do quadro clínico após a realização das terapias complementares (frequência absoluta).....	50
Figura 19 – Distribuição do número de aplicações de ASCs dos cães incluídos no estudo (frequência absoluta).....	50
Figura 20 – Distribuição da população em estudo em relação às sequelas neurológicas mais, frequentemente, observadas antes e durante a terapia celular (frequência absoluta).....	57
Figura 21 – Distribuição da população em estudo em relação à recuperação dos animais (frequência absoluta).....	57
Figura 22 – Distribuição da população em estudo em relação à permanência de determinadas sequelas neurológicas após o término da terapia celular (frequência absoluta).....	58
Figura 23 – Distribuição da população em estudo em relação ao tempo de sequela neurológica e à recuperação.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESGANA CANINA

A esgana é uma doença infectocontagiosa que afeta não só cães domésticos e selvagens, mas também gatos, mustelídeos e procionídeos (Corrêa & Corrêa, 1992; Quinn *et al.*, 2005; Bichard & Sherding, 2008).

A esgana canina é uma doença multissistêmica que atinge diferentes regiões do sistema nervoso, podendo apresentar-se sob a forma aguda, subaguda e crônica, progredindo para encefalite na ausência de tratamento (Corrêa & Corrêa, 1992; Hoskins, 2004; Orsini & Bondan, 2008; Fernández & Bernardini, 2010).

1.1.1. Etiologia

O agente responsável pela esgana é um vírus RNA de grandes dimensões, da família *Paramyxoviridae* e do género *Morbillivirus* (Lappin, 1997; Willoughby & Dawson, 2001; Fenner, 2004; Gebara *et al.*, 2004a,b). Este vírus tem simetria helicoidal (hélice simples), pleomorfismo e um diâmetro de 150 a 250 nm (Corrêa & Corrêa, 1992; Nascimento, 2009). O envelope do vírus da esgana (VE) não contém hemoaglutininas nem neuraminidase. Trata-se de um vírus relativamente lábil e instável no ambiente, pois é sensível a desinfetantes, como o éter e detergentes, bem como a solventes lipídicos. Ele é instável a pH ácidos (inferiores a 4,5) e é totalmente inativado pelo calor em uma hora a 55°C e em 30 minutos a 60°C. Em climas quentes, como por exemplo no Brasil, o vírus não sobrevive nos canis após os cães afetados terem sido retirados. Em contrapartida, persiste viável durante várias semanas a uma temperatura entre 0 e 4°C, e a -76°C ou liofilizado durante, sensivelmente, 7 anos (Corrêa & Corrêa, 1992; Hoskins, 2004).

O VE produz proteínas que entram na membrana das células infetadas, o que faz com que estas células se tornem suscetíveis ao ataque do sistema imunitário (Willoughby & Dawson, 2001; Hoskins, 2004; Litfalla *et al.*, 2008).

O vírus é transmitido por inalação, contacto direto com fluidos corporais, incluindo urina, e também mais raramente por via placentária até 60 a 90 dias após a infeção. Assim, a disseminação ocorre entre cães que são mantidos em grupos e em locais mal ventilados (Willoughby & Dawson, 2001; Hoskins, 2004; Litfalla *et al.*, 2008).

A desinfecção de centros veterinários e canis com recurso a formol a 0,5%, fenol a 0,75%, ou amónia quaternária a 0,3% é considerada efetiva (Corrêa & Corrêa, 1992; Hoskins, 2004).

1.1.2. Epidemiologia

O VE apresenta uma distribuição enzoótica mundial. A infeção dissemina-se muito rapidamente entre cães, sendo que os não imunizados de qualquer idade, sexo ou raça são os mais suscetíveis. No entanto, a esgana é mais comum em cães entre os 3 e os 6 meses de idade, uma vez que, provavelmente, já não possuem a imunidade passiva conferida pelo colostro materno (Nelson & Couto, 2006; Hartman *et al.*, 2007; Bichard & Sherding, 2008; Del Puerto *et al.*, 2010).

Em contrapartida, Shell (1990) e Sherding (1998) discordam sobre o período de ocorrência da doença nos animais mais jovens e afirmam que a incidência é mais comum entre as 6 e as 12 semanas de idade (Shell, 1990; Sherding, 1998).

Da mesma forma, podem ser afetados cães de até 2 anos de idade e tal não está relacionado com nenhum fator predisponente, mas sim ao facto de o vírus estar amplamente difundido na natureza. Todavia, existem casos de animais com 7 a 9 anos que adquirem a doença, devido à diminuição da imunidade ou por nunca terem tido contacto com o vírus (Corrêa & Corrêa, 1992; Lappin, 1997; Del Puerto *et al.*, 2010).

O cão representa o principal reservatório do VE, servindo até mesmo, como fonte de infeção para os animais selvagens (Greene & Appel, 2006; Silva *et al.*, 2009).

O VE é considerado um importante agente patogénico devido à sua elevada taxa de mortalidade que varia entre 25 a 75% (Corrêa & Corrêa, 1992; Gebara *et al.*, 2004b; Hoskins, 2004; Nascimento, 2009).

As infeções bacterianas secundárias decorrentes da imunossupressão pelo VE, em geral, são responsáveis pelos sinais clínicos da esgana aguda. A ocorrência de toxoplasmose, neosporose, coccidiose, enterite viral, criptosporidiose e giardiose pode ser intensificada pelos efeitos imunossupressores da esgana (Hoskins, 2004).

1.1.3. Patogenia

No primeiro dia pós-infecção as células afetadas são os macrófagos do trato respiratório alto e das amígdalas. No segundo e terceiro dias pós-infecção, o vírus inicia a fase de viremia e é encontrado nas células mononucleares do sangue. Do terceiro ao sexto dia pós-infecção, ocorre o primeiro pico febril e o vírus replica-se no sistema linfóide de todo o organismo, como na medula óssea, no timo, no baço, nos linfonodos e nas placas de Peyer (Corrêa & Corrêa, 1992; Quinn *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007).

Esta fase de replicação no sistema linfóide é marcada pela imunossupressão. Nesta fase, os cães capazes de realizar uma resposta imunitária rápida e efetiva conseguem eliminar o vírus e recuperar sem manifestar sinais clínicos. Esta fase representa a denominada infecção subclínica e ocorre em 50% dos casos. Por outro lado, os animais que apresentam uma resposta imunitária fraca permitem a disseminação do vírus para os tecidos epiteliais (trato respiratório e gastrointestinal) e, posteriormente, para o sistema nervoso central (SNC) (Quinn *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007; Bichard & Sherding, 2008).

Após o nono dia, ocorre a disseminação do vírus para os epitélios das mucosas conjuntival e nasal, epitélios traqueal e bronquial, trato urinário e reprodutor. Num período de 3 dias ou a seguir, o vírus também alcança o SNC (Figura 1), distribuindo-se nas grandes células mononucleares da pia-máter e do cerebelo, nas células gliais (oligodendrócitos e astrócitos), nas células de Purkinje, nos neurónios do córtex cerebral, no gânglio basal e no hipocampo (Corrêa & Corrêa, 1992; Lappin, 1997).

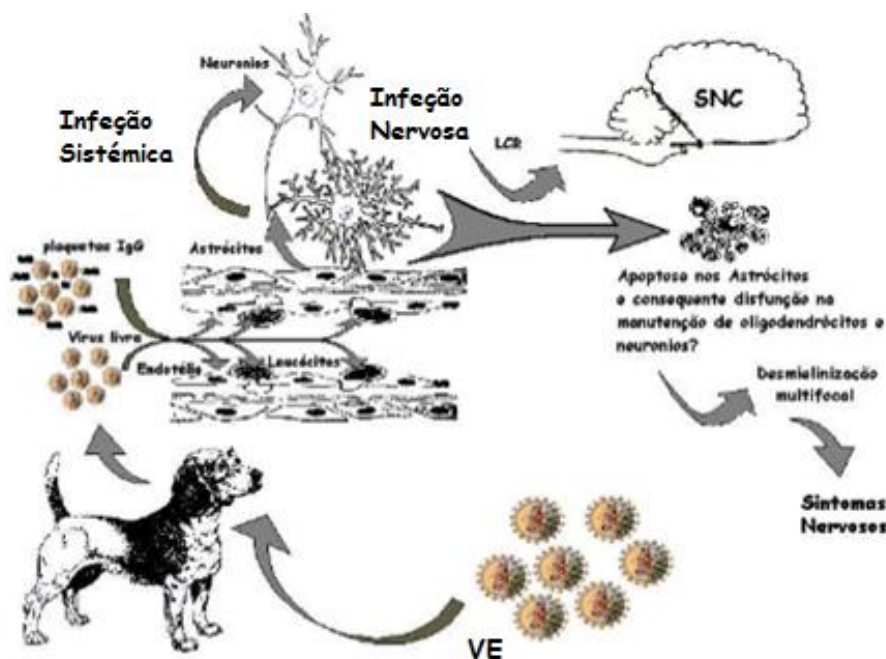


Figura 1 – Progressão da infecção sistêmica para a infecção nervosa na esgana canina (Adaptado de Moro *et al.*, 2004).

Se os vírus alcançarem em pequenas quantidades as células epiteliais, tais como as epidérmicas ou os neurónios, antes que os níveis de anticorpos estejam altos, estes vírus podem persistir nestas células, a menos que as mesmas sejam destruídas. Esta permanência explica a encefalite tardia, onde o vírus está restrito aos neurónios e às células das almofadas plantares (Corrêa & Corrêa, 1992; Lappin, 1997; Jones *et al.*, 2000).

Aparentemente, as estirpes virais que induzem a doença de curso agudo e fatal localizam-se na substância cinzenta e determinam a destruição neuronal, resultando em encefalomalácia, e as que induzem doença crónica ocasionam lesões que tendem a localizar-se na substância branca, promovendo a desmielinização. Estudos sobre a patogenia da infeção pelo VE no SNC revelaram 2 estágios de desenvolvimento da desmielinização: um agudo e outro crónico. A desmielinização inicial ocorre em torno da terceira semana após a infeção e não tem a participação da resposta imunitária inflamatória, presente no estágio crónico da infeção (Shell, 1990; Jones *et al.*, 2000).

A desmielinização é resultante de diversos fatores, como por exemplo: intoxicações, desordens metabólicas e funcionais, infeções, lesões mecânicas e inflamações. No entanto, a causa da destruição da mielina pode ser primária, quando ocorre uma lesão direta sobre a mielina ou sobre as células mielinogénicas, ou secundária quando a lesão alcança os axónios e ocorre, consequentemente, degeneração da mielina (Orsini & Bondan, 2008).

Estudos demonstraram que não foram identificados indícios de replicação viral nos oligodendrócitos, o que exclui a possibilidade da desmielinização ser causada pela ação do VE. A agressão neuronal pelo VE parece ser muito pequena para provocar perdas massivas de mielina. Sendo assim, esta situação pode ser atribuída, segundo algumas descobertas, a determinadas células inflamatórias. Contudo, estas células só estariam presentes em fases crónicas das doenças desmielinizantes. Por este motivo, a desmielinização aguda, provavelmente, está relacionada à ação de outros tipos celulares, como é o caso da micróglia e dos astrócitos (Orsini *et al.*, 2007; Uccelli *et al.*, 2011).

Assim sendo, foi observado que todos os animais doentes apresentaram degeneração, a qual variou de intensidade e extensão, de acordo com a avaliação histológica. Além disso, as áreas de degeneração foram maiores em regiões constituídas por substância branca e regiões circunventriculares do cerebelo e do tronco encefálico. Em adição, a presença de células inflamatórias também se mostrou muito acentuada (Orsini *et al.*, 2007).

Em suma, os autores acabaram por concluir que a reatividade astrocitária pode estar relacionada com o desencadeamento do processo de desmielinização (Orsini *et al.*, 2007).

A encefalomielite dos cães jovens, de caráter grave e agudo, é a forma mais comum da infecção pelo VE. Habitualmente, ela é precedida ou concomitante com a sintomatologia sistêmica. A encefalite pós-vacinal ocorre em cães jovens e está associada ao uso de vacinas com vírus vivos atenuados. A encefalite do cão idoso, prevalente em animais com mais de 6 anos de idade, está associada de forma aparente à persistência prolongada do vírus no cérebro (Lappin, 1997; Quinn *et al.*, 2005).

Para além das anteriores, a encefalomielite multifocal dos cães adultos e a encefalomielite crônica recidivante são outras síndromes clínicas associadas à infecção pelo VE (Gebara *et al.*, 2004b; Amude *et al.*, 2006a,b; Silva *et al.*, 2007).

Após a ocorrência da doença, há uma tendência para ocorrer imunidade permanente contra o VE. O desenvolvimento e a gravidade da doença dependem, especialmente, do estado imunológico do animal, da idade dos cães e da virulência da estirpe infectante (Lappin, 1997; Gebara *et al.*, 2004a,b; Fernández & Bernardini, 2010).

1.1.4. Sinais clínicos

Os sinais sistêmicos da doença são frequentes e, normalmente, precedem ou ocorrem simultaneamente com os sinais neurológicos (Greene & Appel, 2006; Silva *et al.*, 2007).

A forma subaguda da esgana não é comum, porém é caracterizada por febre repentina e morte súbita em 2 ou 3 dias. O período de incubação varia de 3 a 7 dias. Os cães infectados desenvolvem 2 picos febris. O primeiro ocorre entre o segundo e o sexto dia pós-infecção, onde surge leucopenia com ou sem linfopenia. O segundo pico febril ocorre entre o oitavo e o nono dia, onde a temperatura corporal interna pode atingir os 41°C. Na fase aguda da esgana é comum o animal manifestar prostração, letargia, anorexia, conjuntivite e depressão (Lappin, 1997; Nelson & Couto, 2006; Fernández & Bernardini, 2010).

Os principais sinais epiteliais característicos da fase de viremia são os seguintes: corrimento naso-ocular seroso a mucopurulento causado por queratoconjuntivite seca e rinite (Figura 2), tosse seca ou produtiva, dispneia, estertores pulmonares (inicialmente, ocorre uma pneumonia intersticial como consequência do efeito viral e, posteriormente, manifesta-se uma broncopneumonia derivada de uma infecção bacteriana secundária), desidratação, vômito, diarreia eventualmente sanguinolenta, perda de peso, lesões oftalmológicas (uveíte, neurite ótica e necrose da retina) e cegueira (Hoskins, 2004; Quinn *et al.*, 2005; Nelson & Couto, 2006).



Figura 2 – Cão com secreção nasal mucopurulenta causada pela esgana (Fonte original de Nascimento, 2009).

A forma de almofadas plantares fibrosadas (hiperqueratose visível na Figura 3) costuma ser progressiva, como referido anteriormente. De igual forma, é comum a alopecia ao redor dos olhos com formação de crostas, dando o aspeto de óculos (Figura 4). Podem, ainda, ocorrer exantemas cutâneos que progridem até à formação de pústulas, nomeadamente, no abdómen (Corrêa & Corrêa, 1992; Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006).



Figura 3 – Cão, macho, de raça Pitbull com hiperqueratose nasal (A) e nas almofadas plantares (B) (Adaptado de Pet Care Centro Veterinário, 2012).



Figura 4 – Cão com dermatopatia provocada pela esgana. Observa-se alopecia na região da cabeça e membros (Fonte original de Nascimento, 2009).

Num estudo realizado em 3 cães com encefalomielite, observou-se que um dos cães manifestou síndrome cerebral, agressividade, andar compulsivo e em círculos, compressão da cabeça e hipercinesia, e 2 animais apresentaram síndrome vestibular e cerebelar, com ataxia, dismetria, hipermetria, tremor de intenção, nistagmo posicional vertical, mioclonias nos membros pélvicos e nos músculos mastigatórios, e tetraparésia (Amude *et al.*, 2006b).

As mioclonias já foram consideradas patognomônicas da infecção pelo VE, contudo, elas também foram relatadas noutras desordens inflamatórias do SNC, embora ocorram com menos frequência (Corrêa & Corrêa, 1992; Silva *et al.*, 2007).

Para além dos sinais neurológicos descritos, podem ocorrer convulsões, inclinação da cabeça ou *head tilt*, movimentos de pedalagem, rigidez cervical, vocalização por dor, défices proprioceptivos, ausência de dor profunda, atrofia muscular, automutilação, perda de equilíbrio, incapacidade de adotar a posição de esfinge, incontinência urinária e fecal, priapismo e hipersíaliva. Os cães que sobrevivem a esta fase, geralmente, apresentam sequelas e podem desenvolver mais tarde a encefalite do cão idoso (Shell, 1990; Swango, 1997).

Caso a fêmea esteja grávida, pode ocorrer infecção transplacentária e neonatal. Na infecção transplacentária, os cães desenvolvem sinais neurológicos durante as 4 a 6 primeiras semanas de vida, e dependendo do estágio da gestação em que ocorrer a infecção, podem acontecer abortos e natimortos ou nascerem neonatos vivos, mas muito fracos (Lappin, 1997; Willoughby & Dawson, 2001).

Na infecção neonatal podem ocorrer as seguintes alterações: hipoplasia do esmalte dentário (coloração acastanhada), devido à ação direta do vírus sobre as células da membrana ameloblástica; lesões cardíacas, representadas por degenerações das células do miocárdio, com necroses e calcificações multifocais; lesões do nervo ótico, que podem resultar em pupilas dilatadas e não responsivas a estímulos luminosos; lesões crónicas circunscritas, hiperreflexivas e atróficas na região fúndica retiniana, designadas de medalhões dourados; e osteopatia metafisária, visto que o RNA do vírus foi detetado nas células ósseas metafisárias (Willoughby & Dawson, 2001; Hoskins, 2004; Nelson & Couto, 2006).

O decurso da doença pode ser até 10 dias ou prolongar-se por semanas ou meses, podendo haver períodos intermediários seguidos por recidivas. Frequentemente, quando a recuperação parece iminente, surgem sequelas neurológicas permanentes (Quinn *et al.*, 2005; Fernández & Bernardini, 2010).

1.1.5. Exames complementares de diagnóstico

Devido às várias manifestações da esgana, o diagnóstico fundamentado nos sinais clínicos promove uma certa confusão e dificuldade para o Médico Veterinário (Jones *et al.*, 2000; Hoskins, 2004; Silva *et al.*, 2007; Fernández & Bernardini, 2010).

No hemograma é possível verificar-se nos primeiros 4 a 6 dias leucopenia, e depois que a doença já está instalada, constatar-se linfopenia grave e persistente, monocitose e discreta neutrofilia (Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006; Fernández & Bernardini, 2010).

As inclusões intracitoplasmáticas podem ser observadas em linfócitos, eritrócitos e monócitos (Figura 5). A bioquímica sérica não é específica. No entanto, em cachorros infectados por via transplacentária, é descrita uma hipoglobulinemia (Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006; Fernández & Bernardini, 2010).

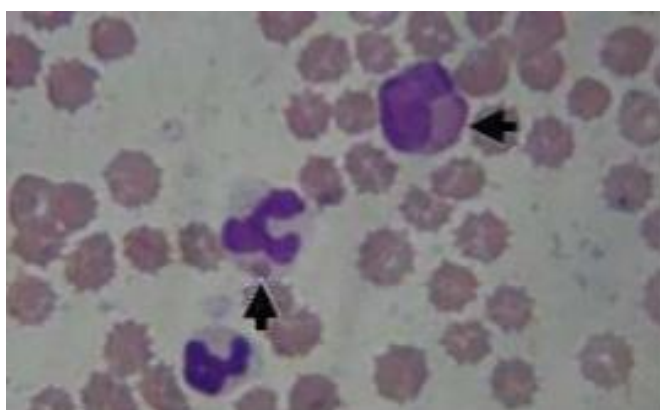


Figura 5 – Fotomicrografia de citologia sanguínea corada com hematoxilina e eosina, demonstrando os corpúsculos de Lentz intracitoplasmáticos, indicados pelas setas, em leucócitos de um cão com 10 dias de idade (aumento de 100x) (Fonte original de Noleto *et al.*, 2011).

No eletroencefalograma, alterações que indiquem encefalopatia difusa e inflamatória são sugestivas de esgana. No exame radiográfico podem ser observadas alterações no padrão intersticial e alveolar nos casos de pneumonia bacteriana (Willoughby & Dawson, 2001; Fernández & Bernardini, 2010).

A neurite ótica, coriorretinite e descolamento da retina podem ser detetadas ao exame oftalmológico (Nelson & Couto, 2006).

1.1.5.1. Técnica da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

A técnica da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) consiste na utilização de uma enzima especial, a transcriptase reversa, que consegue produzir uma molécula de DNA complementar (cDNA) a partir de uma molécula de RNA. No caso da esgana, este exame tem o intuito de descobrir se um gene, o RNA do VE, está a ser transcrito num determinado tecido ou célula (Gebara *et al.*, 2004a; do Amaral, 2007).

A deteção do RNA do VE pela técnica de RT-PCR é utilizada devido à sua rapidez e à não exigência da infeciosidade da partícula viral. Para além disso, os elevados níveis de sensibilidade e especificidade fazem desta técnica um dos meios de diagnóstico de eleição (Gebara *et al.*, 2004a; Nascimento, 2009; Del Puerto *et al.*, 2010; Fernández & Bernardini, 2010).

Apesar da elevada sensibilidade do teste, a ausência de deteção pode ocorrer em diferentes amostras biológicas de um mesmo animal, sendo que a possibilidade de obtenção de resultados positivos aumenta com o acréscimo do número de colheitas de diferentes amostras biológicas. Deste modo, são indicadas duas ou mais diferentes amostras biológicas por animal, independentemente, da forma clínica de apresentação da esgana (do Amaral, 2007).

O procedimento requer diferentes tipos de amostras biológicas, tais como sangue, soro, secreções ocular e nasal, saliva, líquido cefalorraquidiano, urina e fragmentos de órgãos, provenientes de cães com sinais clínicos sistémicos e neurológicos (Shin *et al.*, 1995; Frisk *et al.*, 1999; Nascimento, 2009; Del Puerto *et al.*, 2010).

Recentemente, observou-se que a urina é uma amostra biológica sensível para a deteção *ante mortem* do VE por RT-PCR em cães com encefalomielite derivada da esgana. Em contrapartida, a saliva revelou-se uma amostra biológica pouco sensível (Amude *et al.*, 2006a; do Amaral, 2007).

1.1.6. Tratamento convencional

Não existem medicamentos antivirais direcionados, especificamente, para o tratamento do VE. Por este motivo, a terapêutica é direcionada de acordo com os sinais clínicos que o animal apresenta (Swango, 1997; Willoughby & Dawson, 2001; Hoskins, 2004; Nelson & Couto, 2006).

O tratamento sintomático inclui o uso de antibióticos de largo espectro para o controle de infecções secundárias. Por forma a minimizar uma pneumonia já existente ou para impedir o seu desenvolvimento, é recomendado o uso de fármacos eficazes contra *Bordetella bronchiseptica*, estafilococos e estreptococos, como o cloranfenicol (20 mg/kg) ou a oxitetraciclina (20 mg/kg), 3 vezes ao dia, durante 5 a 10 dias (Corrêa & Corrêa, 1992; Lappin, 1997; Hoskins, 2004; Fernández & Bernardini, 2010).

Nos casos de diarreia grave, recomenda-se a administração de antidiarreicos complexos que contenham pectina, caolino ou outro adsorvente, e de preferência um antiperistáltico, como o butilbrometo de escopolamina ou a difenidramida (Corrêa & Corrêa, 1992).

A hidratação e o restabelecimento do equilíbrio eletrolítico deve ser realizada com a administração intravenosa de soluções cristaloides isotónicas como lactato de Ringer, suplementado com glicose a 2,5 ou 5% nos animais com inapetência e anorexia (Corrêa & Corrêa, 1992; Hoskins, 2004).

A nutrição do animal é muito importante, sendo em determinados casos, necessário realizar alimentação através de sondas nasogástricas. No decorrer da alimentação forçada, o Médico Veterinário deve procurar administrar alimentos facilmente digestíveis (Corrêa & Corrêa, 1992; Swango, 1997).

A deficiência em proteínas e vitaminas do complexo B conduzem à diminuição da massa corporal e dos valores séricos de albumina (Corrêa & Corrêa, 1992; Nelson & Couto, 2006), pelo que devem ser compensadas.

Outras medidas terapêuticas apropriadas podem ser indicadas ou executadas, conforme cada caso clínico, nomeadamente os antipiréticos; a vitamina A para proteção e regeneração dos epitélios; o ácido ascórbico (vitamina C) como fator trófico dos tecidos mesenquimatosos e da hematopoiese; as vitaminas do complexo B, de entre elas a B₁ e a B₁₂, envolvidas na regeneração nervosa e como antiálgicas e mielopoiéticas, respetivamente; os colírios à base de antibióticos e as soluções nasais (Corrêa & Corrêa, 1992; Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006).

A aplicação de imunossoro específico, com o objetivo de obter a soroneutralização de todas as partículas virais livres, deve ser realizada uma única vez, na dose de 2 a 4 ml/kg, em diversas regiões do corpo do animal, por via intramuscular, ou em ambos os lados do tórax, por via subcutânea. O soro homólogo permanece ativo no animal durante 15 a 30 dias, baixando a sua concentração paulatinamente, seja por soroneutralização formando complexos antígeno-anticorpo com as partículas virais, seja por metabolização e eliminação progressiva (Corrêa & Corrêa, 1992).

Em 1979, Appel e Carmichael comentaram a aplicação intravenosa da vacina atenuada como tratamento, pois consideravam que estes vírus protegiam as células contra estirpes virais mais virulentas e induziam a produção de interferão e anticorpos neutralizantes (Appel & Carmichael, 1979). Entretanto, os mesmos admitiram que os animais com sinais clínicos estão imunossuprimidos e a viremia já está estabelecida. Estas vacinas protegem o animal quando são realizadas 4 dias antes da exposição ao vírus, mas não depois que aparecem os sinais, pois nesta fase o vírus já está presente na corrente sanguínea há pelo menos uma semana (Corrêa & Corrêa, 1992; Swango, 1997).

Os anticonvulsivos, como por exemplo o fenobarbital e o brometo de potássio, são utilizados na terapia quando, estritamente necessários, ou seja, quando o animal apresenta quadros de convulsão, visto que esta classe de fármacos não atua no tratamento das mioclonias (Lappin, 1997; Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006; Spinosa *et al.*, 2011).

Em determinados casos, quando o animal apresenta alterações no SNC, é necessário o uso de glucocorticoides, no entanto, a sua utilização não é recomendada enquanto o animal estiver com infecção aguda. Por este motivo, alguns autores consideram a sua administração controversa (Lappin, 1997; Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006).

Os glucocorticoides, tal como a dexametasona, em doses anti-inflamatórias, por via intravenosa, podem ser utilizados devido à imunopatologia das lesões neuronais e com o intuito de reduzir o edema cerebral. Todavia, apresentam como desvantagem a possibilidade de indução de imunossupressão, comprometendo a resposta inflamatória responsável pelo combate ao vírus. A terapia com glucocorticoides, como a prednisolona, pode ser efetiva nos casos de dilatação pupilar decorrente da neurite ótica ou em alguns sinais associados à inflamação crônica do encéfalo (Lappin, 1997; Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006; Mangia & Paes, 2008).

Embora ainda não existam antivirais específicos para o combate ao VE, existem algumas opções de antivirais, tais como a ribavirina e a amantadina, usados no tratamento convencional da esgana. A ribavirina é um análogo do nucleosídeo de purina, com um largo espectro de atividade tanto contra vírus DNA como de RNA. Ela possui a capacidade de combater diversos vírus, inclusive o vírus do sarampo (morbilivírus), que tem relação antigénica com o VE (Graci & Cameron, 2006; Elia *et al.*, 2008). Por outro lado, a amantadina é uma amina primária tricíclica classificada como antiviral, sendo que o seu uso é descrito em humanos para o tratamento do vírus da influenza A. A sua ação pode estar relacionada com a inibição de estágios iniciais da replicação viral (Cardoso, 1995; Spinoso *et al.*, 2011).

Quando o cão apresenta sinais de comprometimento nervoso, a terapêutica convencional revela-se muitas vezes ineficaz. Em animais de grande estima, se os tremores ainda estiverem bem localizados, é possível tentar controlar a evolução, aplicando imunossoro numa única dose de 4 a 6 ml/kg, por via intramuscular, e um complexo vitamínico B₁-B₆-B₁₂, uma vez por semana, durante 4 a 8 semanas consecutivas (Corrêa & Corrêa, 1992; Willoughby & Dawson, 2001; Nelson & Couto, 2006).

A esgana na forma neurológica apresenta uma elevada morbidade e mortalidade, motivo pelo qual o prognóstico é sempre reservado (Swango, 1997; Hoskins, 2004; Fernández & Bernardini, 2010).

1.1.7. Prevenção

A eficácia da imunização dos cães jovens, com as vacinas de vírus vivos modificados da esgana canina, depende da ausência de um determinado anticorpo materno, visto que este pode bloquear o vírus vacinal (Corrêa & Corrêa, 1992; Lappin, 1997).

Os cães podem ser vacinados no período de 6 a 8 semanas de idade, com intervalo a cada duas a 4 semanas até completarem as 16 semanas de idade. A vacinação deve ser reforçada com 1 ano de idade ou 12 meses após a última série primária de vacinas, já que alguns animais se tornam suscetíveis neste período inicial de vida (Day *et al.*, 2016).

Estirpes atenuadas do vírus do sarampo induzem imunidade heterotípica. Esta vacina pode ser administrada em cães jovens com alto risco e exposição ao VE. Entretanto, a vacina contra o sarampo, que não é a mesma administrada em humanos, é contraindicada em cadelas reprodutoras e em cães com mais de 10 semanas de idade (Nelson & Couto, 2006).

Existem diversos fatores que interferem na eficácia da vacinação e, consequentemente, na imunidade do animal, como por exemplo: o stresse, a temperatura corporal interna igual ou superior a 39,8°C, e a presença de comorbilidades (Corrêa & Corrêa, 1992; Lappin, 1997).

Estudos recentes baseados na utilização de vacinas recombinantes e que avaliaram a duração da resposta sorológica para o VE demonstraram que a proteção imunológica é de, pelo menos, 36 meses. Deste modo, a vacinação inicial de duas ou mais doses pode ser administrada com, aproximadamente, 4 semanas de intervalo, sendo a última dose vacinal administrada com 12 a 16 semanas de idade. A revacinação deve ocorrer com 1 ano de idade, podendo ser administrada de forma confiável a cada 3 anos com garantia de proteção em cães (Larson & Schultz, 2007; Day *et al.*, 2016).

Em determinados casos, a própria vacina pode desencadear a forma neurológica da esgana. Esta pode manifestar-se nas primeiras duas semanas após a administração em cachorros com poucos dias de vida, caso a mãe tenha sido vacinada durante a gravidez ou a poucos dias do parto. Também, nestes casos, as manifestações clínicas podem ser variáveis e dependem, tal como na forma adquirida, da localização das lesões, sendo frequentes as crises convulsivas (Corrêa & Corrêa, 1992; Nelson & Couto, 2006; Fernández & Bernardini, 2010).

No Brasil, verificou-se uma elevada taxa de animais vacinados com vacinas compradas em lojas de animais e rações. Isto constitui um problema, visto que na maior parte das vezes, estas vacinas não são certificadas e são aplicadas pelo próprio dono ou pelo responsável da loja.

É muito importante que as vacinas administradas sejam certificadas, isto é, que sejam provenientes de laboratórios comprovados a nível nacional e com elevado padrão de segurança. Para além disso, as vacinas devem ser, única e exclusivamente, administradas por um profissional capacitado, ou seja, por um Médico Veterinário, a fim de não ocorrerem erros durante a aplicação, que prejudicariam a imunização do animal.

1.2. CÉLULAS ESTAMINAIS

As células estaminais (SCs, do Inglês, *Stem Cells*) são células primitivas e indiferenciadas, ou seja, não comprometidas com nenhuma linhagem celular e sem distinção quanto ao aspeto morfológico, que apresentam as seguintes características: capacidade de proliferação ilimitada, autorrenovação prolongada, produção de diversas linhagens celulares e regeneração de tecidos (Bajada *et al.*, 2008; Gade *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

A proliferação das SCs surge através de sucessivas mitoses, sendo este processo responsável por assegurar um número adequado de SCs em determinado local do organismo, num momento específico do seu desenvolvimento (Rocha *et al.*, 2012).

A autorrenovação é o mecanismo pelo qual as SCs produzem cópias iguais entre si mesmas através de divisões celulares contínuas, gerando células-filhas exatamente iguais às células progenitoras (Alvarado, 2008; Rocha *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

A diferenciação ou plasticidade é a capacidade que as SCs apresentam, sob certas condições fisiológicas ou experimentais, de gerar tipos celulares distintos e com funções especializadas. Atualmente, este processo ainda não está inteiramente esclarecido, contudo sabe-se que é regulado pela amplificação ou repressão da expressão preferencial de genes específicos nas SCs. Decerto que o mecanismo envolvente depende do microambiente em que a célula está inserida, isto é, da influência exercida pelas células vizinhas, e da presença ou ausência dos variados fatores de diferenciação, como por exemplo fatores de crescimento ou outras citocinas (Del Carlo, 2005; Schwindt *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2012; Müller, 2013).

Além disso, acredita-se que a decisão inicial pela autorrenovação ou diferenciação seja aleatória (modelo estocástico), enquanto a diferenciação posterior seria determinada por agentes reguladores presentes no microambiente medular, de acordo com as necessidades do organismo (modelo indutivo) (Junqueira & Carneiro, 2008).

A regeneração de tecidos ocorre, geralmente, em situações de lesão tissular, quando as SCs presentes em diferentes locais do organismo recebem sinais específicos para se dividirem e restituírem as células perdidas (Bydlowski *et al.*, 2009; Gade *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012).

Em virtude destas propriedades, os investigadores pesquisam a possibilidade de encontrar a cura para diversas doenças, através da substituição dos tecidos degenerados por SCs (Rocha *et al.*, 2012).

1.2.1. Tipos de células estaminais

As SCs têm a capacidade de realizar divisão celular simétrica e assimétrica, dependendo do seu estágio de multiplicação ou especialização, respetivamente. Na divisão simétrica uma célula estaminal mãe origina duas células estaminais filhas iguais a ela. De outro ponto de vista, na divisão assimétrica uma célula estaminal mãe origina uma célula igual a ela (autorrenovação) e uma célula especializada, como ilustrado na Figura 6 (Webster *et al.*, 2012; Müller, 2013).

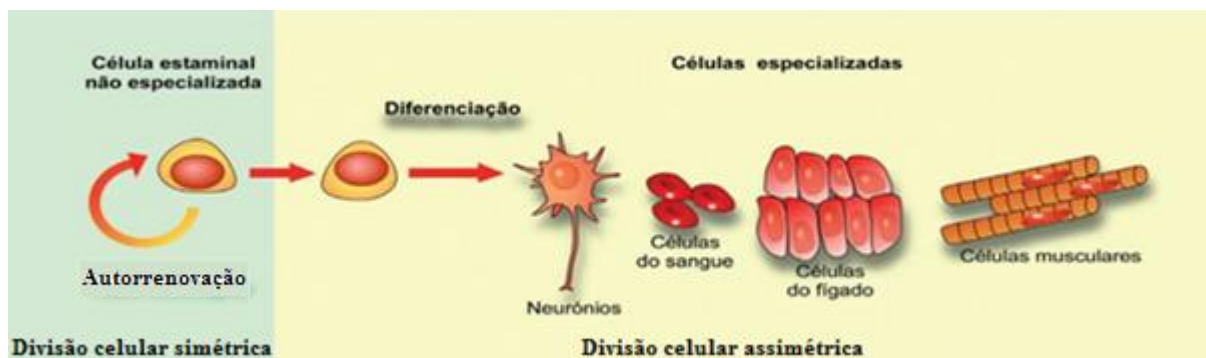


Figura 6 – Processos de divisão celular das SCs (Adaptado de Nirmalanandhan & Sittampalam, 2009).

As SCs são classificadas de acordo com a sua capacidade de especialização em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes (Müller, 2013).

As SCs totipotentes podem originar qualquer tipo celular. Além disso, têm a capacidade de se diferenciar nas células do folheto extraembrionário que dão sustentação ao embrião no útero materno, incluindo a placenta e os anexos embrionários. Estas células são isoladas do zigoto e dos embriões até à fase de mórula, o que corresponde a 3 ou 4 dias de vida (Gage, 2000; Fritsch *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

As SCs pluripotentes são semelhantes às células totipotentes, embora sejam um pouco mais especializadas. Elas são capazes de se diferenciar em todas as células dos 3 folhetos germinativos (ectoderme, mesoderme e endoderme), exceto na placenta e nos anexos embrionários (Rocha *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014). Isto significa que podem originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar os tecidos de apoio ao feto. Deste modo, caracterizam-se por serem células estaminais embrionárias (ESCs), obtidas da massa celular interna do blastocisto, aproximadamente, a partir do quinto dia após a fecundação (Mendez-Otero *et al.*, 2007; Gade *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014; Regenera Stem Cells, 2015).

As SCs multipotentes podem ser extraídas do indivíduo adulto. Geralmente, são obtidas a partir de diversas fontes, como tecido fetal, células germinativas embrionárias, cordão umbilical ou mesmo de tecidos adultos diferenciados. Relativamente ao seu poder de diferenciação, estas células são mais limitadas que as pluripotentes. Elas conseguem diferenciar-se em vários tipos celulares, porém, apenas de um mesmo folheto embrionário. Exemplos característicos de SCs multipotentes são as células estaminais mesenquimatosas da medula óssea e derivadas do tecido adiposo (Campagnoli *et al.*, 2001; Grinfeld & Gomes, 2004; da Franca *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2014).

As SCs oligopotentes têm um poder de diferenciação mais restrito, sendo capazes de formar células de um mesmo folheto germinativo e diferenciarem-se em poucos tecidos. Comumente são encontradas em tecidos já diferenciados, como no tecido intestinal. Um outro exemplo mais elucidativo das células oligopotentes é o caso das células precursoras ou progenitoras das células sanguíneas da linhagem mieloide (Del Carlo, 2005; Zago, 2006; Dias *et al.*, 2014; Regenera Stem Cells, 2015).

As SCs unipotentes diferenciam-se, somente, num único tipo celular maduro de um mesmo folheto embrionário. Desta forma, transformam-se num único tecido. Em contrapartida, garantem a reposição e renovação celular. Um exemplo bem singular é o caso das células espermatogénicas, que são responsáveis pela produção contínua de espermatozoides (McLaren, 2000; Fritsch *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

1.2.2. Células estaminais somáticas ou adultas

As células estaminais somáticas ou adultas (SSCs, do Inglês, *Somatic Stem Cells*) são células indiferenciadas, encontradas nos tecidos que são responsáveis pela regeneração tissular durante a sua existência. De forma geral, elas podem ser isoladas de diversos tecidos adultos do organismo, tais como: cordão umbilical, pele, músculo esquelético, rins, córnea, retina, fígado, baço, tecido nervoso, medula óssea, coração, trato gastrointestinal, pâncreas, vasos sanguíneos, sangue periférico, fluido amniótico, tecido adiposo e polpa dentária (Brack *et al.*, 2007; De Filippis *et al.*, 2007; Frye *et al.*, 2007; Markiewicz *et al.*, 2011).

Estas células têm propriedades típicas das SCs, incluindo a autorrenovação, a diferenciação de múltiplas linhagens e o alto potencial proliferativo (Gargett, 2004). Vats e colegas classificam-nas como sendo SCs, encontradas num compartimento tissular específico, que são importantes na manutenção da integridade dos tecidos como a pele, o osso e o sangue (Vats *et al.*, 2002).

As SSCs incluem SCs hematopoiéticas, SCs mesenquimatosas, SCs neurais, SCs da pele, SCs do cordão umbilical, e inúmeras outras. De entre estas as melhores caracterizadas são as derivadas da medula óssea, que produzem 2 tipos de SCs, as quais coexistem de maneira funcionalmente interdependente: as SCs hematopoiéticas, que classicamente são as responsáveis por toda a linhagem sanguínea, dando origem aos progenitores mieloides e linfoides e, conseqüentemente, a linfócitos, neutrófilos, basófilos, hemácias, plaquetas e demais células sanguíneas; e as SCs mesenquimatosas que dão origem a diversos tecidos e células, como condroblastos, osteoblastos, células endoteliais e adipócitos, sendo estas as mais utilizadas nas terapias celulares (Grinfeld & Gomes, 2004; Mendez-Otero *et al.*, 2007; Bajada *et al.*, 2008).

As SSCs, nomeadamente as SCs derivadas da medula óssea, são consideradas seguras nas terapias celulares, devido ao seu baixo risco em transformações malignas e à sua ampla capacidade de diferenciação (Asanuma *et al.*, 2010).

Em 1960, as SCs derivadas da medula óssea (Figura 7) foram isoladas e descritas pela primeira vez por Friedenstein e Owen (Bajada *et al.*, 2008).

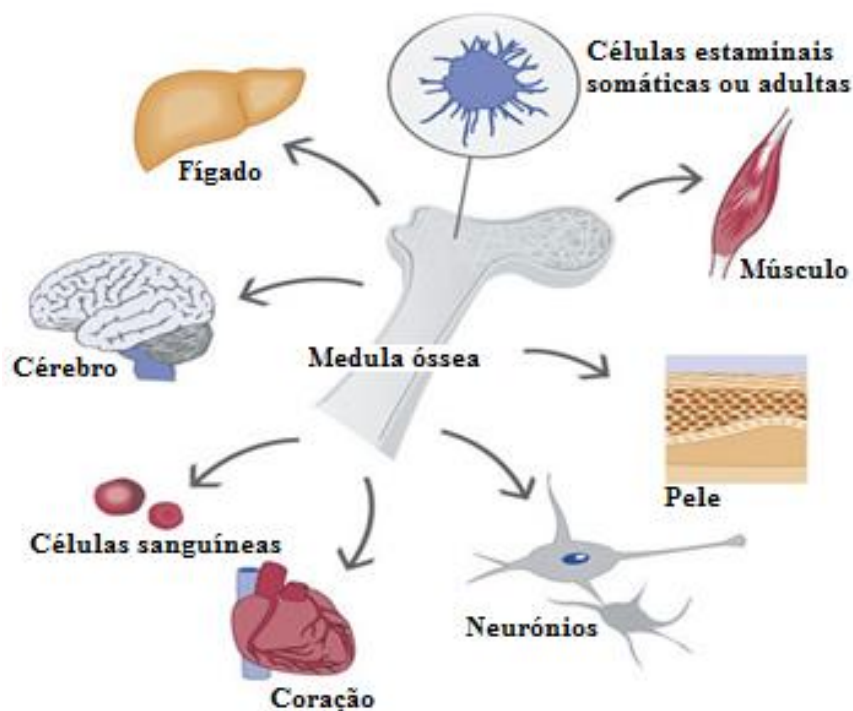


Figura 7 – Diagrama da obtenção das SSCs a partir da medula óssea e a capacidade de diferenciação em diversos tecidos (Adaptado de Promacel, 2012).

De acordo com Gargett, a concepção de que a linhagem das SSCs é restrita, só repondo os tipos celulares dos tecidos no qual elas residem, foi recentemente modificada por uma série de publicações sugerindo que estas células têm um grande potencial de diferenciação. De facto, as SSCs parecem ter a capacidade de gerar diferentes linhagens, dando início à concepção de plasticidade (Gargett, 2004).

As SSCs são vantajosas quando comparadas com as ESCs, relativamente às questões éticas da forma de obtenção, além da sua maior facilidade de isolamento, possibilidade de obtenção a partir de diversas fontes, menor imunogenicidade e, certamente, menor formação de teratomas (Wagers & Weissman, 2004).

As SSCs geram tipos celulares pré-diferenciados que possuem morfologias e funções especializadas, designadas células progenitoras ou precursoras. Estas são consideradas comprometidas a formar uma determinada linhagem celular. No entanto, alguns estudos contradizem o referido, mostrando a teoria da transdiferenciação (d'Amati *et al.*, 2000; Emerick *et al.*, 2007; Fritsch *et al.*, 2007; Mendez-Otero *et al.*, 2007).

Atualmente, ainda não se sabe ao certo se a hipótese da transdiferenciação *in vivo* é congruente ou incongruente. Existem trabalhos publicados sobre a regeneração hepática, que demonstraram que o que parecia ser transdiferenciação de uma célula hematopoiética era na realidade a sua fusão com o hepatócito, contestando, desta forma, esta hipótese. Isto faz com que os mecanismos de regeneração das SCs não sejam bem definidos, mas ainda assim acredita-se que elas recuperem, parcial ou totalmente, os órgãos lesados, talvez pelo efeito parácrino de secreção de alguns fatores, como citocinas, fatores de crescimento, antiapoptóticos, de entre outros, pelas células previamente injetadas. Outros trabalhos demonstraram o potencial de transdiferenciação das SCs, *in vitro* e *in vivo*, em diversos tipos celulares, levando em conta a própria formação de teratomas no organismo adulto, o que indica uma certa pluripotencialidade das SSCs, semelhante às ESCs (d'Amati *et al.*, 2000; Emerick *et al.*, 2007; Fritsch *et al.*, 2007; Mendez-Otero *et al.*, 2007).

A forma com que ocorre a melhoria funcional pela terapia celular ainda não está bem elucidada. Acredita-se que seja pela libertação de mediadores na área da lesão, ou mesmo, em alguns casos, pela neovascularização, reduzindo o número de destruição celular e apoptose, e aumentando a irrigação destas áreas (Monteiro *et al.*, 2010b).

O organismo de todos os mamíferos possui o seu próprio sistema endógeno de regeneração através das SSCs residentes nos tecidos. As SSCs reparam os tecidos através do seu potencial de diferenciação em células funcionais e por meio da secreção de diversas moléculas bioativas. Todavia, muitas vezes as SSCs do organismo (SCs intrínsecas) são incapazes de regenerar os tecidos lesados, dependendo do grau da lesão e da cronicidade da doença. Para além disso, a quantidade destas células reduz, significativamente, com o avanço da idade. Desta forma, é neste cenário que surge a necessidade de terapias celulares heterólogas, ou seja, quando as SCs utilizadas no processo de regeneração são retiradas de um organismo sadio (Regenera Stem Cells, 2015).

As SCs heterólogas não sofrem rejeição do organismo, possuem capacidade de migrar até ao tecido lesado, podem diferenciar-se em células tecido-específicas e/ou estimular as próprias SCs intrínsecas a promover a regeneração tissular. Em adição, as SCs apresentam potencial imunomodulador, imunossupressor, anti-inflamatório, antiapoptótico, antifibrótico e angiogénico. Diante de tais mecanismos de ação, as SCs heterólogas constituem uma importante alternativa para a restauração da funcionalidade tissular, revelando uma nova perspetiva terapêutica para a Medicina Veterinária (Regenera Stem Cells, 2015).

1.2.3. Células estaminais mesenquimatosas

As células estaminais mesenquimatosas (MSCs, do Inglês, *Mesenchymal Stem Cells*) caracterizam-se por serem uma população de células somáticas multipotentes, ou seja, células que já se diferenciaram em direção a uma linhagem celular mais específica, embora possam diferenciar-se em alguns tipos celulares distintos de diferentes tecidos, porém relacionados. Este grau de plasticidade sugere que as MSCs são as responsáveis pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (Meirelles *et al.*, 2008; Caplan, 2009; Monteiro *et al.*, 2010a; Otto & Wright, 2011).

Inicialmente, acreditava-se que as MSCs (Figura 8) apenas estavam envolvidas nos processos de reparação e homeostase dos tecidos dos quais eram isoladas, contudo, sabe-se atualmente que possuem diversos efeitos parácrinos que contribuem para a recuperação e regeneração de outros tipos celulares e tecidos do organismo (Caplan, 2005; Parekkadan & Milwid, 2010; Uccelli *et al.*, 2011; Gómez-Gavito *et al.*, 2012).

As MSCs, embora possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as ESCs, apresentam grandes vantagens, levando-se em conta a facilidade de isolamento destas células, a sua capacidade de propagação em cultura, e o facto de não serem imunogénicas, podendo ser teoricamente utilizadas em transplantes alogénicos. Para além disso, as MSCs não usam embriões como material biológico, contornando assim as questões éticas, legislativas e culturais envolvidas (Bydlowski *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2012).

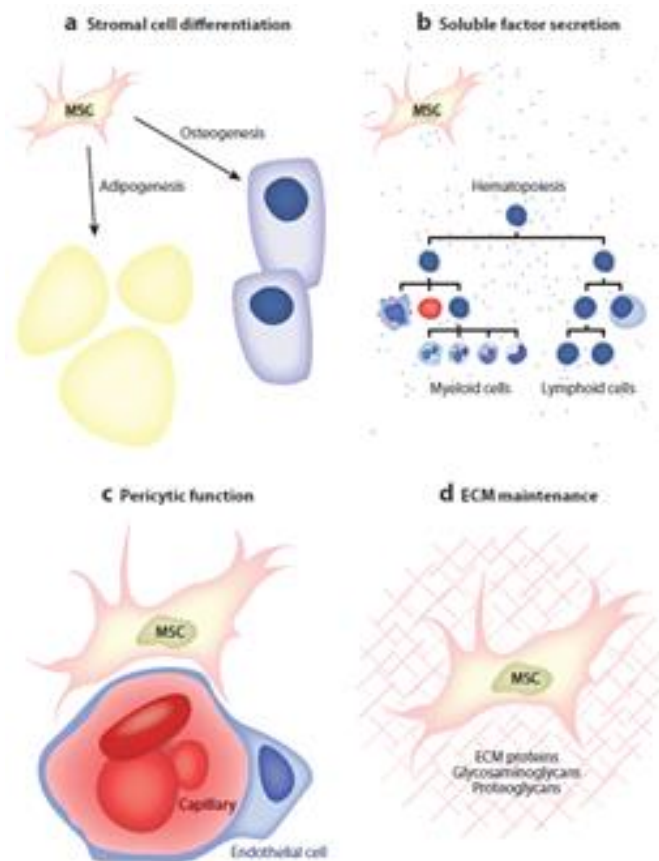


Figura 8 – Funções naturais das MSCs na medula óssea: (a) Diferenciação das MSCs em células do tecido esquelético dentro da medula óssea; (b) Segregação de diversos fatores solúveis que estão envolvidos no desenvolvimento hematopoiético; (c) Desenvolvimento de funções semelhantes às células que circundam os sinusoides da medula óssea; (d) Manutenção do microambiente da medula óssea, através da secreção e remodelação da matriz extracelular (Fonte original de Parekkadan & Milwid, 2010).

Diversos estudos demonstraram que as células precursoras estromais multipotentes podem também diferenciarem-se em linhagens germinativas não relacionadas, num processo designado de transdiferenciação. Desta forma, MSCs podem diferenciarem-se em células da linhagem mesodérmica, como osso, tecido adiposo e cartilagem, mas também teriam o potencial de diferenciação endodérmica e neuroectodérmica (Wagner *et al.*, 2005; Meirelles *et al.*, 2006; Uccelli *et al.*, 2011; Takemitsu *et al.*, 2012).

As MSCs são uma população heterogênea de células que proliferam, *in vitro* e *in vivo*, exibindo morfologia fibroblastoide, com formato fusiforme. Geralmente, elas fornecem suporte estrutural, além de regular a passagem de células através dos tecidos (Nardi & Meirelles, 2006; Gómez-Gavero *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2012; Filho *et al.*, 2013).

Em culturas e em condições adequadas de cultivo, as MSCs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com as demais células. Estas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de regeneração tissular (Bobis *et al.*, 2006; Caplan, 2009; Parekkadan & Milwid, 2010; Gómez-Gavero *et al.*, 2012).

As MSCs tornaram-se alvo de atenção terapêutica em razão do seu potencial imunomodulatório. As primeiras evidências do papel das MSCs sobre o sistema imunitário mostraram que a administração intravenosa delas em babuínos foi capaz de prolongar a sobrevivência de enxertos alogênicos de pele, de forma similar a potentes fármacos imunossupressores utilizados rotineiramente na clínica (Soares *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2010a; Otto & Wright, 2011; Shi *et al.*, 2012).

Recentemente, as MSCs foram identificadas nas regiões perivasculares em vários outros tecidos, além da medula óssea (porção estromal) e sangue, tanto no indivíduo adulto (tecido adiposo, pericitos, pele, trabéculas ósseas, periósteo, polpa dentária de dentes decíduos, cartilagem articular, membrana sinovial, fluido sinovial e músculo esquelético), como no feto (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo e pulmão) (Zucconi *et al.*, 2010; Otto & Wright, 2011; Shi *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

O avanço tecnológico tem permitido avaliar o real potencial da utilização terapêutica destas células, e a sua capacidade de regeneração dos tecidos danificados tem vindo a ser amplamente estudada em animais. Em adição, o desenvolvimento de protocolos terapêuticos seguros já é realidade em vários países (Tohma *et al.*, 2008; Parekkadan & Milwid, 2010; Shi *et al.*, 2012; Eridani, 2014).

As primeiras terapias com as MSCs a surgir estavam sempre relacionadas com as MSCs derivadas da medula óssea. No entanto, com a evolução dos estudos, constatou-se que este meio de obtenção apresenta diversas limitações. Um dos principais pontos que fizeram com que os cientistas buscassem outra alternativa de aquisição das MSCs é o facto de a medula óssea possuir uma população de células muito heterogênea, dificultando a cultura e a quantidade destas (Gómez-Gavero *et al.*, 2012; Filho *et al.*, 2013).

Desta forma, as MSCs derivadas do tecido adiposo tornaram-se numa forma de obtenção mais simplificada e rentável, tendo em vista a quantidade de MSCs que pode ser produzida em comparação com a medula óssea (Gómez-Gavero *et al.*, 2012; Filho *et al.*, 2013).

1.2.4. Células estaminais derivadas do tecido adiposo

Em 2001, as células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo (ASCs) foram isoladas, pela primeira vez, a partir de um lipoaspirado humano. Posteriormente, esta fonte celular foi alvo de enorme interesse pela comunidade científica (Zuk *et al.*, 2001; Spencer & Lopez, 2011; Filho *et al.*, 2013; Requicha, 2013). Quando comparadas com as SCs derivadas da medula óssea, as ASCs são igualmente capazes de se diferenciar em células e tecidos de origem mesodérmica (Bajada *et al.*, 2008; Martinello *et al.*, 2011).

O tecido adiposo canino fornece uma fonte alternativa de SCs com uma grande capacidade de diferenciação e com a vantagem de não induzirem resposta inflamatória exuberante no hospedeiro transplantado (Requicha *et al.*, 2012).

Em animais de companhia, o tecido adiposo pode ser facilmente obtido através de uma incisão cirúrgica na região inguinal, abdominal e/ou parede torácica, sem apresentar grandes riscos para a saúde do animal. Além disso, os procedimentos de rotina realizados em clínicas e hospitais veterinários, como orquiectomias, ovariectomias e cesarianas, podem favorecer um processo simples de obtenção deste material, sem que haja a necessidade de intervenções exclusivas para esta finalidade (Vidal *et al.*, 2007; Mambelli *et al.*, 2009; Martinello *et al.*, 2011).

O isolamento de ASCs é realizado através de processos de digestão enzimática do tecido com enzimas como a collagenase. O tecido adiposo digerido é composto por MSCs, células endoteliais, monócitos, macrófagos, pericitos, mastócitos, pré-adipócitos, fibroblastos e células musculares. O uso terapêutico desta fração celular mista pode oferecer benefícios para o animal, porém o número de ASCs, bem como de todos os componentes celulares da fração vascular é variável entre indivíduos (Zuk *et al.*, 2001; Mambelli *et al.*, 2009; Riordan *et al.*, 2009).

A quantidade de SCs nos tecidos decresce com a idade, sendo consideravelmente menor em indivíduos adultos/idosos. Desta forma, a mesma fração vascular, se cultivada *in vitro* sob condições adequadas de cultivo, possibilita o isolamento de uma população celular composta somente por MSCs, apresentando maior potencial regenerativo. Por sua vez, as MSCs que possuem elevada capacidade de expansão *in vitro* podem diferenciar-se em diversos tipos celulares maduros, como por exemplo: tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, neuronal, endotelial, de entre outros (Mambelli *et al.*, 2009; Martinello *et al.*, 2011; Spencer & Lopez, 2011).

O papel das ASCs na Medicina Regenerativa pode estar mais relacionada à sua capacidade de modular a imunidade e/ou inflamação, do que para os seus potenciais de diferenciação (Bajada *et al.*, 2008; Spencer & Lopez, 2011; Filho *et al.*, 2013).

1.3. TERAPIA CELULAR EM MEDICINA VETERINÁRIA

Na última década, destacou-se um novo ramo da Medicina Veterinária designado por Medicina Regenerativa Veterinária. Esta área aplica os princípios das ciências da saúde, da biologia e da engenharia, com o intuito de obter substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e de tecidos do organismo (Luna, 2007; Bajada *et al.*, 2008; Regenera Stem Cells, 2015).

A terapia celular é um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas que propõe a transferência de células com fins terapêuticos para diversas doenças com a expectativa de que estas proliferem, se diferenciem ou segreguem fatores que promovam a regeneração dos tecidos lesados. Quando realizada, produz uma série de fatores que podem ser a favor ou contra o processo (Singh & Williams, 2008; Rocha *et al.*, 2012; Müller, 2013; Eridani, 2014). O número de estudos sobre terapias regenerativas utilizando as SCs tem aumentado, consideravelmente, nos últimos anos em todo o mundo (Singh & Williams, 2008; Del Carlo *et al.*, 2009; Filho *et al.*, 2013; Eridani, 2014).

A terapia com SCs isoladas a partir da medula óssea tem sido aplicada na rotina médica humana no tratamento de diversas doenças hematológicas e imunológicas. Na Medicina Veterinária, estas terapias têm sido utilizadas em tratamentos de lesões na coluna vertebral, tendinites, defeitos cartilaginosos, artroses, doenças hepáticas e renais, lesões na pele, defeitos cardíacos e lesões ósseas (Singh & Williams, 2008; Gade *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012; Eridani, 2014).

Estudos recentes têm sido realizados descrevendo a utilização alogénica e autóloga das MSCs para a regeneração de diversos tecidos. Para além da aplicação direta na prática da Medicina Veterinária, esta investigação visa também o desenvolvimento de modelos experimentais, nos quais se estudam tratamentos para futura translação para os doentes humanos (Monteiro *et al.*, 2010a; Gade *et al.*, 2012).

A possibilidade de tratamento alogénico que tem sido testada recentemente implica a ampliação das perspetivas terapêuticas com estas células. Deste modo, indivíduos em estados mórbidos desfavoráveis não precisariam de submeter-se à colheita de MSCs e reduzir-se-ia a espera do mesmo pelo tratamento, uma vez que a cultura de MSCs já estaria estabelecida (Monteiro *et al.*, 2008).

O uso terapêutico das SCs ainda é questionado pela falta de protocolos, tanto sobre a melhor forma de isolamento, vias (intravenosa ou intralesional) e doses de administração para cada problema em específico. Sabe-se que as SCs possuem a capacidade de migrar até aos órgãos e tecidos lesados (biodistribuição) e, além disso, usufruem de fortes propriedades imunomoduladoras (Le Blanc & Pittenger, 2005).

Estudos demonstraram a ação parácrina das SCs através da secreção de citocinas. Esta ação influencia as células adjacentes, aumentando a sobrevivência celular e ativando mecanismos endógenos de regeneração (Gnecchi *et al.*, 2008; Burdon *et al.*, 2011).

1.3.1. Aplicações clínicas das células estaminais mesenquimatosas

A lesão tissular provocada por traumatismos ou agentes químicos e/ou infecciosos pode resultar na perda anatômica e funcional da integridade dos tecidos. Consecutivamente, uma sequência complexa de eventos é desencadeada na tentativa de restaurar a integridade da área lesada (Monteiro *et al.*, 2010a).

Após a lesão tissular, um coágulo forma-se nos primeiros minutos, e as plaquetas ativam-se, libertando fatores de crescimento. Em sequência, desenvolve-se um processo inflamatório envolvendo as células do sistema imunitário, primeiramente neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (resposta imunitária inata) e, posteriormente, linfócitos (resposta imunitária adquirida) (Tsirogianni *et al.*, 2006).

Paralelamente à ocorrência da resposta inflamatória, as células endoteliais são ativadas pela lesão vascular e hipoxia tissular, e mais células do sistema imunitário são atraídas por quimiotaxia. Esta quebra na homeostasia tissular gera um estímulo na ativação das MSCs. Em resposta a esta ativação e à perda do contacto com as células endoteliais e com a membrana basal, as MSCs proliferam, elevam o número de moléculas bioativas segregadas (fatores de crescimento e moléculas de adesão), migram para o local da lesão e/ou por diapedese entram na corrente sanguínea onde exercerão os efeitos parácrinos (Tsirogianni *et al.*, 2006; Meirelles *et al.*, 2008; Parekkadan & Milwid, 2010).

As MSCs expressam uma grande variedade de recetores para quimiocinas e fatores de crescimento. Desta forma, elas podem ser estimuladas pelas células pré-existentes no tecido alvo a diferenciarem-se ou segregarem fatores solúveis (ação parácrina) que estimularão outros tipos celulares. Sendo assim, quanto mais agudo é o processo patológico ou quanto mais vascularizada é a região afetada, mais intensa é a sinalização das células do tecido lesado e mais efetiva será a resposta das MSCs (Fuchs *et al.*, 2004; Morrison & Spradling, 2008; de Souza *et al.*, 2010; Uccelli *et al.*, 2011).

As MSCs têm também ação imunorregulatória e interagem com todas as células envolvidas na resposta imunitária. Muitos relatos descrevem as MSCs como tendo propriedades imunossupressoras, através da modulação de muitas funções do linfócito T, incluindo a sua ativação e que, *in vitro*, as MSCs são capazes de inibir a proliferação, diferenciação e quimiotaxia dos linfócitos B (Bydlowski *et al.*, 2009; de Souza *et al.*, 2010; Parekkadan & Milwid, 2010; Shi *et al.*, 2012).

As moléculas bioativas segregadas pelas MSCs exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando: efeitos antiapoptóticos nas células tecido-específico, efeitos imunomoduladores sobre as células do sistema imunitário inato e adaptativo, aumento da angiogénese, e quimiotaxia para células jovens comprometidas com o processo de reparação (Meirelles *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2010; Otto & Wright, 2011; Uccelli *et al.*, 2011).

Deste modo, pode ocorrer redução da resposta inflamatória inicial, em algumas doenças isquémicas, restabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido, dependendo da extensão e gravidade dos danos tissulares (de Souza *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2010a; Parekkadan & Milwid, 2010; Filho *et al.*, 2013).

De acordo com ensaios realizados, as MSCs autólogas e alogênicas podem ser transplantadas sem provocar reação imunológica, porque não expressam ou expressam muito pouco na sua superfície a molécula de histocompatibilidade de classe II. No entanto, alguns estudos científicos em ratos demonstraram potenciais riscos (Figura 9) no decorrer do transplante de MSCs, particularmente, em animais imunocomprometidos (Parekkadan & Milwid, 2010; Shi *et al.*, 2012).

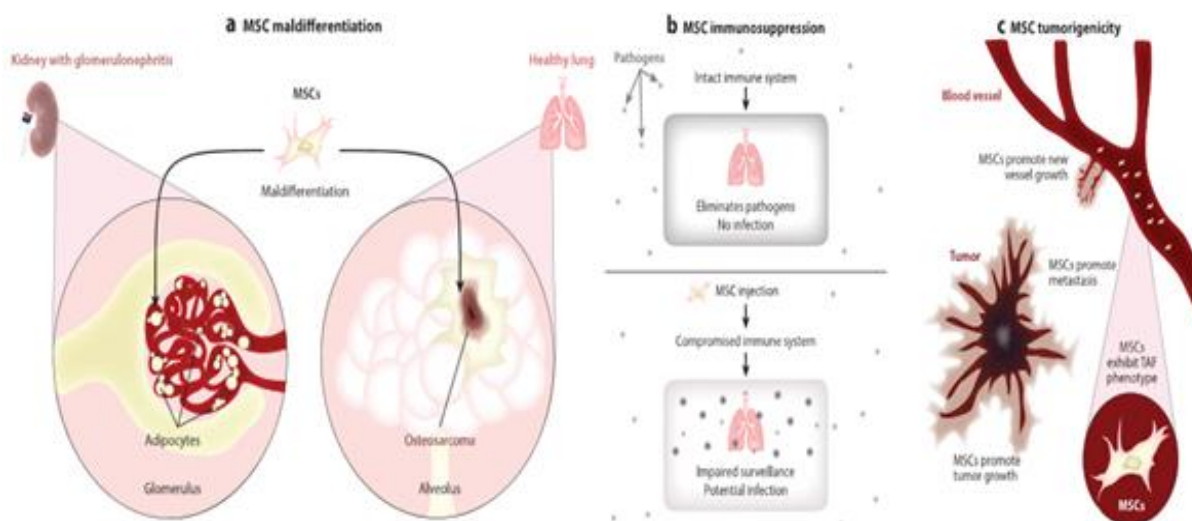


Figura 9 – Riscos potenciais associados com o transplante de MSCs: (a) Incorreta diferenciação nos adipócitos dos glomerulos e em osteossarcomas; (b) Ocorrência de infecções oportunistas, quando a resposta imunológica é prejudicada pela administração sistêmica das MSCs; (c) Crescimento de neoplasias através da proliferação de células cancerígenas, de metástases e da angiogénese (Adaptado de Parekkadan & Milwid, 2010).

As MSCs apresentam um potencial muito grande no tratamento de diversas doenças. Contudo, estes estudos ainda estão apenas no início e, embora já se tenham alguns resultados altamente promissores, é necessário ter em mente que muito pouco se sabe a respeito dos efeitos a longo prazo deste tipo de terapia (Bydlowski *et al.*, 2009; Parekkadan & Milwid, 2010; Yarak & Okamoto, 2010; Otto & Wright, 2011).

A produção de MSCs para este propósito necessita da observação e aderência às boas práticas de manipulação, a fim de assegurar a libertação do produto de modo seguro, reprodutível e eficiente (Bydlowski *et al.*, 2009).

1.3.2. Terapia celular em cães com sequelas neurológicas da esgana

A libertação de substâncias inflamatórias é um dos principais fatores que interferem, tanto de forma positiva como negativa, na migração e consequente ação das SCs até ao local da lesão. Por este motivo, é necessário compreender como funciona a libertação destas substâncias no sistema nervoso de um cão afetado pelo VE (Uccelli *et al.*, 2011).

As lesões desmielinizantes provocadas pelo VE assemelham-se, em muitos aspetos, às lesões geradas pelas doenças desmielinizantes em humanos, tais como a esclerose múltipla e a panencefalite esclerosante subaguda (Orsini *et al.*, 2007).

Alguns investigadores que visam desenvolver uma nova abordagem terapêutica têm realizado testes com o uso de SCs no tratamento das sequelas neurológicas da esgana. Todavia, ainda existe pouca literatura relacionada com o uso da terapia celular nas sequelas da esgana, mesmo sendo uma das principais doenças que atingem o SNC de cães, resultando em lesões degenerativas e/ou inflamatórias (Birchard & Sherding, 2008).

Um estudo recente evidenciou que o tratamento no decorrer da fase de viremia da doença é ineficaz. Porém, a opção terapêutica proporcionada pela injeção sistémica de células mononucleares da medula óssea alogénicas demonstrou ser uma opção segura e promissora para o tratamento da encefalomielite derivada da esgana em cães (Brito *et al.*, 2010).

Outros ensaios demonstraram que injeções heterólogas de células mononucleares da medula óssea, em cães sem raça definida (SRD) e com sequelas neurológicas provocadas pela esgana, tiveram remissão dos sinais clínicos, na maior parte dos indivíduos, e não houve formação de neoplasias após 8 meses de acompanhamento (dos Santos, 2010).

No caso específico da encefalomielite ocasionada pelo VE, o ideal seria reparar os danos no SNC e na medula espinhal através da reposição das células neurais, revertendo os quadros de paralisia. Se ocorrer a implantação das SCs, com diferenciação em neurónios motores, seria possível obter a reversão do quadro de paralisia (Bydlowski *et al.*, 2009).

Uma investigação em roedores demonstrou a capacidade de mielinização de axónios nas lesões espinhais, através da diferenciação das ESCs humanas em oligodendrócitos, o que promoveu uma melhoria funcional, devido à secreção de fatores tróficos ou remielinização dos axónios (Keirstead *et al.*, 2005; Singh & Williams, 2008; Uccelli *et al.*, 2011).

No que diz respeito à ação das MSCs sobre o SNC de animais afetados pelo VE, constatou-se uma forte remielinização dos axónios de neurónios motores, indução da neurogénese endógena e inibição da apoptose neural (Uccelli *et al.*, 2011; Regenera Stem Cells, 2015).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial das ASCs no tratamento de sequelas neurológicas originadas pela esgana.

Paralelamente, este estudo pretendeu determinar a percentagem de recuperação total e a percentagem de recuperação parcial dos animais incluídos no estudo, bem como determinar quais as sequelas neurológicas que permanecem mais, frequentemente, após o término da terapia celular, ou seja, aquelas com menor possibilidade de recuperação.

2.2. POPULAÇÃO ESTUDADA

A população estudada incluiu 7 cães com sequelas neurológicas ocasionadas pelo VE, sujeitos a terapia celular, entre os meses de janeiro e junho de 2015, com as ASCs obtidas na empresa *Regenera Stem Cells* (RSC), localizada em Campinas, no estado de São Paulo, no Brasil.

2.3. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Os animais incluídos no estudo apresentavam sinais clínicos característicos da esgana, mas não se encontravam na fase de viremia da doença, ou seja, todos os animais manifestavam sequelas neurológicas, como por exemplo: mioclonias, convulsões, automutilação, paralisia, falta de equilíbrio, quedas, marcha em círculos, inclinação da cabeça, de entre outras. Os cães estudados foram alvo de diagnóstico da esgana pela técnica de RT-PCR.

Deste trabalho, foram excluídos todos os animais sem alterações do foro neurológico. Não foram incluídos no estudo, os cães com história de administração recente de ribavirina, porque o tratamento com SCs é sempre realizado 3 meses após o término do antiviral. A ação da ribavirina faz com que, na maioria dos casos, os animais fiquem assintomáticos, mascarando assim as sequelas da esgana. De forma idêntica, foram excluídos os animais diagnosticados com neoplasia, porque a prática da terapia celular regenerativa é contraindicada na presença desta doença. Da mesma forma, foram excluídos do estudo, os cães com encurtamento tendinoso e com demência grave, isto é, animais que apresentavam um estado mental de obnubilação, estupor e coma.

Em situações de paralisia crônica, o músculo não é solicitado a restabelecer o seu comprimento normal, ocorrendo uma retração muscular. Deste modo, esta condição vai ocasionar a diminuição do comprimento muscular e, conseqüentemente, o encurtamento tendinoso.

2.4. RECOLHA DE DADOS CLÍNICOS ANTES DA TERAPIA

Os dados clínicos utilizados neste estudo foram reunidos com o auxílio de uma ficha de recolha de dados, representada no Anexo I, e na qual constam as seguintes informações:

- ✓ Identificação do animal: sexo, idade e raça;
- ✓ Estado mental;
- ✓ Marcha dos membros torácicos;
- ✓ Marcha dos membros pélvicos;
- ✓ Sequelas neurológicas da esgana;
- ✓ Tempo de sequela neurológica;
- ✓ Diagnóstico: todos os animais foram diagnosticados por RT-PCR utilizando amostras como sangue, urina e zaragatoa ocular;
- ✓ Tipo de vacina utilizada: certificada (administrada pelo Médico Veterinário no interior de uma clínica ou hospital veterinário) ou não certificada (comprada em lojas de animais e administrada pelo responsável da loja ou pelo próprio dono);
- ✓ Terapias complementares previamente utilizadas: fisioterapia e/ou acupuntura;
- ✓ Número de aplicações de ASCs.

Determinados sinais clínicos associados a sequelas neurológicas foram categorizados numa escala qualitativa para melhor avaliação e compreensão da evolução clínica dos animais. Desta forma, destacam-se os seguintes sinais clínicos:

- ✓ Mioclonias: ligeiras, moderadas e/ou graves;
- ✓ Atrofia muscular: ligeira, moderada e/ou grave;
- ✓ Posição de esfinge:
 - 1- Incapacidade de adotar a posição de esfinge;
 - 2- Capacidade de sustentar a posição de esfinge durante 5 minutos;
 - 3- Capacidade de sustentar a posição de esfinge durante 10 minutos;
 - 4- Capacidade de adotar a posição de esfinge.

2.5. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

As ASCs caninas utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela RSC, a qual é uma empresa biotecnológica que, desde 2011, tem atividade no Brasil no ramo da Medicina Regenerativa Veterinária.

Esta empresa dispõe de uma equipa multidisciplinar constituída por Biólogos, Engenheiros Biomédicos e Médicos Veterinários especializados nas áreas de biologia celular e tissular, biotecnologia das SCs, bem como na clínica médica e cirurgia veterinárias. A RSC é uma empresa brasileira, no campo da Medicina Veterinária, que possui um laboratório (Figura 10) classificação ISO 7 (referente à pureza do ar no ambiente de manipulação das SCs), com reconhecimento internacional dos seus processos biotecnológicos e do rigoroso controlo da qualidade.

A RSC possui um banco de ASCs estabelecido a partir de dadores jovens e saudáveis. Deste modo, é favorecida a disponibilização de material biológico de forma rápida e segura, uma vez que as células não causam rejeição ou quaisquer outros efeitos colaterais indesejáveis, conforme os protocolos desenvolvidos pela empresa (Regenera Stem Cells, 2015).



Figura 10 – Laboratório da empresa responsável pela terapia celular regenerativa, onde se podem observar a câmara de fluxo laminar, a incubadora de culturas celulares, o microscópio, a centrífuga e diversos kits contendo pipetas e tubos descartáveis utilizados na preparação das ASCs.

2.6. PROTOCOLO DE TERAPIA CELULAR

A RSC utiliza ASCs que passam, previamente, por um processo de isolamento, cultura, expansão, caracterização e padronização desenvolvidos pela própria empresa para que, posteriormente, sejam congeladas a -80°C e armazenadas no banco de células.

Uma vez que estas células têm uma ação imunomoduladora e imunossupressora, a indução da resposta imunológica não ocorre após a injeção das ASCs. Sendo assim, não há manifestação de sinais clínicos de rejeição quando aplicadas em indivíduos diferentes dos dadores (terapia heteróloga).

Para animais que apresentam sequelas neurológicas derivadas da esgana, geralmente, são indicadas 3 aplicações de ASCs, via intravenosa, com intervalo médio de 30 dias.

O número de aplicações de ASCs foi registado para cada caso clínico em específico, porque, embora o recomendado sejam 3 transplantes, existem proprietários que não têm possibilidades para assumir o tratamento completo.

O protocolo terapêutico utilizado neste estudo compreendeu as seguintes etapas:

- Obtenção das ASCs através de fragmentos de tecido adiposo de animais dadores, jovens e saudáveis, que durante uma cirurgia eletiva (por exemplo, a orquiectomia ou a ovariectomia) doaram o material para o laboratório da RSC;
- Após solicitação das ASCs pelo Médico Veterinário, estas foram devidamente processadas e enviadas para a clínica veterinária sob condições térmicas adequadas (geralmente, em gelo seco);
- No momento em que as células chegaram à clínica veterinária, o Médico Veterinário descongelou-as em banho-maria a 37°C ;
- Posteriormente, o Médico Veterinário transferiu todo o conteúdo presente no criotubo para uma solução de descongelamento e procedeu à sua centrifugação;
- Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. De seguida, adicionou-se a primeira solução de lavagem e homogeneizou-se delicadamente, com o intuito de dissolver o precipitado (Figuras 11);
- Centrifugou-se, novamente, o criotubo. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Depois, adicionou-se a segunda solução de lavagem e homogeneizou-se delicadamente, com o intuito de dissolver o precipitado;

- Procedeu-se à última centrifugação. Imediatamente após a centrifugação, o Médico Veterinário desprezou o sobrenadante e adicionou cerca de 2 ml de soro fisiológico (NaCl 0,9%) para posterior aplicação no animal. De seguida, homogeneizou-se delicadamente até que o precipitado se dissolveu;

- Com a seringa de 3 ml e a agulha hipodérmica descartável (40 mm de comprimento x 1,20 mm de diâmetro, com 18 Gauss e de cor rosa), aspirou-se todo o conteúdo do tubo;

- A administração intravenosa ao nível das veias cefálica, safena ou jugular externa foi realizada lentamente durante cerca de 1 minuto. A quantidade de ASCs injetadas variou entre 1 a 10 milhões dependendo do peso vivo do animal (Regenera Stem Cells, 2015).



Figuras 11 – Procedimento de preparação das ASCs para posterior administração intravenosa no animal pelo Médico Veterinário. A: tubo com a solução de descongelamento após a centrifugação, onde se pode observar o precipitado, ou seja, as ASCs. B: mistura das ASCs com a primeira solução de lavagem.

2.7. MONITORIZAÇÃO DA TERAPIA CELULAR

Com o objetivo de se obter uma amostra representativa e homogénea, a evolução clínica de cada animal foi avaliada sempre a cada 30 dias, antes da aplicação das ASCs.

Desta forma, nas tabelas representadas na secção dos Resultados, aparecem as nomenclaturas “Dia 0”, “Dia 30”, “Dia 60” e “Dia 90” que correspondem aos seguintes significados:

- ✓ Dia 0: monitorização do animal no dia do primeiro transplante com as ASCs;
- ✓ Dia 30: monitorização do animal 30 dias após o primeiro transplante com as ASCs;
- ✓ Dia 60: monitorização do animal 30 dias após o segundo transplante com as ASCs, isto é, 60 dias desde o início da terapia celular regenerativa;
- ✓ Dia 90: monitorização do animal 30 dias após o terceiro transplante com as ASCs, isto é, 90 dias desde o início da terapia celular regenerativa.

Os parâmetros pertencentes à ficha de recolha de dados, que foram analisados mensalmente, antes do transplante das ASCs, foram os seguintes:

- ✓ Estado mental;
- ✓ Marcha dos membros torácicos;
- ✓ Marcha dos membros pélvicos;
- ✓ Sequelas neurológicas da esgana.

Antes da administração mensal das ASCs, todos os animais incluídos neste estudo foram avaliados minuciosamente, observando-se sobretudo a locomoção em diferentes pisos e direções, submetendo-se o animal aos estímulos auditivos do próprio dono.

Com o intuito de complementar a avaliação previamente efetuada, com detalhes mais profundos, foram realizados vídeos ao longo da terapia celular.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos dados clínicos obtidos foi realizada uma análise estatística descritiva, com recurso ao Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Estados Unidos da América).

As variáveis consideradas importantes para o estudo foram as seguintes: sexo, idade, raça, estado vacinal, tempo de sequela neurológica, realização de terapias complementares (fisioterapia e/ou acupuntura), avaliação da evolução do quadro clínico após a realização das terapias complementares, número de aplicações de ASCs, estado mental, sequelas neurológicas observadas com maior frequência antes e no decorrer da terapia celular, percentagem de recuperação total e parcial dos animais, sequelas neurológicas que permanecem nos animais com recuperação parcial após o término da terapia celular, e a relação entre o tempo de sequela neurológica e a recuperação dos animais.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A população em estudo foi constituída por 7 cães cujas características principais estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo das características dos 7 animais estudados.

Animal	Sexo	Idade	Raça	Tipo de vacina utilizada
A1	Fêmea	15 meses	SRD	Vacinada com vacinas não certificadas.
A2	Macho	7 meses	SRD	Não vacinado.
A3	Fêmea	36 meses	SRD	Vacinada com vacinas não certificadas.
A4	Fêmea	30 meses	Labrador Retriever	Vacinada com vacinas certificadas.
A5	Macho	21 meses	SRD	Vacinado com vacinas certificadas.
A6	Macho	36 meses	Dachshund	Vacinado parcialmente (duas doses) com vacinas certificadas.
A7	Macho	60 meses	Pinscher	Vacinado com vacinas não certificadas.

Em relação ao sexo, 57% dos animais (4/7) eram machos e 43% (3/7) eram fêmeas (Figura 12).

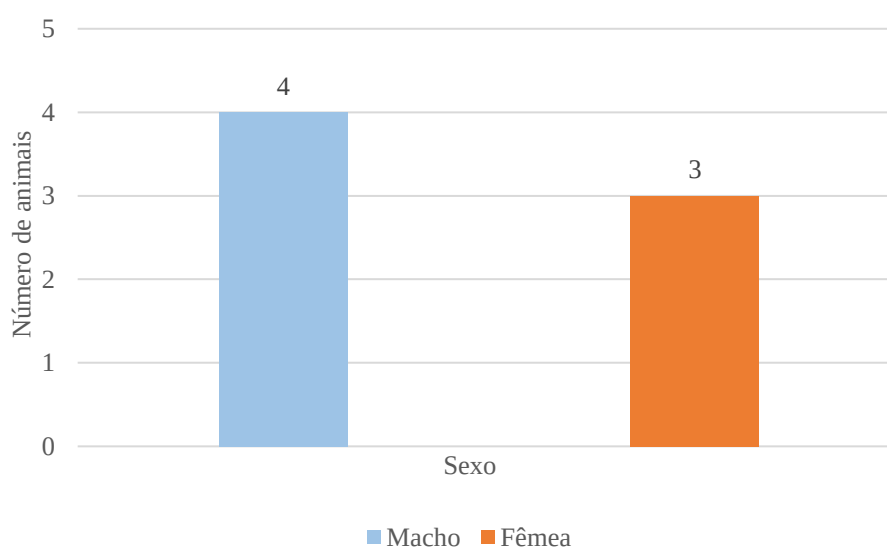


Figura 12 – Distribuição da população em estudo em relação ao sexo (frequência absoluta).

Na Figura 13 está representada a distribuição etária dos animais incluídos no estudo. A média de idades dos 7 cães estudados foi de 29 meses, isto é, 2 anos e 5 meses.

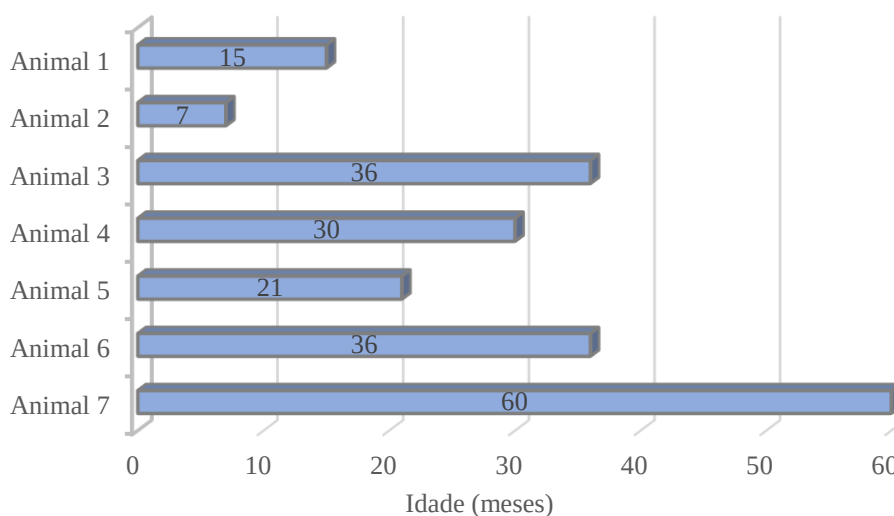


Figura 13 – Distribuição etária dos cães incluídos no estudo.

Relativamente às raças, 57% dos cães (4/7) eram sem raça definida (SRD) e os restantes 3 animais eram das raças Labrador Retriever, Dachshund e Pinscher (Figura 14).

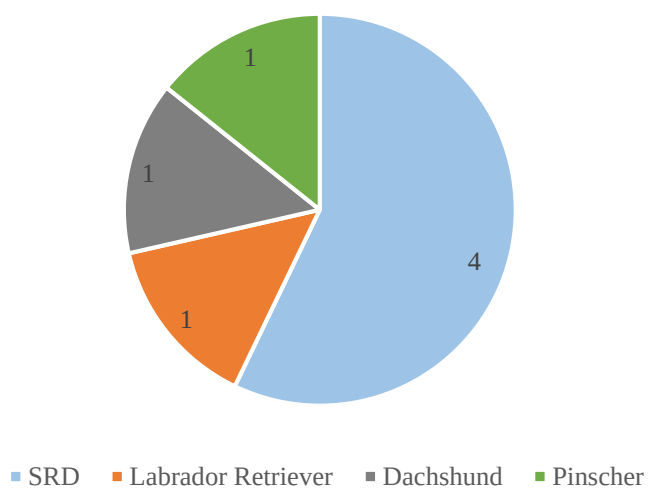


Figura 14 – Distribuição racial dos cães incluídos no estudo (frequência absoluta).

Quanto ao estado vacinal dos animais estudados, 43% dos cães (3/7) foram vacinados com vacinas não certificadas, 29% (2/7) foram vacinados com vacinas certificadas, 14% (1/7) não foi vacinado e 14% (1/7) foi vacinado parcialmente (duas doses) com vacinas certificadas (Figura 15).

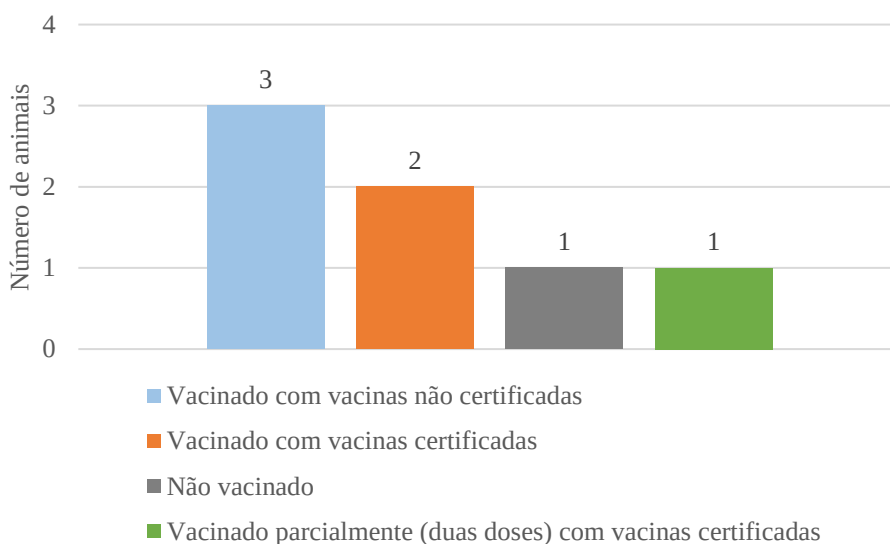


Figura 15 – Distribuição da população em estudo em relação ao tipo de vacina utilizada (frequência absoluta).

Tabela 2 – Informação dos 7 animais estudados em relação ao tempo de sequela neurológica, realização de terapias complementares e número de aplicações de ASCs.

Animal	Tempo de sequela neurológica	Terapias complementares	Número de aplicações de ASCs
A1	3 meses	Iniciou fisioterapia e acupuntura 3 meses antes da terapia celular, porém, sem melhora significativa.	3
A2	4 meses	Sem tratamento complementar.	3
A3	4 meses	Iniciou acupuntura 3 meses antes da terapia celular, porém, sem melhora significativa.	3
A4	5 meses	Iniciou fisioterapia e acupuntura 4 meses antes da terapia celular, porém, sem melhora significativa.	3
A5	7 meses	Iniciou fisioterapia e acupuntura 7 meses antes da terapia celular, com melhora do quadro clínico.	3
A6	30 meses	Sem tratamento complementar.	2
A7	36 meses	Sem tratamento complementar.	3

Na Figura 16 está representada a distribuição do tempo de sequela neurológica dos animais incluídos no estudo.

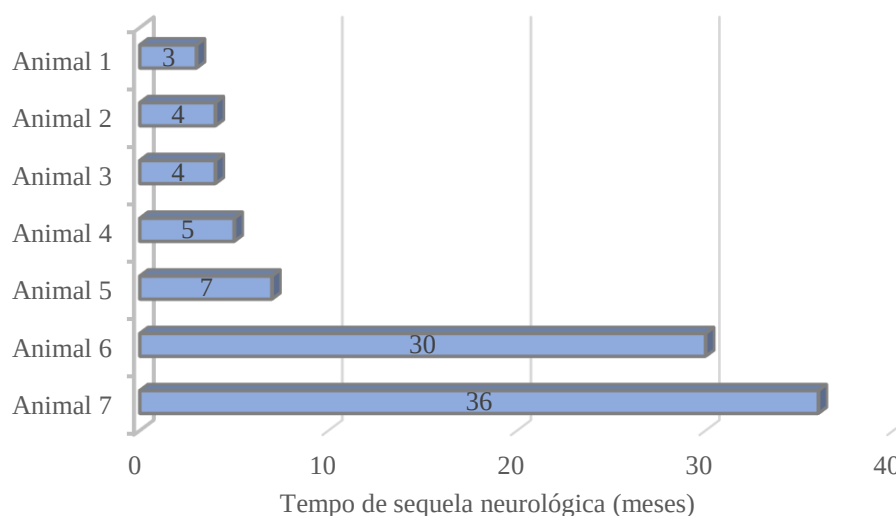


Figura 16 – Distribuição do tempo de sequela neurológica dos cães incluídos no estudo.

No que concerne às terapias complementares utilizadas, 57% dos animais (4/7) realizaram a prática e 43% (3/7) não realizaram a prática de fisioterapia e/ou acupuntura (Figura 17).

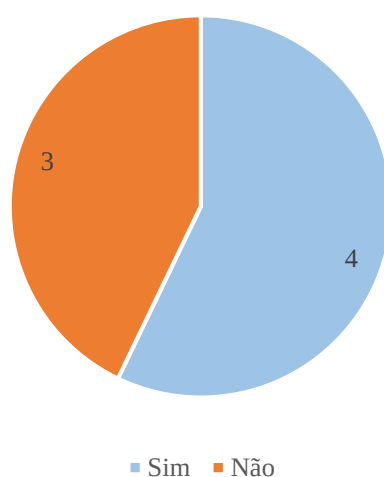


Figura 17 – Distribuição dos cães incluídos no estudo que realizaram ou não as terapias complementares (frequência absoluta).

Dos animais que realizaram as terapias complementares, 75% (3/4) não tiveram melhora significativa do quadro clínico e 25% (1/4) teve melhora do quadro clínico (Figura 18).

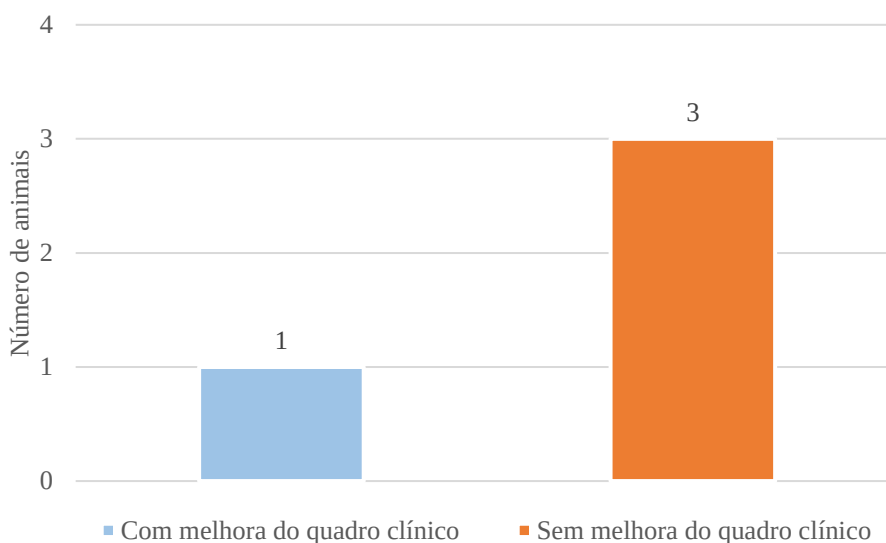


Figura 18 – Distribuição dos cães incluídos no estudo que revelaram melhora ou não do quadro clínico após a realização das terapias complementares (frequência absoluta).

Relativamente ao número de aplicações de ASCs, apenas 1 animal não realizou os 3 transplantes (Figura 19).

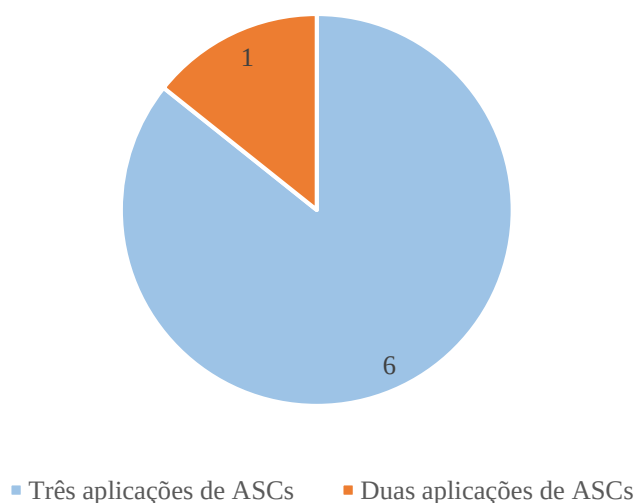


Figura 19 – Distribuição do número de aplicações de ASCs dos cães incluídos no estudo (frequência absoluta).

3.2. DESCRIÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA

Nas tabelas seguintes, encontram-se registados todos os parâmetros clínicos observados nos 7 cães em estudo. Estes foram analisados antes da administração das ASCs e a cada 30 dias após o início do tratamento.

Tabela 3 – Resumo da evolução clínica do animal 1.

Animal 1	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Ausência de movimentos voluntários (paralisia).	Ausência de movimentos voluntários (paralisia).	Incontinência urinária; Ausência de dor profunda nos membros torácicos e pélvicos; Atrofia muscular ligeira nos membros torácicos e moderada nos membros pélvicos.
Dia 30	Alerta	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentada apresentava ataxia ligeira.	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentada apresentava ataxia moderada.	Mioclonias de nível moderado nos membros pélvicos.
Dia 60	Alerta	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha normal.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Mioclonias ligeiras nos membros pélvicos.
Dia 90	Alerta	Marcha normal.	Marcha normal.	Ausência de sequelas neurológicas.

Tabela 4 – Resumo da evolução clínica do animal 2.

Animal 2	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Marcha normal.	Movimentos ligeiros e voluntários no membro pélvico esquerdo; Ausência de movimentos voluntários no membro pélvico direito (paraparésia).	Convulsões; Automutilação; Reflexos diminuídos a ausentes nos membros pélvicos; Atrofia muscular nos membros pélvicos; Mioclonias na região da cabeça.
Dia 30	Alerta	Marcha normal.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Ausência de sequelas neurológicas.
Dia 60	Alerta	Marcha normal.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Ausência de sequelas neurológicas.
Dia 90	Alerta	Marcha normal.	Marcha normal.	Ausência de sequelas neurológicas.

Tabela 5 – Resumo da evolução clínica do animal 3.

Animal 3	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Marcha normal.	Ausência de movimentos voluntários (paraparésia).	Mioclonias de nível moderado nos membros pélvicos; Atrofia muscular ligeira e generalizada.
Dia 30	Alerta	Marcha normal.	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentada apresentava movimentos ligeiros nos membros torácicos e ataxia moderada nos membros pélvicos.	Mioclonias de nível moderado nos membros pélvicos.
Dia 60	Alerta	Marcha normal.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Ausência de sequelas neurológicas.
Dia 90	Alerta	Marcha normal.	Marcha normal.	Mioclonias de nível moderado nos membros pélvicos.

Tabela 6 – Resumo da evolução clínica do animal 4.

Animal 4	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Marcha normal.	Ausência de movimentos voluntários (paraparesia).	Ausência de dor profunda nos membros pélvicos; Mioclonias ligeiras nos membros pélvicos; Atrofia muscular ligeira nos membros pélvicos.
Dia 30	Alerta	Marcha normal.	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentada apresentava movimentos ligeiros nos membros torácicos e ataxia moderada nos membros pélvicos.	Mioclonias ligeiras nos membros pélvicos.
Dia 60	Alerta	Marcha normal.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Mioclonias ligeiras nos membros pélvicos.
Dia 90	Alerta	Marcha normal.	Marcha normal.	Ausência de sequelas neurológicas.

Tabela 7 – Resumo da evolução clínica do animal 5.

Animal 5	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentado apresentava movimentos ligeiros nos membros torácicos; Ataxia e paresia graves.	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentado apresentava movimentos ligeiros nos membros pélvicos; Ataxia e paresia graves.	Convulsões; Défice proprioceptivo nos membros torácicos e pélvicos; Mioclonias de nível moderado nos músculos da face.
Dia 30	Alerta	Dificuldade para se levantar; Marcha atáxica.	Dificuldade para se levantar; Marcha atáxica.	Mioclonias ligeiras nos músculos da face.
Dia 60	Alerta	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Ataxia e paresia ligeiras.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Mioclonias ligeiras nos músculos da face.
Dia 90	Alerta	Marcha normal.	Marcha normal.	Mioclonias ligeiras nos músculos da face.

Tabela 8 – Resumo da evolução clínica do animal 6.

Animal 6	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Incapacidade de se levantar; Quando sustentado suportava o peso do corpo; Ataxia e paresia graves.	Incapacidade de se levantar; Quando sustentado suportava o peso do corpo; Ataxia e paresia graves.	Falta de equilíbrio grave.
Dia 30	Alerta	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Ataxia e paresia moderadas.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Ataxia moderada.	Falta de equilíbrio em nível moderado; Marcha em círculos; Quedas.
Dia 60	Alerta	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha ligeiramente atáxica.	Falta de equilíbrio ligeiro.

Tabela 9 – Resumo da evolução clínica do animal 7.

Animal 7	Estado mental	Marcha dos membros torácicos	Marcha dos membros pélvicos	Sequelas neurológicas
Dia 0	Alerta	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentado apresentava ataxia moderada a leve.	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentado apresentava ataxia moderada a leve.	Incapacidade de adotar a posição de esfinge; Presença de sinais vestibulares: inclinação da cabeça (<i>head tilt</i>), quedas, marcha em círculos e falta de equilíbrio grave.
Dia 30	Alerta	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentado apresentava ataxia e paresia moderadas a leves.	Incapacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Quando sustentado apresentava ataxia moderada a leve.	Falta de equilíbrio em nível moderado; Marcha em círculos; Quedas.
Dia 60	Alerta	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha atáxica e em círculos para o lado esquerdo.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha atáxica e em círculos para o lado esquerdo.	Capacidade de adotar a posição de esfinge.
Dia 90	Alerta	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha atáxica e em círculos para o lado esquerdo.	Capacidade de levantar e sustentar o peso do corpo; Marcha atáxica e em círculos para o lado esquerdo.	Falta de equilíbrio ligeiro.

No que diz respeito ao estado mental, todos os animais apresentavam-se em alerta durante todo o tratamento com as ASCs.

Relativamente às sequelas neurológicas observadas com maior frequência antes e no decorrer da terapia celular (Figura 20), a alteração locomotora (incapacidade de adotar a posição de esfinge) destacou-se em todos os animais estudados. As mioclonias ocorreram em 5 cães (71%), e tanto as convulsões como a ataxia vestibular (perda de equilíbrio) manifestaram-se em apenas 2 animais (29%).

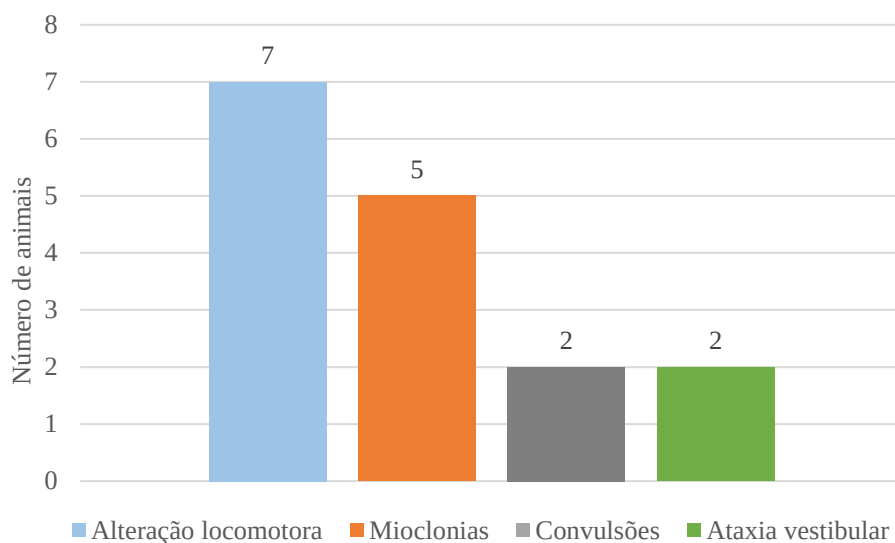


Figura 20 – Distribuição da população em estudo em relação às sequelas neurológicas mais, frequentemente, observadas antes e durante a terapia celular (frequência absoluta).

No que concerne à recuperação dos animais, 43% (3/7) atingiram um nível total de recuperação da doença e 57% (4/7) recuperaram parcialmente (Figura 21).

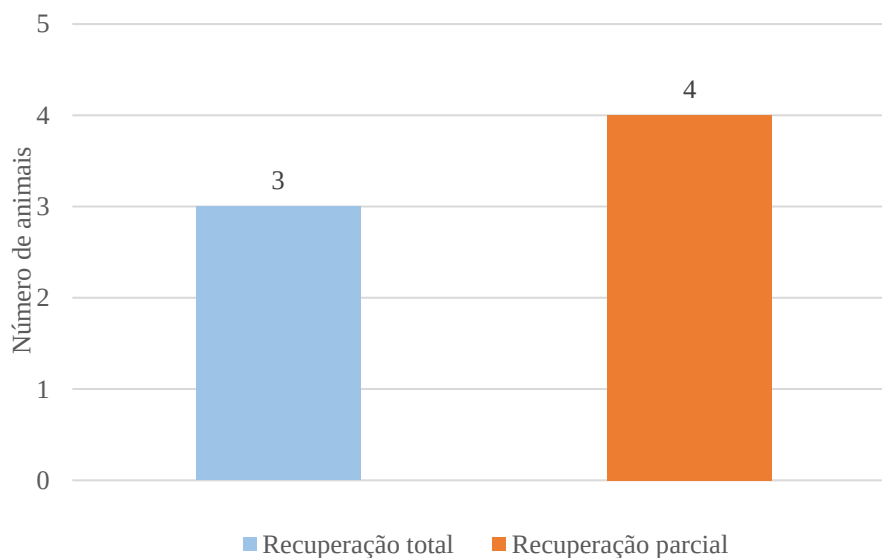


Figura 21 – Distribuição da população em estudo em relação à recuperação dos animais (frequência absoluta).

Dos 4 animais que obtiveram somente uma recuperação parcial, 50% (2/4) permaneceram com uma sequela neurológica (mioclonias) e 50% (2/4) permaneceram com duas sequelas neurológicas (ataxia cerebelar e ataxia vestibular) (Figura 22).

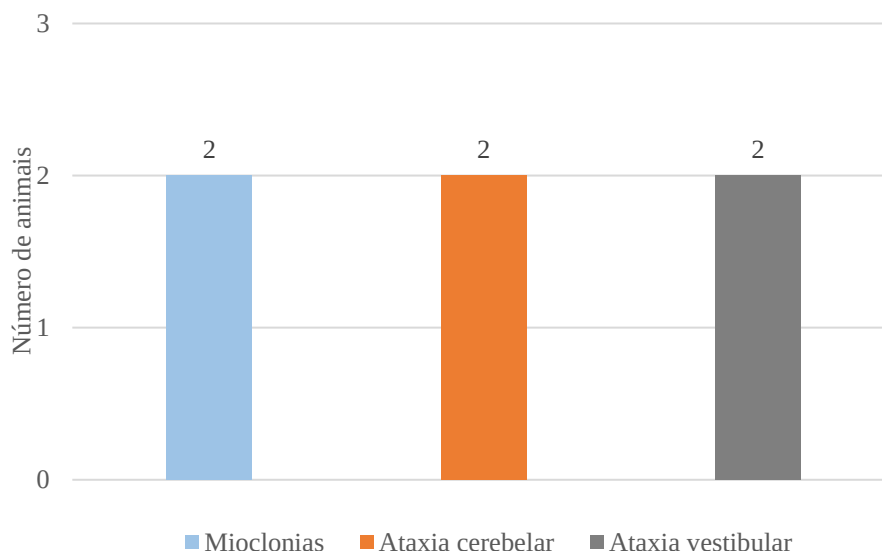


Figura 22 – Distribuição da população em estudo em relação à permanência de determinadas sequelas neurológicas após o término da terapia celular (frequência absoluta).

As mioclonias, a ataxia cerebelar (marcha atáxica/incoordenação motora) e a ataxia vestibular (perda de equilíbrio) foram consideradas as sequelas neurológicas com menor possibilidade de recuperação, ou seja, aquelas que apresentam pior prognóstico face ao tratamento com as ASCs.

Na Figura 23 está representada a relação entre o tempo de sequela neurológica e a recuperação dos animais.

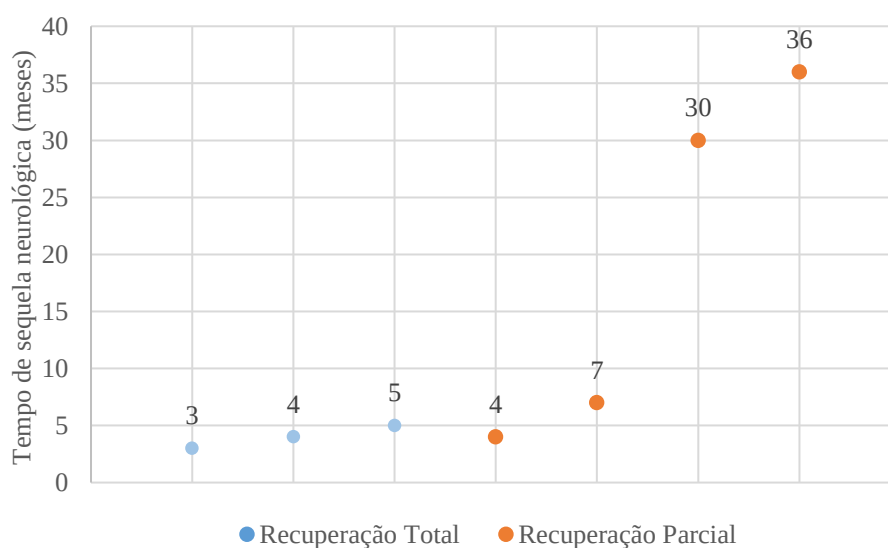


Figura 23 – Distribuição da população em estudo em relação ao tempo de sequela neurológica e à recuperação.

Não se verificou uma relação direta entre o tempo de sequelas e a recuperação dos animais. No entanto, constatou-se que naqueles animais em que as sequelas neurológicas tinham mais de um ano de duração, houve a recuperação locomotora (capacidade de adotar a posição de esfinge), contudo a persistência de duas sequelas neurológicas (ataxia cerebelar e ataxia vestibular). Nos animais com 4 e 7 meses de tempo de sequela, também houve a recuperação locomotora, mas apenas se confirmou a existência de uma sequela neurológica (mioclonias).

No animal 6 a realização de apenas 2 transplantes com ASCs não teve o efeito desejado, pois verificou-se uma recuperação parcial com persistência de duas sequelas neurológicas (ataxia cerebelar e ataxia vestibular).

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial de uma terapia celular no tratamento de cães com sequelas decorrentes da esgana. Esta doença, desde os primeiros relatos descritos por Jenner, em 1809, continua a ser uma das mais importantes doenças infectocontagiosas do cão, apresentando uma elevada taxa de mortalidade que varia entre 25 a 75% (Appel & Summers, 1999; Nelson & Couto, 2006).

A população estudada foi composta por animais de diferentes raças, sexos e idades. A maior parte dos indivíduos afetados pela doença eram jovens e adultos, o que está de acordo com a literatura que refere que qualquer faixa etária pode ser acometida. Os cães jovens parecem ser os mais suscetíveis e os cães idosos os menos atingidos pelo VE (Appel & Summers, 1999; Greene & Appel, 2006).

No que diz respeito à idade dos animais, os resultados obtidos são semelhantes aos de um estudo norte-americano que compilou dados de mais de 100 casos de esgana com manifestação neurológica, observando-se que embora pouco mais da metade dos casos tenham ocorrido em cães com menos de 1 ano de idade, uma boa parte dos casos ocorreu em cães adultos (Tipold *et al.*, 1992).

É possível que a alta prevalência de esgana em cães adultos neste estudo, seja devida à falta de revacinação periódica, um procedimento ainda pouco frequente entre tutores de cães no Brasil. Outro fator considerado relevante é o facto de o estudo incidir sobre animais com sequelas neurológicas e não sobre a doença ativa.

Os cães jovens são menos suscetíveis a distúrbios neurológicos ocasionados pelo VE, dado que alguns cachorros podem sobreviver à infeção inicial e, posteriormente, desenvolver imunidade parcial ao vírus. Desta forma, estes cães correm o risco de mais tarde, quando adultos, manifestarem a doença no SNC (Fenner, 2004).

A não vacinação ou vacinação inadequada contra o VE é considerada por diversos autores como sendo um fator predisponente para a ocorrência da doença (Tudury *et al.*, 1997). O protocolo vacinal deve seguir as recomendações propostas pela *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) que consistem na vacinação a cada 3 a 4 semanas, entre as 6 e as 16 semanas de idades, revacinação no primeiro ano de vida, seguida por revacinação num intervalo inferior a 3 anos (Greene & Appel, 2006).

No presente trabalho, a grande parte da população canina não obedeceu ao esquema de imunização apropriado. De entre os erros de vacinação observados, destacam-se os seguintes: intervalo inadequado entre as doses, término da vacinação antes das 16 semanas de idade (momento em que anticorpos maternos ainda podem estar presentes, prejudicando a resposta à vacinação), atraso na primeira revacinação anual e intervalo de revacinação superior a 3 anos, sendo que na maioria dos casos, os animais foram vacinados apenas quando eram cachorros. A maioria dos tutores desconhece a importância de seguir o esquema adequado de vacinação. Deste modo, torna-se essencial salientar que cães que não recebem imunização periódica podem perder a proteção e tornarem-se suscetíveis à infecção pelo VE (Greene & Appel, 2006).

Num estudo realizado no Brasil, verificou-se grande percentagem de títulos abaixo do valor considerado protetor em cães vacinados corretamente (Monti, 2004). Outros estudos demonstraram que a prevalência da esgana no Brasil varia de 6,1 a 11,7%, de acordo com a região e a metodologia utilizada no diagnóstico. Sendo assim, sugere-se que enquanto não existirem programas de esclarecimento para a população, seja mais prudente manter o esquema de revacinação anual dos animais adultos (Gouveia *et al.*, 1987; Headley & Graça, 2000).

A manifestação clínica da esgana varia consoante a virulência da estirpe infetante, a idade e o perfil imunitário do cão. Mais de 50% das infecções pelo VE são subclínicas ou com sinais clínicos moderados, como apatia, hiporexia, febre, desidratação, secreção oculonasal serosa a mucopurulenta, tosse, estertores pulmonares, vômito e diarreia (Appel & Summers, 1999; Amude *et al.*, 2006b; Greene & Appel, 2006).

As sequelas neurológicas referidas como mais frequentes na encefalomielite decorrente da esgana incluem: mioclonias, convulsões, ataxia cerebelar, vestibular ou sensorial, cegueira, tetraparésia, paraparésia e paraplegia (Vandeveldt & Cachin, 1993; Tudury *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2007).

No presente estudo, as sequelas neurológicas observadas com maior frequência foram as seguintes: alteração locomotora visível nos 7 animais estudados, sendo que 1 caso apresentava paralisia, 3 apresentavam paraparésia, 2 apresentavam tetraparésia e em 1 caso o animal apresentava parésia moderada a leve que evolui para marcha atáxica e em círculos para o lado esquerdo (ataxia cerebelar); mioclonias em 5 animais; convulsões em 2 animais; e ataxia vestibular (perda de equilíbrio) também em 2 animais.

Silva e colegas (2007) observaram mioclonias em 38,4% dos casos, enquanto Tudury e parceiros (1997) observaram em 75,3% dos animais estudados, e Tipold e colaboradores (1992) relataram em menos de 50% dos casos. Esta variação nas frequências dos diferentes sinais neurológicos pode estar relacionada tanto à forma de seleção dos animais estudados, quanto ao tempo de evolução da doença, estirpe viral, idade e imunocompetência do hospedeiro.

Dos 5 animais que apresentaram mioclonias, 3 manifestaram nos membros pélvicos e 2 nos músculos faciais. A fisiopatogenia da mioclonia na esgana não está completamente esclarecida. Estudos experimentais demonstraram que a anormalidade ocorre na medula espinhal ou no tronco encefálico dentro de circuitos neurais intrínsecos, e uma lesão nos núcleos basais pode funcionar como um marca-passo na medula espinhal ou no tronco encefálico e iniciar as mioclonias (Summers *et al.*, 1995; Amude *et al.*, 2006b; Lorenz & Kornegay, 2006).

Exceto nas situações em que o animal apresenta sinais clássicos de mioclonias com frequência, o diagnóstico clínico e laboratorial da esgana canina é de difícil obtenção. Em vários casos o diagnóstico clínico é incerto e as alterações hematológicas, bioquímicas, bem como a análise do líquido cefalorraquidiano podem não ser conclusivas (Shell, 1990; Greene, 1998; Frisk *et al.*, 1999; Moritz *et al.*, 2000).

Todos os animais submetidos à terapia celular realizaram o diagnóstico da esgana através da técnica de RT-PCR, nomeadamente, para contornar os inconvenientes da não síntese de proteínas virais nas formas subaguda e crônica ou da presença de anticorpos, que podem interferir, substancialmente, na maioria dos métodos de diagnóstico *ante mortem*. A RT-PCR é um meio de diagnóstico etiológico fidedigno, rápido e com níveis elevados de especificidade e sensibilidade (Shin *et al.*, 2004; Jóźwik & Frymus, 2005).

Relativamente ao tempo de permanência das sequelas neurológicas, 5 animais apresentavam a encefalomielite há menos de 1 ano e os outros 2 animais exibiam as alterações do foro neurológico há mais de 1 ano.

No que diz respeito à eficácia da terapia celular nos 7 cães estudados, 3 dos animais alcançaram uma recuperação total e 4 atingiram apenas uma recuperação parcial. Destes 4 animais, 2 permaneceram com uma sequela neurológica (mioclonias) e os outros 2 ficaram com duas sequelas neurológicas (ataxia cerebelar e ataxia vestibular). Por conseguinte, as mioclonias, a ataxia cerebelar e a ataxia vestibular foram consideradas as sequelas neurológicas com pior prognóstico face ao tratamento com as ASCs.

De acordo com os trabalhos desenvolvidos pela RSC, em aproximadamente 80% dos casos de sequelas de até 1 ano obteve-se uma recuperação completa ou parcial dos movimentos, que varia consoante o tempo e grau da sequela e, particularmente, segundo o estado do sistema locomotor do animal. Em sequelas superiores a 1 ano é necessário esclarecer ao proprietário que as hipóteses de recuperação descem, significativamente, para cerca de 15%. Por conseguinte, a realização tardia da terapia, pode da mesma forma, acarretar no insucesso da mesma, uma vez que as SCs são direcionadas ao local da lesão através de mediadores inflamatórios, que podem estar reduzidos em lesões crônicas (Brito *et al.*, 2010; dos Santos, 2010; Regenera Stem Cells, 2015).

No presente estudo, não se observou uma relação linear entre o tempo de sequelas e a recuperação dos animais. No entanto, verificou-se que naqueles animais em que as sequelas neurológicas estavam permanentes há mais de 1 ano, houve a persistência de duas sequelas (ataxia cerebelar e ataxia vestibular).

No decorrer da terapia celular, 6 animais realizaram 3 aplicações de ASCs e 1 animal realizou somente 2 transplantes. Neste animal, a realização de apenas 2 tratamentos com as ASCs não teve o efeito desejado, pois verificou-se uma recuperação parcial com persistência de duas sequelas neurológicas (ataxia cerebelar e ataxia vestibular).

Normalmente, após a primeira aplicação observa-se uma discreta evolução do quadro clínico, e somente após a segunda e terceira aplicações é que se pode notar melhorias significativas. Por ser uma aplicação sistêmica, é importante saber se o animal não tem outras comorbidades que predisponham à dispersão das células para outros focos (Regenera Stem Cells, 2015).

Em todos os animais estudados, o estado mental revelado era alerta, o que contribuiu de forma positiva para o êxito dos resultados obtidos.

O objetivo primordial desta terapia é, sem dúvida, melhorar a qualidade de vida do animal e diminuir o índice de eutanásias realizadas em decorrência das sequelas geradas pelo VE.

Deste modo, com base nos resultados obtidos por Brito e colegas (2010) e dos Santos (2010), a maioria dos cães tratados apresentaram remissão dos sinais neurológicos, e a terapia com MSCs revelou ser uma alternativa segura e eficaz quando o animal não se encontrava na fase de viremia da doença.

Dos 7 animais incluídos no estudo, 3 não praticaram terapias complementares e 4 exerceram fisioterapia e/ou acupuntura. Dos 4 animais que realizaram as terapias complementares antes de iniciarem a terapia celular, 3 não obtiveram resposta ao tratamento, embora 1 tenha alcançado melhora significativa do quadro clínico. O cão que usufrui das terapias complementares e teve êxito já praticava fisioterapia e acupuntura há 7 meses, enquanto que os outros 3 apenas tinham iniciado há 3 meses (2 animais) e 4 meses (1 animal).

A fisioterapia é de extrema importância na recuperação dos cães com encefalomielite derivada do VE. O restabelecimento da atividade biomecânica dos músculos e tendões é fundamental para que o animal possa responder ao reaparecimento dos estímulos nervosos (Regenera Stem Cells, 2015).

A acupuntura pode ser utilizada concomitante ao tratamento das SCs, agregando resultados a ele. O objetivo é estimular os pontos cutâneos locais específicos por onde percorrem os meridianos que estão em desarmonia, e com isto promover o equilíbrio do organismo, e consequentemente, a recuperação do animal com encefalite instalada e paralisia dos membros, após a regressão dos sinais clínicos agudos (Matthiesen, 2004).

A resposta ao tratamento com as ASCs é individual. Por este motivo, o Médico Veterinário deve ter muita cautela quando oferece falsas expectativas aos tutores. No caso dos 7 animais estudados, a terapia celular foi considerada um sucesso, embora não tenha recuperado na plenitude todos os cães com sequelas neurológicas ocasionadas pela esgana.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo pretendeu ser um contributo para aprofundar o conhecimento sobre a terapia celular regenerativa aplicada em cães com sequelas neurológicas decorrentes da esgana.

Embora a esgana seja uma doença profundamente estudada, não existem estudos sobre o tratamento antiviral específico. Consecutivamente, o tratamento instituído é basicamente de suporte e sintomático, dependendo diretamente da imunidade do animal afetado e objetivando, sobretudo, a restauração da qualidade de vida do animal.

A terapia com SCs apresenta-se como uma possibilidade promissora no tratamento contra diversos tipos de doenças, sejam elas congénitas, hereditárias ou adquiridas. As ASCs revelaram ser uma opção, verdadeiramente viável, visto que possuem fácil obtenção, e a população homogênea de ASCs contribui para que seja uma opção, relativamente, rentável.

No presente estudo, apesar de nem todos os animais terem revelado uma recuperação plena das sequelas, todos eles recuperaram a alteração locomotora, ou seja, alcançaram a posição de esfinge. Os animais que apresentavam paralisia, paraparésia e tetraparésia conseguiram restaurar a locomoção e voltaram a andar por si só, sem dependerem da ajuda dos respetivos donos. Apenas em 2 casos clínicos, em que as sequelas estavam permanentes há mais de 1 ano, a marcha atáxica, isto é, a ataxia cerebelar persistiu. Não obstante, a terapia celular foi considerada um sucesso por parte dos Médicos Veterinários e respetivos tutores, tornando-se numa verdadeira alternativa para quem quer oferecer maior qualidade de vida aos animais com encefalomielite derivada da esgana.

Em suma, a Medicina Regenerativa baseada na utilização de SCs e, particularmente, nas ASCs, depende criticamente da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam e mediam a diferenciação de uma determinada linhagem específica, o estabelecimento destas células em determinado tecido de interesse, no SNC no caso específico da encefalomielite derivada da esgana, e as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, A. S. (2008). Stem cells: time to check our premises. *Cell Stem Cell*, 3(1), 25-29.
- Amude, A. M.; Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2006a). Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Veterinary Research Communications*, 30(6), 679-687.
- Amude, A. M.; Carvalho, G. A.; Balarin, M. R. S.; Arias, M. V. B.; dos Reis, A. C. F.; Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2006b). Encefalomyelite pelo vírus da cinomose canina em cães sem sinais sistêmicos da doença - estudos preliminares em três casos. *Clínica Veterinária*, 60, 60-66.
- Appel, M. J. G. & Carmichael, A. (1979). Canine distemper. In: E. J. Catcott (Ed.), *Canine Medicine* (4ª ed., pp. 18-25). Califórnia: American Veterinary Publication.
- Appel, M. J. G. & Summers, B. A. (1999). Canine distemper: current status. In: L. E. Carmichael (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases* (pp. 1-5). Nova York: International Veterinary Information Service.
- Asanuma, H.; Meldrum, D. R. & Meldrum, K. K. (2010). Therapeutic applications of mesenchymal stem cells to repair kidney injury. *The Journal of Urology*, 184(1), 26-33.
- Bajada, S.; Mazakova, I.; Richardson, J. B. & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(4), 169-183.
- Birchard, S. J. & Sherding, R. G. (2008). *Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais* (3ª ed., 2072 p.). São Paulo: Roca.
- Bobis, S.; Jarocha, D. & Majka, M. (2006). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(4), 215-230.

Brack, A. S.; Conboy, M. J.; Roy, S.; Lee, M.; Kuo, C. J.; Keller, C. & Rando, T. A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, 317(5839), 807-810.

Brito, H. F. V.; Corat, M. A. F.; Santos, M. R.; Gilioli, R.; Passos, L. A. C.; Lancelloti, M.; Ferreira, F. *et al.* (2010). Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. *Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*, 8(24), 26-29.

Burdon, T. J.; Paul, A.; Noiseux, N.; Prakash, S. & Shum-Tim, D. (2011). Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potencial. *Bone Marrow Research*, 2011(2011), 1-14.

Bydlowski, S. P.; Debes, A. A.; Maselli, L. M. F. & Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31(1), 25-35.

Campagnoli, C.; Roberts, I. A.; Kumar, S.; Bennett, P. R.; Bellantuono, I. & Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood: The Journal of Hematology*, 98(8), 2396-2402.

Caplan, A. I. (2005). Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Engineering*, 11(7-8), 1198-1211.

Caplan, A. I. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*, 217(2), 318-324.

Cardoso, F. (1995). Tratamento da doença de parkinson. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 53(1), 1-10.

Corrêa, W. M. & Corrêa, C. N. M. (1992). Cinomose. In: W. M. Corrêa & C. N. M. Corrêa (Eds.), *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos* (2ª ed., pp. 655-670). Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica.

d'Amati, G.; di Gioia, C. R.; Giordano, C. & Gallo, P. (2000). Myocyte transdifferentiation: a possible pathogenetic mechanism for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 124(2), 287-290.

da Franca, A. G.; Vicente, T. F. & Chan, A. C. R. V. (2011). *Células-tronco do sangue do cordão umbilical: o que são e suas aplicações*. IX Simpósio de Ensino de Graduação - IX Mostra Acadêmica – UNIMEP, Piracicaba, Brasil.

Day, M. J.; Horzinek, M. C.; Schultz, R. D. & Squires, R. A. (2016). Diretrizes para a vacinação de cães e gatos – compiladas pelo grupo de diretrizes de vacinação (VGG) da associação veterinária mundial de pequenos animais (WSAVA). *Journal of Small Animal Practice*, 57, 7-8.

De Filippis, L.; Lamorte, G.; Snyder, E. Y.; Malgaroli, A. & Vescovi, A. L. (2007). A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cells*, 25(9), 2312-2321.

de Souza, C. F.; de Napoli, P.; Han, S. W.; de Lima, V. C. & Carvalho, A. C. C. (2010). Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca?. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, 18(3), 344-353.

Del Carlo, R. J. (2005). Células-tronco: células da esperança. *Revista CFMV*, 35, 60-68.

Del Carlo, R. J.; Monteiro, B. S. & Neto, N. M. A. (2009). Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Ceres*, 56(4), 446-450.

Del Puerto, H. L.; Vasconcelos, A. C.; Moro, L.; Alves, F.; Braz, G. F. & Martins, A. S. (2010). Canine distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(2), 139-144.

Dias, R. P.; Teixeira, M. F. S.; de Farias, A. C.; Martins, G. R.; Aguiar, T. D. F.; Alves, A. O.; Silva, P. F. *et al.* (2014). Células-tronco: uma corrida em busca da terapia utilizando modelos animais. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 8(4), 45-65.

do Amaral, H. A. (2007). *Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, São Paulo, Brasil.

dos Santos, M. R. (2010). *Neoplasia causada por injeção de células mononucleares de medula óssea jovens em camundongos idosos*. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fisiopatologia Médica, Campinas, São Paulo, Brasil.

Elia, G.; Belloli, C.; Cirone, F.; Lucente, M. S.; Caruso, M.; Martella, V.; Decaro, N. *et al.* (2008). In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiviral Research*, 77(2), 108-113.

Emerick, M. C.; Montenegro, K. B. M. & Degraive, W. (2007). Novas tecnologias na genética humana: avanços e impactos para a saúde. *Projeto Ghente/GESTEC-NIT* (252 p.). Rio de Janeiro.

Eridani, S. (2014). Types of human stem cells and their therapeutic applications. *Stem Cell Discovery*, 4(2), 13-26.

Fenner, W. R. (2004). Doenças do cérebro. In: S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato* (5ª ed., pp. 586-638). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Fernández, V. L. & Bernardini, M. (2010). Enfermidades inflamatórias. In: V. L. Fernández & M. Bernardini (Eds.), *Neurologia em Cães e Gatos* (1ª ed., pp. 163-167). São Paulo: MedVet.

Filho, S. T. L. P.; Treichel, T. L. E.; Junior, J. S. A.; da Rosa, M. B.; Dalmolin, F.; Brun, M. V.; Krause, A. *et al.* (2013). Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Veterinária e Zootecnia*, 20, 49-59.

Frisk, A. L.; König, M.; Moritz, A. & Baumgärtner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3634-3643.

Fritsch, M. *et al.* (2007). Células-tronco: aspectos gerais. In: F. F. Pasqualotto (Ed.), *Células-Tronco – Visão do Especialista* (1ª ed., pp. 19-82). Caxias do Sul: EDUCS.

Frye, M.; Fisher, A. G. & Watt, F. M. (2007). Epidermal stem cells are defined by global histone modifications that are altered by Myc-induced differentiation. *PLoS One*, 2(8), 763.

Fuchs, E.; Tumber, T. & Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116(6), 769-778.

Gade, N. E.; Pratheesh, M. D.; Nath, A.; Dubey, P. K.; Amarpal & Sharma, G. T. (2012). Therapeutic potencial of stem cells in veterinary practice. *Veterinary World*, 5(8), 499-507.

Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.

Gargett, C. E. (2004). Stem cells in gynaecology. *Australian and Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 44(5), 380-386.

Gebara, C. M. S.; Wosiacki, S. R.; Negrão, F. J.; de Oliveira, D. B.; Beloni, S. N. E.; Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2004a). Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(4), 480-487.

Gebara, C. M. S.; Wosiacki, S. R.; Negrão, F. J.; Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2004b). 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*, 56(2), 168-174.

Gnecchi, M.; Zhang, Z.; Ni, A. & Dzau, V. J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research*, 103(11), 1204-1219.

Gómez-Gaviro, M. V.; Lovell-Badge, R.; Fernández-Avilés, F. & Lara-Pezzi, E. (2012). The vascular stem cell niche. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5(5), 618-630.

Gouveia, A. M. G.; Magalhães, H. H. & Ribeiro, A. L. (1987). Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 39(4), 9-45.

Graci, J. D. & Cameron, C. E. (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Reviews in Medical Virology*, 16(1), 37-48.

Greene, C. E. (1998). *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (2ª ed., 820 p.). Filadélfia: W. B. Saunders.

Greene, C. E. & Appel, M. J. (2006). Canine distemper. In: C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3ª ed., pp. 25-41). St Louis: Saunders Elsevier.

Grinfeld, S. & Gomes, R. G. C. (2004). Células-tronco: um breve estudo. *International Journal of Dentistry*, 3(1), 324–329.

Hartmann, T. L. S.; Batista, H. B. C. R.; Dezen, D.; Spilki, F. R.; Franco, A. C. & Roehe, P. M. (2007). 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*, Santa Maria, 37(4), 1178-1181.

Headley, S. A. & Graça, D. L. (2000). Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37(2).

Hoskins, J. D. (2004). Doenças virais caninas. In: S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato* (5ª ed., pp. 440-441). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Jones, T. C.; Hunt, R. D. & King, N. W. (2000). *Patologia Veterinária* (6ª ed., 424 p.). São Paulo: Manole.

Jóźwik, A. & Frymus, T. (2005). Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Veterinary Research Communications*, 29(4), 347-359.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2008). Hemocitopoese. In: L. C. Junqueira & J. Carneiro (Eds.), *Histologia Básica* (11ª ed., pp. 237-239). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Keirstead, H. S.; Nistor, G.; Bernal, G.; Totoiu, M.; Cloutier, F.; Sharp, K. & Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 25(19), 4694-4705.

Lappin, M. R. (1997). Canine distemper virus. In: M. S. Leib & W. E. Monroe (Eds.), *Practical Small Animal Internal Medicine* (1ª ed., pp. 874-877). EUA: W. B. Saunders Company.

Larson, L. J. & Schultz, R. D. (2007). Three-year duration of immunity in dogs vaccinated with a canarypox-vectored recombinant canine distemper virus vaccine. *Veterinary Therapeutics*, 8(2), 101-106.

Le Blanc, K. & Pittenger, M. (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*, 7(1), 36-45.

Litfalla, F.; Hamzé, A. L.; Pacheco, A. M.; Souza, C. C.; Rodrigues, C. A. L. S.; Filadelpho, A. L. & Bariani, M. H. (2008). Cinomose e o processo de desmielinização. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 11, 1-7.

Lorenz, M. D. & Kornegay, J. N. (2006). *Neurologia Veterinária* (4^a ed., 467 p.). São Paulo: Manole.

Luna, N. (2007). Células-tronco: pesquisa básica em saúde, da ética à panacéia. *Interface - Comunicação, Saúde, Educação*, 11(23), 587-604.

Mambelli, L. I.; Santos, E. J.; Frazão, P. J.; Chaparro, M. B.; Kerkis, A.; Zoppa, A. L. & Kerkis, I. (2009). Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering: Part C Methods*, 15(1), 87-94.

Mangia, S. H. & Paes, A. C. (2008). Neuropatologia da cinomose. *Veterinária e Zootecnia*, 15(3), 416-427.

Markiewicz, I.; Sypecka, J.; Domanska-Janik, K.; Wyszomirski, T. & Lukomska, B. (2011). Cellular environment directs differentiation of human umbilical cord blood-derived neural stem cells in vitro. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(3), 289-301.

Martinello, T.; Bronzini, I.; Maccatrozzo, L.; Mollo, A.; Sampaolesi, M.; Mascarello, F.; Decaminada, M. *et al.* (2011). Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*, 91(1), 18-24.

Matthiesen, A. D. (2004). *Acupuntura no tratamento da cinomose canina*. Monografia apresentada à faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – campus de Botucatu, como parte integrante do Curso de Especialização em Acupuntura Veterinária, Botucatu, São Paulo, Brasil.

McLaren, A. (2000). Stem cells: golden opportunities with ethical baggage. *Science*, 288(5472), 1778.

Meirelles, L. S.; Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11), 2204-2213.

Meirelles, L. S.; Caplan, A. I. & Nardi, N. B. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26(9), 2287-2299.

Mendez-Otero, R. *et al.* (2007). Terapias celulares em neurologia. In: M. M. Morales (Ed.), *Terapias Avançadas - Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde* (1ª ed., pp. 55-71). São Paulo: Atheneu.

Monteiro, B. S.; Neto, N. M. A. & Del Carlo, R. J. (2008). Terapia celular em reparação óssea - aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 11(2), 95-100.

Monteiro, B. S.; Neto, N. M. A. & Del Carlo, R. J. (2010a). Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40(1), 1-8.

Monteiro, M. V. B.; dos Santos, M. P.; Costa, C. T. C.; Whiteman, C. W. & Monteiro, F. O. B. (2010b). Cinomose canina nos animais domésticos e silvestres. *Revista de Ciências Agrárias*, 53(2), 216-223.

Monti, F. S. (2004). *Anticorpos contra o vírus da cinomose em cães vacinados em diferentes estabelecimentos da área urbana do município de Viçosa/MG*. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Moritz, A.; Frisk, A. L. & Baumgärtner, W. (2000). The evaluation of diagnostic procedures for detection of canine distemper virus infection. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 10, 37-45.

Moro, L.; Alves, C. M.; Santos, F. G. A.; Martins, A. S. & Vasconcelos, A. C. (2004). Apoptose na desmielinização da cinomose canina (revisão de literatura). *Bioscience Journal*, 20(2), 171-178.

Morrison, S. J. & Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4), 598-611.

Müller, V. S. (2013). *Células-tronco na regeneração muscular e nervosa*. Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção da graduação em Medicina Veterinária, Porto Alegre, Brasil.

Nardi, N. B. & Meirelles, L. S. (2006). Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 174, 249-282.

Nascimento, D. N. S. (2009). *Cinomose canina – revisão de literatura*. Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais, Belém, Pará, Brasil.

Nelson, R. W. & Couto, C. G. (2006). Cinomose. In: R. W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Medicina Interna de Pequenos Animais* (3ª ed., pp. 1235-1237). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Nirmalanandhan, V. S. & Sittampalam, G. S. (2009). Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *Journal of Biomolecular Screening*, 14(7), 755-768.

Noletto, P. G.; Mendonça, C. S.; Fernandes, C. C.; Mantovani, M. M.; Tsuruta, S. A.; Sola, M. C. & Mundim, A. V. (2011). Corpúsculos de Lentz em um cão com 10 dias de idade. *Bioscience Journal*, 27(1), 112-115.

Orsini, H.; Bondan, E. F.; Sanchez, M.; Lallo, M. A.; Maiorka, P. C.; Dagli, M. L. Z. & Graça, D. L. (2007). Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 65(4-A), 1070-1077.

Orsini, H. & Bondan, E. F. (2008). Participação astrocitária na desmielinização do sistema nervoso central (SNC) de cães com cinomose – revisão da literatura. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, 26(4), 438-442.

Otto, W. R. & Wright, N. A. (2011). Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4(20), 1-14.

Parekkadan, B. & Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12, 87-117.

Pet Care Centro Veterinário. (2012). Cinomose: o que você precisa saber sobre ela?. Acedido em 10 de março de 2016 em: <<http://petcare.com.br/blog/cinomose-o-que-voce-precisa-saber-sobre-ela/>>.

Promacel. (2012). Liberação de células estaminais adultas – células tronco adultas. Acedido em 22 de fevereiro de 2016 em: <<http://www.celulasestaminais-adultas.com/index.php/promacel-liberta-celulas-estaminais-adultas-celulas-tronco-adultas/>>.

Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2005). *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas* (pp. 375-376). Porto Alegre: Artmed.

Regenera Stem Cells. (2015). *Curso de capacitação em células tronco e terapia celular em pequenos animais* (pp. 1-61). Campinas, São Paulo, Brasil.

Requicha, J. F.; Viegas, C. A.; Albuquerque, C. M.; Azevedo, J. M.; Reis, R. L. & Gomes, M. E. (2012). Canine adipose stem cells: the influence of the anatomy and passaging on the stemness and osteogenic differentiation potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(s2), 1-31.

Requicha, J. F. M. F. (2013). *New tissue-engineered matrix for periodontal regeneration based on a biodegradable material combined with canine adipose-derived stem cells*. Tese de Doutoramento apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal.

Riordan, N. H.; Ichim, T. E.; Min, W. P.; Wang, H.; Solano, F.; Lara, F.; Alfaro, M. *et al.* (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 7(29), 1-9.

Rocha, A. S.; Maia, L.; Guastali, M. D.; Volpato, R. & Alvarenga, F. C. L. (2012). Considerações sobre células-tronco embrionárias. *Veterinária e Zootecnia*, 19(3), 303–313.

Schwindt, T. T.; Barnabé, G. F. & Mello, L. E. A. M. (2005). Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, 16(1), 13-19.

Shell, L. G. (1990). Canine distemper. *Companion Small Animal*, 13, 173-179.

Sherding, R. G. (1998). Cinomose. In: S. J. Birchard & R. G. Sherding (Eds.), *Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais* (1ª ed., pp. 120-123). São Paulo: Roca.

Shi, Y.; Su, J.; Roberts, A. I.; Shou, P.; Rabson, A. B. & Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*, 33(3), 136-143.

Shin, Y.; Mori, T.; Okita, M.; Gemma, T.; Kai, C. & Mikami, T. (1995). Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57(3), 439-445.

Shin, Y. J.; Cho, K. O.; Cho, H. S.; Kang, S. K.; Kim, H. J.; Kim, Y. H.; Park, H. S. *et al.* (2004). Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Australian Veterinary Journal*, 82(1-2), 83-86.

Silva, M. C.; Figuera, R. A.; Brum, J. S.; Graça, D. L.; Kommers, G. D.; Irigoyen, L. F. & Barros, C. S. L. (2007). Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(5), 215-220.

Silva, M. C.; Figuera, R. A.; Mazzanti, A.; Brum, J. S.; Pierezan, F. & Barros, C. S. L. (2009). Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(8), 643-652.

Singh, P. & Williams, D. J. (2008). Cell therapies: realizing the potential of this new dimension to medical therapeutics. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(6), 307-319.

Soares, M. B.; Garcia, S. & Santos, R. R. (2007). Células-tronco adultas. In: M. M. Morales (Ed.), *Terapias Avançadas – Células-Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde* (1ª ed., pp. 25-38). São Paulo: Atheneu.

Spencer, N. D. & Lopez, M. J. (2011). In vitro adult canine adipose tissue-derived stromal cell growth characteristics. *Methods in Molecular Biology*, 702, 47-60.

Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L. & Bernardi, M. M. (2011). *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (5ª ed., 918 p.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Summers, B. A.; Cummings, J. F. & de Lahunta, A. (1995). *Veterinary Neuropathology* (1ª ed., 527 p.). St Louis: Mosby.

Swango, L. J. (1997). Moléstias virais caninas. In: S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato* (4ª ed., pp. 573-588). São Paulo: Manole.

Takemitsu, H.; Zhao, D.; Yamamoto, I.; Harada, Y.; Michishita, M. & Arai, T. (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BioMed Central Veterinary Research*, 8(150), 1-9.

Tipold, A.; Vandeveld, M. & Jaggy, A. (1992). Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, 33(10), 466-470.

Tohma, Y.; Ohgushi, H.; Morishita, T.; Dohi, Y.; Tadokoro, M.; Tanaka, Y. & Takakura, Y. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal cells can rescue osteogenic capacity of devitalized autologous bone. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(1), 61-68.

Tsirogianni, A. K.; Moutsopoulos, N. M. & Moutsopoulos, H. M. (2006). Wound healing: immunological aspects. *Injury*, 37S, S5-S12.

Tudury, E. A.; Arias, M. V. B.; Bracarense, A. P. F. L.; Megid, J. & Júnior, R. F. D. (1997). Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. *Ciência Rural*, Santa Maria, 27(2), 229-235.

Uccelli, A.; Benvenuto, F.; Laroni, A. & Giunti, D. (2011). Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 24(1), 59-64.

Vandeveld, M. & Cachin, M. (1993). The neurologic form of canine distemper. In: *Current Veterinary Therapy XI Small Animal Practice*. Saunders Elsevier.

Vats, A.; Tolley, N. S.; Polak, J. M. & Buttery, L. D. (2002). Stem cells: sources and applications. *Clinical Otolaryngology*, 27(4), 227-232.

Vidal, M. A.; Kilroy, G. E.; Lopez, M. J.; Johnson, J. R.; Moore, R. M. & Gimble, J. M. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surgery*, 36(7), 613-622.

Wagers, A. J. & Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639-648.

Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J. *et al.* (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), 1402-1416.

Webster, R. A.; Blaber, S. P.; Herbert, B. R.; Wilkins, M. R. & Vesey, G. (2012). The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *New Zealand Veterinary Journal*, 60(5), 265-272.

Willoughby, K. & Dawson, S. (2001). Viral infections: canine distemper. In: I. Ramsey & B. Tennant (Eds.), *Manual of Canine and Feline Infectious Diseases* (1ª ed., pp. 104-107). Edimburgo: BSAVA.

Yarak, S. & Okamoto, O. K. (2010). Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(5), 647-656.

Zago, M. A. (2006). Células-tronco: origens e propriedades. In: M. A. Zago & D. T. Covas (Eds.), *Células-tronco: a Nova Fronteira da Medicina* (1ª ed., pp. 3-20). São Paulo: Atheneu.

Zucconi, E.; Vieira, N. M.; Bueno, D. F.; Secco, M.; Jazedje, T.; Ambrosio, C. E.; Passos-Bueno, M. R. *et al.* (2010). Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*, 19(3), 395-402.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P. *et al.* (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228.

ANEXOS

ANEXO I – FICHA DE RECOLHA DE DADOS



A preencher pela Regenera Stem Cells:

1- Identificação do animal:

Nome: _____

Sexo: Macho ☐

Fêmea ☐

Idade: _____

Raça: _____

Vacinação completa:

Sim ☐

Se respondeu sim, indique se o animal está vacinado com vacinadas certificadas ou não certificadas: _____

Não ☐

Se respondeu não, indique com quantas doses o animal foi vacinado:



2- Há quanto tempo o animal apresentava as sequelas neurológicas até receber a primeira aplicação de células estaminais?

3- Quantas aplicações de células estaminais foram realizadas?

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4- Qual a via de acesso utilizada no tratamento?

5- O exame utilizado para o diagnóstico da esgana foi o RT-PCR?

6- O animal exerceu alguma terapia complementar?

Sim ☐ Qual/Quais? _____

Não ☐

7- Indique a condição do animal no dia do primeiro transplante com células estaminais, relativamente ao(s):

✓ Estado mental: _____

✓ Marcha dos membros torácicos: _____

✓ Marcha dos membros pélvicos: _____

✓ Sequelas neurológicas: _____

8- Indique a condição do animal no dia do segundo transplante com células estaminais, relativamente ao(s):

✓ Estado mental: _____

✓ Marcha dos membros torácicos: _____

✓ Marcha dos membros pélvicos: _____

✓ Sequelas neurológicas: _____

9- Indique a condição do animal no dia do terceiro transplante com células estaminais, relativamente ao(s):

✓ Estado mental: _____

✓ Marcha dos membros torácicos: _____

✓ Marcha dos membros pélvicos: _____

✓ Sequelas neurológicas: _____

10- Indique a condição do animal 30 dias após o terceiro transplante com células estaminais, relativamente ao(s):

✓ Estado mental: _____

✓ Marcha dos membros torácicos: _____

✓ Marcha dos membros pélvicos: _____

✓ Sequelas neurológicas: _____