

JÉSSICA MARIA NUNES RORIGUES CORREIA

**ABORDAGEM À MIELOPATIA DEGENERATIVA
COM A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS**

Orientador: Professor Doutor Lénio Ribeiro
Coorientador: Dra. Ângela Martins

**Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2023

JÉSSICA MARIA NUNES RORIGUES CORREIA

ABORDAGEM À MIELOPATIA DEGENERATIVA COM A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, no dia 21/04/2023, com o despacho de nomeação de Júri nº 194/2023 com a seguinte composição de Júri:

Presidente: Prof. Doutor David Ramilo, por delegação
da professora Prof^a. Doutora Laurentina Pedroso
Arguente: Prof^a. Doutora Ana Collete
Orientador: Prof^o. Doutor Lénio Ribeiro

**Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2023**

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e a todos os meus professores, pela aprendizagem e experiências vividas ao longo destes anos.

Às minhas amigas da faculdade Joana Santos, Ana Margarida, Ana Rita, Patrícia Roças e Joana Pacheco por demonstrarem o quanto a vida académica é bonita e, sim, amigos da faculdade ficam connosco para a vida inteira.

À minha melhor amiga, Eliane Airosa, por me ter acompanhado estes anos todos e ter estado comigo nos piores e melhores momentos e nunca me fazer desistir do meu sonho.

À Soraia Domingues por ser uma “irmã mais velha” e ter sempre acreditado em mim, desde o primeiro instante e dar os melhores conselhos e lições de vida.

À Sara Fonseca por todas as risadas partilhadas, todos as conversas e por me fazer sentir menos sozinha neste percurso.

Às minhas amigas Cátia Silva, Ana Pereira, Inês Loureiro e Inês Esteves por me terem apoiado nesta nova fase da minha vida e permitirem eu ser uma melhor pessoa, tanto a nível profissional quanto pessoal.

Às minhas amigas de secundário Rafaela Brito, Carolina Torres, Cláudia Candeias por serem o meu porto seguro desde o início e, mesmo em percursos diferentes, sempre me apoiaram até ao final.

Às minhas amigas de infância, Carolina Almeida e Rita Leonardo, por serem amigas da “menina diferente” e me aturarem estes anos todos.

À minha nova família...a equipa do HVA e CRAA por me terem ensinado o significado de ser uma boa médica veterinária e me permitirem crescer, tanto a nível profissional como pessoal.

À minha família...avó Paula, mãe Dina, Joyce, Omar, Tia Suzete...obrigada por estarem sempre comigo.

À Catarina, Ricardo e Senhor Carlos por me terem aberto as portas da sua casa e me tratarem como família desde o primeiro momento.

À Dra. Ângela Martins, pela inspiração, garra, ensinamentos, por se ter tornado como uma mãe e mesmo com as minhas “birras” e inseguranças...nunca me fez desistir de mim e do que eu acreditava.

Ao meu orientador, Doutor Professor Lénio Ribeiro que me acompanhou e orientou na elaboração da dissertação.

Aos meus 4 patudos, Daisy, Pantufa, Snoopy e Zuri, por demonstrarem o amor incondicional que tenho por esta profissão.

À minha mãe maravilhosa por ser incansável, nunca desistir de mim e por acreditar desde a primeira vez que disse queria ser “médica dos animais”.

Ao meu pai, Mário, mesmo já não estando aqui, estaria muito orgulhoso do meu percurso e de onde esteja...consiga acompanhar o resto das conquistas que virão.

Resumo

A mielopatia degenerativa (MD) é uma doença neurodegenerativa em cães, de idade média a avançada. Os sinais clínicos são desde ataxia propriocetiva a paraparésia não ambulatoria assimétrica.

O objetivo foi avaliar a importância de protocolos de neuroreabilitação funcional intensivos (PNRFI) associados à administração de células estaminais (CE) no tempo de sobrevivência e qualidade de vida dos doentes. Foram incluídos 18 cães com diagnóstico por exclusão de MD, 11 constituíram o grupo de estudo (GE) e 7 o grupo de controlo (GC). No GE, os cães foram submetidos a PNRFI+CE, enquanto no GC a PNRF. Os protocolos incluíram electroestimulação e treino locomotor.

A amostra foi de 12 machos e 6 fêmeas, com idade média de 10,44 anos, peso médio de 31,56 kg e 10 cães possuíam genótipo heterozigótico e 8 homozigótico.

Os resultados demonstraram que PNRFI+CE, prolongam o tempo médio de vida, em cerca de 13 meses (396 dias). No GE foi observado 55% de sobrevivência no tempo ≥ 1 ano. Enquanto no GC, 100% em < 1 ano, sendo a comparação entre grupos representada em $X^2(2, n=18)=0,057$. No GE o último *follow up* com o teste genético obteve significância de $X^2(2, n=11)=0,022$, pois os homozigóticos têm pior prognóstico.

Em conclusão, a implementação de PNRFI+CE evidenciou ser possível terapêutica. Estudos futuros serão necessários.

Palavras-chave: cães, células estaminais, mielopatia degenerativa, protocolos de neuroreabilitação funcional intensivos, tempo médio de vida

Abstract

Degenerative myelopathy (DM) is a neurodegenerative disease in dogs of middle to advanced age. Clinical signs range from proprioceptive ataxia to asymmetrical non-ambulatory paraparesis.

The objective was to evaluate the importance of intensive functional neurorehabilitation protocols (PNRFI) associated with the administration of stem cells (SC) in the survival time and quality of life of patients. Eighteen dogs diagnosed by exclusion of DM were included, 11 constituted the study group (SG) and 7 the control group (CG). In the SG, the dogs were submitted to PNRFI+SC, while in the CG, the PNRF. Protocols included electrostimulation and locomotor training.

The sample consisted of 12 males and 6 females, with a mean age of 10.44 years, mean weight of 31.56 kg and 10 dogs had heterozygous and 8 homozygous genotypes.

The results showed that PNRFI+SC prolongs the average life span by about 13 months (396 days). In the SG, 55% survival was observed in time ≥ 1 year. While in the CG, 100% in < 1 year, with the comparison between groups represented in $X^2(2, n=18)=0.057$. In the SG, the last follow-up with the genetic test obtained a significance of $X^2(2, n=11)=0.022$, as homozygotes have a worse prognosis.

In conclusion, the implementation of PNRFI+SC proved to be a possible therapy. Future studies will be needed.

Key words: dogs, stem cells, degenerative myelopathy, intensive functional neurorehabilitation protocols, mean life span

Lista de abreviaturas

MD – Mielopatia Degenerativa

CE – Células estaminais

PNRFI- Protocolo de Neuroreabilitação Funcional Intensivo

PNRF- Protocolo de Neuroreabilitação Funcional

HVA – Hospital Veterinário da Arrábida

CRAA- Centro de Reabilitação da Arrábida

NMS – Neurónio Motor Superior

NMI- Neurónio Motor Inferior

GE – Grupo de Estudo

GC -Grupo de Controlo

S- *Study*

C- *Control*

CNRF – Consulta de Neuroreabilitação Funcional

SDP- Sensibilidade à Dor Profunda

TRA – Treino Locomotor Aquático

TRT – Treino Locomor Terrestre

EE – Eletroestimulação

FES- Estimulação Elétrica Funcional

NMES- Estimulação Elétrica Neuromuscular

TL- Treino Locomotor

TLs- Terapia laser

ROM- Amplitude articular

IV- Intravenoso

ICETAS- Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto

OFS- Open Field Score

CEM- Células estaminais mesenquimatosas

pNFH- Cadeia pesada de neurofilamento fosforilado

ELA- Esclerose Lateral Amiotrófica

SOD1- Superóxido dismutase

LC- Líquido cefalorraquidiano

FES- Estimulação elétrica funcional

NMES- Estimulação elétrica neuromuscular

DDV- Doença do Disco Intervertebral

T3- Terceiro segmento torácico

L3- Terceiro segmento lombar

Índice Geral

Índice de Figuras.....	13
Índice de Anexos e Apêndices	15
Capítulo I- Relatório do Estágio Curricular	16
1.Descrição do estágio curricular.....	16
1.2 Casuística	16
1.3 Espécie animal	17
1.4 Área clínica	17
1.4.1- Medicina Física e de Reabilitação Funcional	18
1.4.2 Medicina interna	18
1.4.3. Clínica Cirúrgica.....	19
1.4.4. Medicina de urgência.....	20
1.4.5. Medicina Preventiva	20
1.4.6. Exames complementares de diagnóstico.....	20
Capítulo II	22
1- Introdução	22
1.1. Mielopatia degenerativa canina	22
1.1.1 – Raça, idade e género na mielopatia degenerativa	22
1.1.2- Etiologia da mielopatia degenerativa.....	23
1.1.3 Mutação SOD1.....	25
1.1.3.1 Mutação heterozigóticos	27
1.1.4 Diagnóstico	28
1.1.4.1 Diagnósticos diferenciais	28
1.1.5 Histopatologia da mielopatia degenerativa	30
1.1.5.1 Histopatologia da medula espinhal	30
1.1.5.2. Histopatologia do encéfalo	31
1.1.5.3 Histopatologia dos músculos e nervos.....	31
1.1.6 Apresentação clínica da mielopatia degenerativa	32
1.1.7 Esclerose lateral amiotrófica.....	33
1.1.8 Terapêutica clínica da mielopatia degenerativa	34
1.1.8.1. Electroestimulação	36
1.1.8.2. Terapia de laser	38
1.1.8.3. Treino locomotor.....	39
1.2 Medicina Regenerativa.....	40
1.2.1 Classificação das células estaminais	41
1.2.1.1 Potencial de diferenciação das células estaminais	41
1.2.1.2. Origem das células estaminais	41
1.2.2 Células mesenquimatosas na medicina regenerativa	42
1.2.3 Aplicações das células estaminais mesenquimatosas.....	43
Capítulo III.....	45
1. Objetivo do estudo	45
1.1 – Material e Métodos	45

1.2- Apresentação da amostra populacional.....	45
1.3- Desenho do estudo.....	47
1.4 Protocolos de Neuroreabilitação Funcional	48
1.5. Treino locomotor no grupo de estudo.....	49
1.6 Treino locomotor no grupo de controlo	50
1.7- Electroestimulação no grupo de estudo.....	51
1.8- Electromioestimulação no grupo de controlo	52
1.9- Protocolo de administração de células estaminais.....	53
1.10 - Administração das células estaminais.....	54
1.11-Monitorização Clínica do Estudo	55
1.12 Recolha dos dados clínicos	57
1.13 - Análise Estatística.....	58
Capítulo IV- Resultados	58
Capítulo V- Discussão.....	67
Capítulo VI- Conclusão	71
Capítulo VII - Referências bibliográficas	72
Apêndices	I

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Distribuição da Casuística por Espécie Animal.....	17
Gráfico 2- Histograma relativo à distribuição da amostra populacional relativamente ao peso (Kg).....	60
Gráfico 3- Histograma relativo à distribuição da amostra populacional relativamente à idade (anos)	61
Gráfico 4- Evolução do Grupo de Estudo quanto à sua escala de classificação OFS	62
Gráfico 5- Evolução do Grupo de Controlo quanto à ambulância.....	64
Gráfico 6- Evolução média dos doentes do grupo de estudo e grupo de controlo quanto á sua ambulância ao longo do tempo.	65

Índice de Figuras

Figura 1- Ressonância magnética da medula espinhal num Pastor Alemão com MD (a,b,d) em comparação com um Pastor Alemão com doença do disco intervertebral tipo II (c,e).....	29
Figura 2- Apresentação clínica da mielopatia degenerativa.....	33
Figura 3- Algoritmo representativo do estudo clínico. DDV: doença do disco intervertebral, PNRFI: Protocolo de Neuroreabilitação Intensivo, PNRF: Protocolo de Neuroreabilitação Funcional. Monitorizações: T0= entrada no estudo; T1= administração de células estaminais; T2= alta médica; <i>Follow ups</i> : oito dias (1 FU), quinze dias (2 FU) e, posteriormente, a cada mês.	48
Figura 4- Exemplo de estimulação elétrica funcional.....	52
Figura 5- Procedimento da administração das células estaminais	55
Figura 6- Seringa com células estaminais cedidas pelo Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto (ICETA).....	55
Figura 7- Diagrama de monitorizações do grupo de estudo (GE) e controlo (GC). FU: Follow up, PNRFI: Protocolo de neuroreabilitação funcional intensivo. PNRF: Protocolo de neuroreabilitação funcional.....	56
Figura 8- Histograma relativo à distribuição da amostra populacional relativamente à idade (anos) Média = 10,44.....	61
Figura 9- Histograma relativo à distribuição da amostra populacional relativamente à idade (anos) Média = 10,44.....	61
Figura 10- Evolução dos doentes do Grupo de Estudo ao longo dos momentos temporais	63
Figura 11- Evolução dos doentes do Grupo de Controlo ao longo dos momentos temporais.	64

Índice de Tabelas

Tabela 1- Distribuição da Casuística por Área Clínica (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta	17
Tabela 2- Distribuição da Casuística na Área de Medicina Física e de Reabilitação Funcional (%).FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta.....	18
Tabela 3- Distribuição da Casuística na Área de Medicina Interna (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta	19
Tabela 4- Distribuição da Casuística na Área de Clínica Cirúrgica (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta	20
Tabela 5- Distribuição da Casuística na Área de Medicina Preventiva (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta	20
Tabela 6- Distribuição da Casuística correspondente aos Exames Complementares de Diagnóstico (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta	21
Tabela 7- Treino Locomotor do grupo de estudo e grupo de controlo. I: Intensidade do TRT+ TRA; F: Frequencia TRT+ TRA; Duração do TRT + TRA	51
Tabela 8- Eletroestimulação do grupo de estudo e grupo de controlo. EE: Eletroestimulação; FES: Estimulação elétrica funcional; EEM: eletromioestimulação motora; FT:Frequência do tratamento	52
Tabela 9- Escala de classificação de marcha OFS (adaptado de Olby,2001; Olby 2014)	56
Tabela 10- Análise da distribuição quanto à idade e peso da amostra populacional global. DP: Desvio Padrão, SEM: <i>std error of mean</i>	59
Tabela 11- Análise da Distribuição quanto à idade e peso do grupo de estudo. DP: Desvio Padrão; SEM: <i>std error of mean</i>	59
Tabela 12- Análise da Distribuição quanto à idade e peso do grupo de controlo. DP: Desvio Padrão. SEM: <i>std error of mean</i>	60
Tabela 13- Evolução dos doentes no grupo de estudo segundo a OFS, ao longo dos momentos temporais (T0,T1, T2, 1FU, UFU)	62
Tabela 14- Estatística descritiva do tempo médio de vida (meses) relativamente ao Grupo de Controlo e ao Grupo de Estudo.....	66
Tabela 15- Estatística descritiva do tempo de sobrevivência (anos) relativamente à população total, grupo de estudo e ao grupo de controlo.....	66

Índice de Anexos e Apêndices

Anexo 1- Doenças espinhais comuns com base no acrónimo VITAMIN-D (adaptado de Costa & Moore, 2010)	I
Anexo 2- Termo de consentimento para entrada no estudo de Mielopatia Degenerativa.....	II

Capítulo I- Relatório do Estágio Curricular

1.Descrição do estágio curricular

O presente relatório tem como principal objetivo a descrição das atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, durante os meses de Outubro de 2020 até Março de 2021. O estágio foi realizado no Hospital Veterinário da Arrábida (HVA) e no Centro de Reabilitação Animal (CRAA) sob a orientação da Dra. Ângela Martins. O período de estágio teve a duração de 6 meses e focou-se nas áreas de reabilitação, medicina interna e cirurgia de animais de companhia.

Durante este período de estágio foi possível acompanhar consultas de neuro-reabilitação funcional, cirurgias, acompanhamento de consultas de medicina interna e realização de procedimentos inerentes ao regime hospitalar e internamento, nomeadamente, administração de fármacos, monitorização de doentes e realização de procedimentos terapêuticos.

Na área de clínica cirúrgica foram realizadas avaliações pré-cirúrgica, elaboração e execução de protocolos anestésicos e realização de tarefas como ajudante de cirurgião e circulante.

Dentro da área de medicina física e de reabilitação funcional foi possível o acompanhamento da primeira consulta de especialidade, observação do exame de neuroreabilitação, diagnóstico e respetivo protocolo. Dentro destes protocolos encontravam-se os diferentes tipos de modalidades terapêuticas, nomeadamente: laserterapia classe IV, eletromioestimulação, ultrasons, capacitivo/diatermia, exercícios de cinesioterapia, treino locomotor aquático e terrestre.

O estágio permitiu a aquisição de novos conhecimentos relacionados à prática clínica, bem como, a aplicação e consolidação de conhecimentos aprendidos ao longo do curso.

1.2 Casuística

A presente casuística apresenta-se dividida em cinco áreas clínicas: medicina interna, medicina preventiva, clínica cirúrgica, medicina de urgências e, por fim, medicina física e reabilitação funcional. Para cada área são apresentados o número de casos observados por espécie, a frequência absoluta (FA), frequência relativa (FR).

Os dados apresentados foram baseados no número de casos observados e não no número de animais, uma vez que o mesmo doente pode apresentar mais de uma doença e ter necessitado de realizar exames complementares de diagnóstico.

1.3 Espécie animal

A casuística observada durante o período de estágio está dividida em canídeos e felídeos. No gráfico 1, a espécie mais frequentemente observada foram os cães (76%) e, com menor percentagem, os gatos (20%).

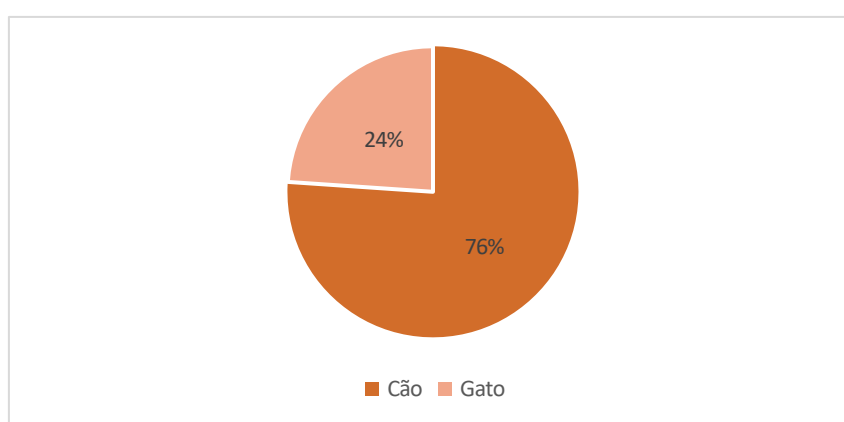


Gráfico 1- Distribuição da Casuística por Espécie Animal

1.4 Área clínica

A casuística apresenta-se dividida consoante as áreas de intervenção, sendo, a medicina física e de reabilitação funcional (40,08%) a área com maior destaque, seguida de medicina interna (28,24%), medicina de urgências (14,50%), clínica cirúrgica (11,20%) e, por fim, medicina preventiva (5,98%).

Tabela 1- Distribuição da Casuística por Área Clínica (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta

Área Clínica	Cão	Gato	Total	
	FA	FA	FA	FR
Medicina Interna	256	188	444	28,24%
Medicina Preventiva	64	30	94	5,98%
Medicina Física e Reabilitação Funcional	570	60	630	40,08%
Clínica Cirúrgica	128	48	176	11,20%
Medicina de Urgência	178	50	228	14,50%
Total	1196	376	1572	100,00%

1.4.1- Medicina Física e de Reabilitação Funcional

Na área de medicina física e de reabilitação funcional abrange doenças de foro neurológico e ortopédico/musculoesquelético. Na tabela 2 é possível observar que as doenças de foro neurológico possuem um maior número de casos observados durante o período estágio.

A doença neurológica mais frequentemente observada foi a hérnia discal de Hansen tipo I, comum em raças condrodistróficas. As hérnias tipo II foram menos recorrentes, seguindo-se as doenças como síndrome vestibular periférica, tromboembolismo fibrocartilaginoso e as discoespondilites.

A nível ortopédico observou-se casos de displasia da anca e osteoartrite, principalmente em animais de porte médio a grande e/ou geriátricos.

Tabela 2- Distribuição da Casuística na Área de Medicina Física e de Reabilitação Funcional (%).FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta

	Cão	Gato	Total	
Medicina Física e de Reabilitação Funcional	FA	FA	FA	FR
Neurológico	220	25	245	60,05%
Ortopédico	130	33	163	39,95%
Total	350	58	408	100,00%

1.4.2 Medicina interna

Na tabela 3, as especialidades mais observadas ao longo do estágio foram a neurologia (18,85%), ortopedia e doenças músculo-esqueléticas (15,06%) e, por fim, oncologia (11, 05%). A elevada prevalência destas especialidades pode ser atribuída ao facto de que o HVA/CRAA ser um centro de referência na área de medicina de reabilitação funcional e possuir um elevado número de doentes geriátricos, permitindo também uma maior prevalência de doenças oncológicas. Estes doentes geriátricos admitidos no HVA/CRAA acometem outro tipo de doenças dermatológicas, relacionadas com o estado imunossuprimido e estado de mobilidade reduzido dos animais internados no centro.

Tabela 3- Distribuição da Casuística na Área de Medicina Interna (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta

	Cão	Gato	Total	
Medicina Interna	FA	FA	FA	FR
Cardiologia	24	16	40	4,33%
Dermatologia	55	20	75	8,13%
Doenças Infeciosas e Parasitárias	55	30	85	9,21%
Endocrinologia	27	10	37	4,01%
Gastroenterologia e Glândulas Anexas	48	22	70	7,58%
Ginecologia, Andrologia e Obstetrícia	21	9	30	3,25%
Neurologia	125	49	174	18,85%
Oftalmologia	15	13	28	3,03%
Oncologia	60	42	102	11,05%
Ortopedia e Músculo-esquelético	105	34	139	15,06%
Otorrinolaringologia	12	3	15	1,63%
Pneumologia	43	30	73	7,91%
Toxicologia	15	4	19	2,06%
Urologia e Nefrologia	25	11	36	3,90%
Total	630	293	923	100,00%

1.4.3. Clínica Cirúrgica

A área de cirurgia encontra-se dividida em cirurgia ortopédica e cirurgia de tecidos moles. Como pode ser observado na Tabela 4, as cirurgias de tecidos moles apresentaram maior prevalência, tanto em canídeos como em felídeos, sendo as orquiectomias e ovariectomias as cirurgias mais observadas durante o período de estágio. Enterotomias/enterectomias, mastectomias, noduloectomias, esplenectomias, entre outras foram observadas com menor regularidade.

Tabela 4- Distribuição da Casuística na Área de Clínica Cirúrgica (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta

	Cão	Gato	Total	
Clínica Cirúrgica	FA	FA	FA	FR
Cirurgia de Tecidos Moles	217	25	242	56,94%
Cirurgia Ortopédica	150	33	183	43,06%
Total	367	58	425	100,00%

1.4.4. Medicina de urgência

Durante o período de estágio, as urgências foi a quarta maior área observada, sendo as urgências respiratórias, politraumáticas, neurológicas (intracranianas e medulares) e intoxicações as mais representativas desta medicina (5, 61%).

1.4.5. Medicina Preventiva

A medicina preventiva foi a área com o menor número de casos observados em comparação com as outras áreas de medicina. Dentro desta área estão englobados os procedimentos de profilaxia, como desparasitações internas e vacinações, como representado na Tabela 5.

Tabela 5- Distribuição da Casuística na Área de Medicina Preventiva (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta

	Cão	Gato	Total	
Medicina Preventiva	FA	FA	FA	FR
Desparasitações	24	10	34	36,17%
Vacinas	40	20	60	63,83%
Total	64	30	94	100,00%

1.4.6. Exames complementares de diagnóstico

Na Tabela 6, estão representados o número de exames complementares realizados ao longo do período de estágio, sendo as análises hematológicas (18,87%) e bioquímicas (22,28%)

os exames com mais prevalência uma vez que, constituem o painel básico para uma avaliação inicial de um doente. O eletrocardiograma (17,23%) destacou-se dos outros exames, uma vez que faz parte do protocolo de monitorização inicial de todos os doentes internados, juntamente com a medição de parâmetros vitais, em doentes cardíacos, geriátricos e cuidados intensivos.

Por fim, a ecografia foi outro meio complementar de diagnóstico com maior destaque (16,25%), sendo utilizado em várias consultas e urgências. As técnicas com maior utilização foram as técnicas rápidas de urgência (AFAST, TFAST e POCUS), pois permite um diagnóstico eficaz e um processo de estabilização rápido em doentes em urgência.

Tabela 6- Distribuição da Casuística correspondente aos Exames Complementares de Diagnóstico (%). FR: frequência relativa, FA: Frequência absoluta

Exames complementares de diagnóstico	Cão	Gato	Total	
	FA	FA	FA	FR
Análises Bioquímicas	250	90	340	22,28%
Análises Endócrinas	37	26	63	4,13%
Ecocardiografia	25	37	62	4,06%
Ecografia (abdominal, AFAST e POCUS)	198	50	248	16,25%
Electrocardiograma	203	60	263	17,23%
Hemograma	200	88	288	18,87%
Ionograma	17	15	32	2,10%
PAAF	12	6	18	1,18%
Radiografia	80	68	148	9,70%
Tempos de Coagulação (PT e APTT)	25	12	37	2,42%
Teste de Fluoresceína	10	3	13	0,85%
Tomografia Computorizada	2	0	2	0,13%
Urianálise	8	4	12	0,79%
Total	1067	459	1526	100,00%

Capítulo II

1- Introdução

1.1. Mielopatia degenerativa canina

A mielopatia degenerativa (MD) é uma doença neurodegenerativa da medula espinhal de aparecimento progressivo e tardio que se manifesta em cães de grande porte (Coates *et al.*, 2007; Guzzi *et al.*, 2014). Um dos primeiros sinais clínicos é ataxia propriocetiva generalizada e paraparésia espástica dos membros pélvicos (Coates & Wininger, 2010). Os sinais clínicos demonstrados por estes animais são semelhantes aos apresentados na esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Awano *et al.*, 2009).

Descrita pela primeira vez em cães de raça Pastor Alemão (Averill, 1973), tem sido cada vez mais reconhecida em outras raças, afetando a região toracolombar da medula espinhal (segmento T3-L3) e caracterizando-se pela desmielinização da mesma (Neeves & Granger, 2015).

Atualmente, não existe um tratamento específico para a MD, no entanto, com a quantidade de estudos realizados na área, existem novas possibilidades de prolongar o tempo médio de vida destes doentes (Clemmons, 1992; Kathmann *et al.*, 2006; Kobatake *et al.*, 2021).

A taxa de prevalência é de 0,19% em cães de raça definida e indefinida (Coates *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2014), tendo o Pastor alemão uma prevalência específica de 2,01% (Coates *et al.*, 2007).

1.1.1 – Raça, idade e género na mielopatia degenerativa

Para além do Pastor Alemão, diversos autores descrevem esta doença em outras raças, confirmadas histologicamente, nomeadamente: Husky Siberiano (Bichsel *et al.*, 1983), Poodle Miniatura (Matthews & de Lahunta, 1985), Boxer (Awano *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Zeiler *et al.*, 2013), *Pembroke Welsh Corgi* (Coates *et al.*, 2007; March *et al.*, 2009; Ogawa *et al.*, 2011, Ogawa *et al.*, 2014), Leão da Rodésia (Awano *et al.*, 2009), *Chesapeake Bay Retriever* (Awano *et al.*, 2009, Long *et al.*, 2009), *Bouvier de Berna* (Coates & Wininger, 2010),

Kerry Blue terrier (Coates & Wininger, 2010), *Golden Retriever* (Coates & Wininger, 2010), *Pug* (Coates & Wininger, 2010), e, por último, raças indefinidas (Averill, 1973).

Segundo o diagnóstico presuntivo, há outras raças descritas, contudo sem confirmação histopatológica, tais como o *Labrador* (Kathmann *et al.*, 2006, Yokota *et al.*, 2018), *Hovawart* (Kathmann *et al.*, 2006, Turba *et al.*, 2017, Mandrioli *et al.*, 2021), *Collie* (Kohyama *et al.*, 2017, Kathmann *et al.*, 2006), *Kuvasz* (Kathmann *et al.*, 2006), *Mastiff* (Kathmann *et al.*, 2006), *Dogue Alemão* (Kathman *et al.*, 2006) e *Pastor Belga Malinois* (Mataragka *et al.*, 2021).

Um estudo correlacionou a idade, duração dos sinais clínicos, esperança média de vida e os cães da raça *Pembroke Welsh Corgi* foram os que apresentaram melhores resultados em todas as categorias (Coates *et al.*, 2007).

Geralmente, os animais afetados têm entre 5 a 14 anos (Kathmann *et al.*, 2006) e, em média, apresentam sinais clínicos aos 9 anos de idade (Coates & Wininger, 2010; Zeng *et al.*, 2014), não apresentado predisposição sexual, ao contrário de outras doenças (Coates & Wininger, 2010; Dewey & Costa, 2016).

A alta prevalência em raças específicas sugere que existe um fator genético associado à MD que, por sua vez, vai desempenhar um papel significativo na etiologia da doença (Coates *et al.*, 2007).

1.1.2- Etiologia da mielopatia degenerativa

Durante muitos anos a etiologia da MD foi desconhecida (Zeng *et al.*, 2014). Recentemente, foram realizados novos estudos nos quais a mutação do gene SOD1 terá sido implicada como uma das principais causas (Mandrioli *et al.*, 2021). O gene SOD1 apresenta-se como um homodímero, que converte radicais superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Awano *et al.*, 2009).

Quanto à etiologia da MD, existem várias possibilidades que foram colocadas como estando na base da mesma, nomeadamente, deficiências nutricionais (vitamina B12 e vitamina E) (Williams *et al.*, 1984, Williams *et al.*, 1985, Pellegrino, 2013), toxicidade (Griffiths & Duncan, 1975), causas imunomediadas (Pellegrino *et al.*, 2013). Nos parágrafos seguintes é descrita cada etiologia e os respetivos estudos inerentes a cada um.

Segundo o padrão de degenerescência segmentar progressiva dos segmentos torácicos de doentes com MD, obteve-se uma possível semelhança com a degeneração progressiva da medula espinhal devido a deficiência em vitamina B12 (degeneração combinada subaguda)

(Williams *et al.*, 1984). Contudo, ao examinar as características patológicas de ambas, estas não são completamente compatíveis (Pellegrino, 2013). A degeneração combinada subaguda apresenta lesões irregulares ou multifocais, enquanto, as lesões observadas em doentes com MD são lesões contínuas (Pellegrino, 2013). Foi, ainda, colocada a hipótese de que a doença intestinal poderia também estar relacionada com a MD, uma vez que a má absorção de nutrientes essenciais possibilitava hipovitaminose de vitamina B12 (Williams *et al.*, 1984). No entanto, foi comprovado que a introdução de cobalamina não revertia os efeitos observados da MD (Johnson *et al.*, 2000, Polizopolou *et al.*, 2008).

Com base numa condição pré-existente em humanos, a ataxia por deficiência em vitamina E, esta foi associada à apresentação da MD (Williams *et al.*, 1985). Nesta condição, existe falha na proteína de transferência de α -tocoferol, levando à retenção de vitamina E (Gabsi *et al.*, 2001). Consequentemente, há acumulação de radicais livres de O₂ que podem levar a degenerescência neural da medula espinhal, tronco cerebral e nervos periféricos (Imounan *et al.*, 2012). Posteriormente, foi descartada esta mesma hipótese demonstrando que a α -tocoferol/vitamina E não tem influência no aparecimento de MD em cães (Polizopolou *et al.*, 2008).

Com base nas lesões observadas em doentes com MD, as toxinas foram propostas como uma das causas de MD. A axonopatia distal é uma lesão secundária a uma condição tóxica ou metabólica e, geralmente, apresenta padrões simétricos (Griffiths & Duncan, 1975). No entanto, esta hipótese não foi corroborada, pois as lesões da MD não apresentavam o padrão clássico de axonopatia distal, mas sim de uma degenerescência assimétrica dos feixes da substância branca (March *et al.*, 2009).

Segundo um estudo de 1980, a resposta proliferativa estaria relacionada com o aparecimento de MD, através da diminuição de linfócitos periféricos causada por células T supressoras mutantes (Waxman *et al.*, 1980). Ao possibilitar este mecanismo, a célula mutante provocaria uma resposta imune à MD (Waxman *et al.* 1980). No entanto, esta hipótese foi descartada e conotada como improvável de ocorrer no organismo de um animal (Lorenz *et al.*, 2012).

Outra possível etiologia seria a distribuição de imunoglobina G (IgG) e do componente 3 do complemento (C3) na medula espinhal (Barclay & Haines, 1994). No estudo de Barclay & Haines, foi avaliado o tecido medular de diversas zonas, observando-se um aumento de IgG nos doentes com MD. Ainda foram observados depósitos extravasculares de IgG e C3 ao longo das bordas periféricas da medula dorsal e ventral, consistentes com zonas de maior

desmielinização (Barclay & Haines, 1994). Um outro estudo com cães de raça Welsh Corgi demonstrou a ausência de linfócitos T e B e imunoreatividade mínima ou praticamente ausente em C3 na medula espinhal de indivíduos com MD (March *et al.*, 2009). Porém, até a data não existem estudos que suportem a existência de antígenos específicos (Pellegrino *et al.*, 2013).

1.1.3 Mutação SOD1

A MD apresenta grande incidência em raças específicas, tal como já mencionado, o que poderá implicar uma forte base genética no aparecimento desta doença (Braund & Vandevelde 1978; Bichsel *et al.*, 1983).

Em 2006, surgiu novamente esta hipótese quando foi descoberto o alelo DLA-DRB1, considerado um gene candidato. Este alelo era homozigótico na raça Pastor Alemão que possuíam MD e heterozigótico em cães saudáveis (Clemmons *et al.*, 2006). Em 2007, foi comprovada a etiologia genética para MD, abordando-se a relação genética entre esta doença e a raça *Welsh Corgi* (Coates *et al.*, 2007)

Assim, a superóxido dismutase (SOD) é uma enzima envolvida na dismutase de radicais de superóxido em peróxido de hidrogénio com apresentação de três isoformas SOD: citoplasmática (SOD1), mitocondrial (SOD2) e secretada fora da célula (SOD3). A isoforma SOD1 é a envolvida no desenvolvimento da MD, possuindo diversas características, como a capacidade de não ser desnaturada a temperaturas altas, capacidade de manter a sua estabilidade numa ampla faixa de pH e ser altamente resistente. Mutações no gene SOD1 permitem alterações de conformação e função, que por sua vez, impedem o transporte de informação ao longo dos axónios (Fiszdon *et al.*, 2020).

Ao longos dos anos foram realizados diversos estudos para corroborar a hipótese genética desta doença, confirmando a mutação SOD1 (Awano *et al.*, 2009, Coates *et al.*, 2007, Chang *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014). Esta mutação ocorre no nucleótido 118, na transição de G para A, no exão 2 (SOD1:c 118 G>A) e que resulta numa mutação no E40K do gene SOD1. Nesta mutação a lisina substitui o glutamato na posição correspondente ao aminoácido 40, provocando a alteração da sua função (Awano *et al.*, 2009).

Num estudo realizado com 64 cães de raça Welsh Corgi e 418 cães de outras raças foi realizada a sequenciação para o alelo mutante A em SOD1. Este revelou uma certa significância entre o fenótipo MD e os animais homozigóticos A/A. Contudo, o genótipo homozigótico foi também detetado no grupo controlo (cães sem sinais clínicos de MD) deste estudo. O genótipo

heterozigótico A/G foi encontrado em 32% dos indivíduos do grupo de controlo, enquanto apenas 2 % foram encontrados no grupo dos animais com MD (Awano *et al.*, 2009). Um outro estudo com cães da raça Pastor Alemão, demonstrou que 76% dos cães com MD e 24% do grupo de controlo eram homozigóticos (Adams *et al.*, 2010).

Com os resultados apresentados em ambos os estudos, concluiu-se que existe uma grande probabilidade de a MD ser transmitida de forma autossómica recessiva (Awano *et al.*, 2009). No entanto, houve um número considerável de cães homozigóticos para o alelo nos grupos de controlo, que não possuíam sinais clínicos de MD. (Awano *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2010).

Do mesmo modo, foi ainda observado que havia cães com sinais clínicos de MD que não eram homozigóticos para o alelo mutante SOD1: c118A (Awano *et al.*, 2009, Adams *et al.*, 2010). Várias hipóteses foram colocadas para explicar estes resultados, sendo uma delas o fato de não terem sido realizados exames para excluir doenças como uma doença compressiva adquirida. Outra hipótese seria os animais destes estudos apresentarem uma mutação em genes não associados ao SOD1 (Pellegrino, 2013).

Por histopatologia, foi identificada uma outra mutação de SOD1 na raça *Bouvier de Berna*. Foi realizado o sequenciamento que revelou uma mutação no nucleótido 52 (transição de A-T), resultando numa mutação T18S em SOD1 (Wininger *et al.*, 2011). Esta mutação é considerada rara, pois a maioria dos animais apresenta a alteração no alelo SOD1 no nucleótido 118 (transição de G-A). Contudo, a mutação no alelo SOD1 no nucleótido 52 (transição de A-T) apresenta-se como sendo única desta raça (Wininger *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2014).

Segundo uma pesquisa recente, as duas proteínas SOD1 mutantes (E40K e T18S) são insolúveis e formam dímeros enzimaticamente ativos que permitem agregados (Crisp *et al.*, 2013). Estas conclusões apoiam o papel tóxico das isoformas das proteínas mutantes na MD. Com as alterações na própria conformação da proteína SOD1, há degenerescência neural resultando em alterações de atividade biológica e/ou propensão a formar agregados intracelulares, o que irá conferir propriedades tóxicas (Nagai *et al.*, 2001, Rothstein, 2009).

O mecanismo tóxico de SOD1 ainda é desconhecido, mas sabe-se que induz a degenerescência neuronal, envolvendo a interação de várias vias moleculares (Rothstein, 2009). Os neurónios motores afetados pela mutação SOD1 possuem uma vulnerabilidade seletiva, no entanto, não há base científica comprovada da razão para esta seletividade, sabendo-se que esta

pode estar relacionada com os requisitos necessários para manter os axónios (Shaw & Egget, 2000).

No futuro, seria promissor a realização de novas pesquisas sobre a genética molecular de MD, potenciando a identificação de genes desconhecidos responsáveis pela MD. Por conseguinte, as amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) dos cães não homozigóticos para o alelo mutante SOD1: c.118A, poderão ser uma ferramenta de extrema importância na descoberta de novas causas genéticas. Atualmente, existe uma análise do genótipo baseada na presença de SOD1: c118G, sendo este teste utilizado como forma de diagnóstico rotineiro da MD e em programas de reprodução seletiva (Zeng *et al.*, 2014).

Desta forma, com a realização de testes genéticos, os animais podem ser avaliados e classificados em 3 categorias: livre da mutação, portador heterozigótico ou homozigótico (em risco ou afetado). Um animal homozigótico pode apresentar sinais clínicos e desenvolver a doença (afetado) e o animal “em risco” possui a possibilidade de exibir a doença (Boeykens *et al.*, 2020). No entanto, os animais heterozigóticos também podem possuir a doença, ou seja, um resultado positivo demonstra apenas o risco da doença e não se de facto o animal a possui (Zeng *et al.*, 2014).

Contudo, estes testes genéticos podem ser utilizados como critério de seleção por alguns criadores, excluindo assim animais homozigóticos e heterozigóticos para a mutação e criando uma população de animais viáveis. A seleção dos animais poderá ser um risco, principalmente, em raças com números populacionais escassos, pois esta pode não se desenvolver e entrar em declínio (Wijnrocx *et al.*, 2016).

1.1.3.1 Mutação heterozigóticos

Consoante as alterações observadas na medula espinhal, cães heterozigóticos assintomáticos sofrem alterações patológicas consideradas subclínicas que se podem tornar sintomáticas (Kobatake *et al.*, 2017)). As alterações descritas são inclusões de SOD1 ao longo da medula espinhal, ou seja, a MD progride embora sem sinais clínicos (Awano *et al.*, 2009). Os tecidos nervosos dos heterozigóticos apresentam acumulação de proteínas nos neurónios, levando a efeitos tóxicos da proteína SOD1. A acumulação de proteínas é regida pela inibição da via proteossomal e, ao ser inibida, impede/ retrocede a degenerescência neural (Nakamae *et al.*, 2015). Esta fase pode ser caracterizada pela fase subclínica da MD, no entanto, a aglomeração de proteínas, pode ser derivada da idade do próprio animal (Kobatake *et al.*, 2017).

Segundo um estudo, em 2014, foram encontrados 4 cães heterozigóticos numa população de 24 cães, que desenvolveram sinais clínicos de MD. Porém, a mutação deste grupo era num nucleótido diferente (SOD1: c 52T), sendo esta mutação, geralmente só encontrada em cães de raça *Bouvier de Berna* (Zeng *et al.*, 2014).

1.1.4 Diagnóstico

1.1.4.1 Diagnósticos diferenciais

A apresentação clínica da MD é semelhante a outras doenças da medula espinhal, o que dificulta o diagnóstico definitivo. Para avaliar estes doentes é necessário realizar um exame físico completo e avaliar a localização da lesão, através de exame neurológico. Mediante a localização da lesão são realizados exames complementares para chegar a um diagnóstico definitivo. A medula espinhal pode ser dividida em quatro secções e, em termos de neuro-localização da lesão podemos considerar C1-C5, C6-T2, T3-L3 e L4-S1. Maioritariamente, as doenças espinhais ocorrem no segmento T3-L3, como por exemplo, no caso do tromboembolismo fibrocartilaginoso, malformações congénitas, o traumatismo espinhal, neoplasias e a própria MD (da Costa & Moore, 2010)

Uma das abordagens mais simples e prática é recorrer a lista de diagnósticos diferenciais de doenças espinhais, com base nos mecanismos fisiopatológicos utilizando o acrónimo VITAMIN-D ou DAMNIT-V (da Costa & Moore, 2010).

Os seguintes diagnósticos diferenciais devem ser considerados em cães idosos com suspeita de mielopatia de neuro-localização T3-L3: doença crónica do disco intervertebral de Hansen tipo II; neoplasia da medula espinhal (sarcoma, meningioma, linfoma, glioma, metástase; divertículos subaracnoides; discoespondilite; empiema espinhal; meningomielite (Neeves & Granger, 2015); síndrome da cauda equina e doenças osteo-articulares (Kneller *et al.*, 1975).

Assim, o diagnóstico *ante-mortem* depende da história clínica do doente (início e progressão dos sinais neurológicos), sinais clínicos neurológicos que indicam mielopatia de neurolocalização T3-L3, da ausência de lesão compressiva na medula espinhal e da ausência de alterações inflamatórias no líquido cefalorraquidiano (LC). O exame complementar de excelência é a ressonância magnética, porém, a tomografia computadorizada também é utilizada (Cooper *et al.*, 2014) para detetar doenças do disco intervertebral, discoespondilite e neoplasias (Neeves & Granger, 2015) (Figura 1).

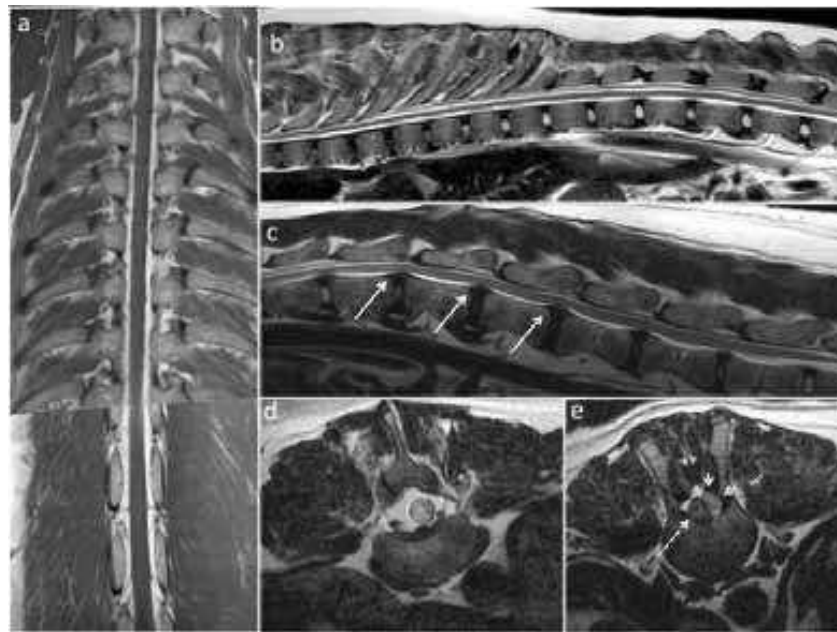


Figura 1- Ressonância magnética da medula espinhal num Pastor Alemão com MD (a,b,d) em comparação com um Pastor Alemão com doença do disco intervertebral tipo II (c,e). a) ressonância magnética em T1, vista dorsal, da medula espinhal toracolombar demonstra ausência de compressão medular ou lesões das raízes nervosas; b) vista sagital da T2 da medula espinhal a medula espinhal toracolombar demonstra ausência de compressão medular e ligeira atrofia medular; (c) vista sagital em T2 da medula espinhal toracolombar com múltiplos locais de compressão da medula espinhal devido a protusão do disco intervertebral (setas brancas) em doente sem MD; (d) vista em T1 transversal demonstra a forma normal da medula espinhal em comparação com (e) compressão da medula espinhal (seta tracejada) em um Pastor Alemão com doença do disco intervertebral e acentuado desvio da medula espinhal (setas brancas) (adaptado de Neeves & Granger, 2015).

Recentemente, como já referido, a MD pode ser diagnosticada através de um teste laboratorial, recorrendo a uma amostra de sangue onde pode ser detetada a presença de uma mutação do gene SOD1, através da reação em cadeia polimerase (PCR) (Corral, 2020).

Deste modo, para diagnosticar um doente com MD é necessária uma história clínica e sinais clínicos compatíveis com MD (Averill, 1973), a presença da mutação no gene SOD1 (Awano *et al.*, 2009) e exclusão de outras doenças da medula espinhal (Zeng *et al.*, 2014, Neeves & Granger, 2015). Porém, a MD pode coexistir com outras doenças, sendo necessário um diagnóstico mais preciso, como por exemplo através de biomarcador específico. (Toedebusch *et al.*, 2017).

Segundo um estudo realizado em 2017, um biomarcador adequado seria a cadeia pesada de neurofilamento fosforilado (pNFH) que é libertada no fluido intersticial durante uma lesão

axonal e neurodegeneração (Vu *et al.*, 2017). Os autores demonstraram que pNFH estava aumentado no LC mas, no entanto, estava diminuído no soro dos animais com MD. Embora as concentrações de pNFH no LC sejam específicas e sensíveis, a avaliação sérica das mesmas não demonstrou diferenças entre os animais saudáveis e os doentes (Toedebusch *et al.*, 2017). Também não se obteve uma correlação entre o estadio da MD e a concentração no LC, todavia, em cada estadio observou-se uma ampla concentração de pNFH (Boylan *et al.*, 2013). Steinacker *et al.*, 2015).

O diagnóstico definitivo é realizado *post-mortem* por histopatologia e observação da degenerescência da mielina e dos axónios, que pode ocorrer a vários níveis da medula espinhal e em todos os funículos. No entanto, a parte dorsal da porção lateral do funículo, medialmente ou caudalmente, da região torácica é a mais afetada (Coates & Wininger, 2010).

1.1.5 Histopatologia da mielopatia degenerativa

Tal como referido, o diagnóstico definitivo é obtido através de exame histopatológico e anatomopatológico (Joanes *et al.*, 2005) da medula espinhal, cérebro, nervos e músculos do animal (Pellegrino, 2013). Inicialmente, pensava-se que esta doença afetava unicamente os feixes medulares ascendentes e descendentes, por isso, foi descrita como uma axonopatia central da medula espinhal (Averill, 1973).

Os sinais histopatológicos são mais proeminentes na região torácica da medula espinhal, no entanto, com o decorrer da doença, progridem cranealmente e caudalmente (March *et al.*, 2009). As lesões apresentadas são descritas como bilaterais, descontínuas e assimétricas (Braund & Vandeveld, 1975). Assim, esta é classificada como uma degenerescência segmentar do axónio e da mielina, em vez de degenerescência walleriana (Coates & Wininger, 2010). Na MD existe um defeito nas células de manutenção do axónio, ou seja, os astrócitos e/ou os oligodendrócitos (March *et al.*, 2009).

1.1.5.1 Histopatologia da medula espinhal

A MD é classificada como doença não inflamatória com consequente desmielinização (Braund & Vandeveld, 1978; Averill, 1973; Coates & Wininger, 2010). As lesões apresentadas consistem em várias vacuolizações nos axónios e perda total dos perfis dos axónios e mielina, que serão substituídos por vastas áreas de astrogliose, sendo descritas como bilaterais, descontínuas e assimétricas (March *et al.*, 2009).

Inicialmente, ocorre uma degenerescência e perda axonal da medula espinhal no segmento torácico que progride para a região cervical e lombar da medula espinhal (Averill, 1973; Griffiths & Duncan, 1975; Coates & Wininger, 2010). Por sua vez, as lesões do funículo dorsal apresentam-se no fascículo grácil (March *et al.*, 2009).

1.1.5.2. Histopatologia do encéfalo

As lesões histopatológicas encontradas no cérebro não estão extensamente descritas. Segundo Johnson, as lesões apresentadas localizam-se no núcleo rubro, no vestíbulo lateral, nos núcleos cerebelares laterais (dentado) e medial (fastigial). No entanto, outros autores não observaram alterações a nível cerebral (Averill, 1973; March *et al.*, 2009).

1.1.5.3 Histopatologia dos músculos e nervos

Na MD as lesões nervosas e os sinais de neurónio motor inferior são observados tardiamente na progressão da doença. São descritos casos de cromatólise na substância cinzenta, no entanto, os nervos são descritos como normais ou exibem perda axonal esporádica (Coates & Wininger, 2010).

Recentemente, um estudo descreveu uma doença neuromuscular em cães com MD, manifestando sinais de neurónio motor inferior. Neste foi observada a perda de fibra nervosa resultante da degenerescência axonal, fibrose endoneural, fibras mielinizadas extremamente finas e desmielinização secundária (Coates & Wininger, 2010).

1.1.5.4. Stress Oxidativo

Nas lesões histopatológicas de cães com MD é normal encontrar cilindros de astrogliose (March *et al.*, 2009; Golubczyk *et al.*, 2019), ou seja, há uma ativação por parte dos astrócitos (Mandrioli *et al.*, 2021). Waxman *et al* (1980) verificaram que o sistema imunitário pode ter um papel fundamental na fisiopatologia desta doença, sendo a neuroinflamação de extrema importância na fisiopatologia da MD, de modo a ser translacionada para a fisiopatologia da ELA e outras doenças neurodegenerativas (Henkel *et al.*, 2009, Coates & Wininger, 2011).

Outro papel importante desta fisiologia é o stress oxidativo, uma vez que, os axónios são de elevada sensibilidade a mecanismos de stress e metabólicos (Toedebusch *et al.*, 2017).

Para além disso, o papel da inflamação quanto a doença ELA é o primeiro foco de investigação (Gandelman *et al.*, 2010; Lovett *et al.*, 2014). Em caso de ELA, pensa-se que a proteína SOD1 apresenta atividade da enzima capsase 1 e da interleucina (IL-1 β), na inibição de citocinas pró-inflamatórias (Aggelakis *et al.*, 2010; Lovett *et al.*, 2014) e, ainda, é associada à excitotoxicidade por glutamato, durante a passagem massiva de cálcio para dentro das células (Ogawa *et al.*, 2014). Estudos idênticos deveriam ser realizados em doentes com MD, nomeadamente, às diferenças de expressão das citocinas pró-inflamatórias, presentes no líquido cefalorraquidiano, de modo a avaliar o processo neuroinflamatório durante a progressão neurodegenerativa (Lovett *et al.*, 2014).

Durante muito tempo a MD foi classificada como uma axonopatia não inflamatória (Averill, 1973; Griffiths and Duncan, 1975; Braund and Vandeveld, 1978), justificando o atraso nas investigações do papel inflamatório para a MD.

1.1.6 Apresentação clínica da mielopatia degenerativa

Recorrentemente, os sinais clínicos iniciais da DM são confundidos com os sinais apresentados pela displasia da anca (Kneller *et al.*, 1975). No início da doença a localização neuroanatómica indica uma lesão entre o terceiro segmento torácico (T3) e o terceiro segmento lombar da medula espinhal (L3) (Coates *et al.*, 2007). Os primeiros sinais apresentados por doentes com MD são ataxia propriocetiva espástica e paraparésia assimétrica dos membros pélvicos (Nardone *et al.*, 2015). Com a evolução da doença os sinais clínicos progridem para sinais de neurónio motor inferior (NMI) dos membros pélvicos e, progressivamente, afetando também os membros torácicos. (Coates *et al.*, 2007, Kathmann *et al.*, 2006). Após o diagnóstico presuntivo, a progressão da MD pode variar e, geralmente, a maioria dos cães progride para paraparésia não ambulatória dentro de 6 a 9 meses após o aparecimento dos sinais clínicos (Coates *et al.*, 2007). Para efeitos de melhor compreensão da doença, os parágrafos seguintes irão ser divididos em sinais clínicos iniciais e sinais clínicos apresentados numa fase mais avançada da MD.

Os primeiros sinais clínicos de MD são a ataxia propriocetiva e ligeira paraparésia espástica dos membros pélvicos (Coates & Wininger, 2010). Estes sinais aparecem, sobretudo, entre os 6 e os 9 anos de idade em raças de porte grande. No exame físico é possível observar unhas gastas, claudicação dos membros pélvicos e assimetria dos mesmos (Coates *et al.*, 2007), sendo observada dificuldade em subir e descer escadas e dificuldade em calcular distâncias

(Johnston *et al.* 2001). Assim, na marcha o doente cruza os membros pélvicos e é frequente balançar a zona pélvica (Lorenz *et al.*, 2012). Também é observada paraparesia NMI nos segmentos T3 a L3 que resulta em alterações no reflexo espinhal dessa mesma localização (Averill, 1973). Os reflexos patelares podem ser normais ou aumentados, no entanto, já foram descritos casos de animais com hiporreflexia do reflexo patelar (Griffiths, 1975). O reflexo periférico flexor pode estar normal ou alterado. Recorrentemente, a doença evolui para o estado neurológico de paraparesia não ambulatória e nesta fase, alguns tutores optam pela eutanásia dos doentes (Coates & Wininger, 2010).

Tal como já referido, a progressão da doença pode conduzir a paraplegia de NMI, sendo os membros torácicos afetados (Coates *et al.*, 2007; Kathmann *et al.*, 2006). Pode, ainda, ocorrer tetraplegia flácida dos membros e a paresia tornar-se mais simétrica à medida que a doença progride. Os défices proprioceptivos são mais evidentes e a atrofia muscular torna-se generalizada. Há uma perda grave de massa muscular nos músculos devido à sua inatividade por tempo prolongado, no entanto, este sinal só é observado nos estádios finais da MD. Estes cães apresentam alterações a nível dos nervos cranianos, tais como, dificuldade em deglutir e incapacidade de ladrar (Coates *et al.*, 2007; Awano *et al.*, 2009) e, na fase terminal da doença, incontinência urinária e fecal (Averill, 1973). Na figura 2 é representado, em forma de esquema, a evolução dos sinais clínicos de um animal com MD ao longo do tempo.

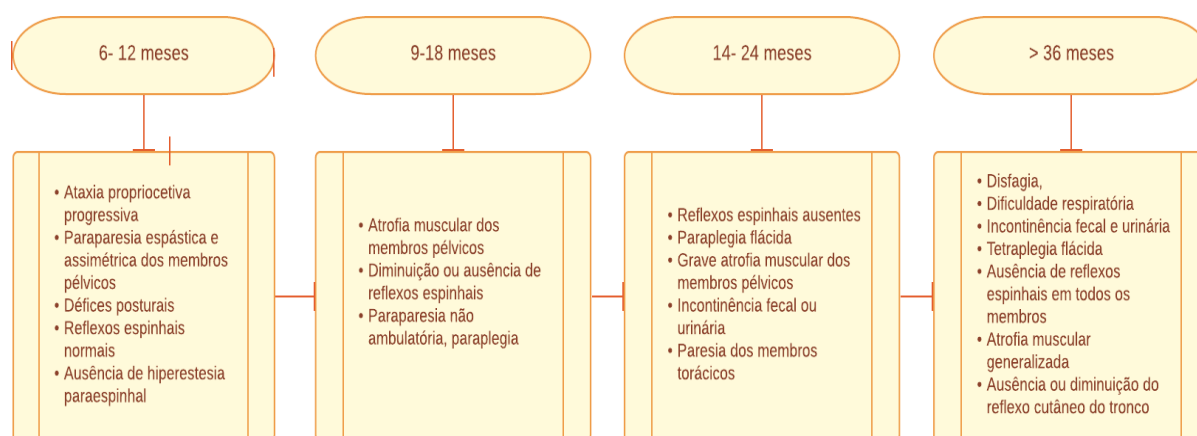


Figura 2- Apresentação clínica da mielopatia degenerativa (adaptado de Coates & Wininger, 2010)

1.1.7 Esclerose lateral amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença degenerativa dos neurónios motores centrais e periféricos. Com a progressão da doença, ocorre o aparecimento de défices motores, falência dos músculos respiratórios e deglutição (Gordon, 2013).

Maioritariamente, os casos de ELA são esporádicos, sendo 5-10% de causa genética (Leigh, 2007). É uma doença autossómica dominante, no entanto, há uma ligeira percentagem de doentes autossómicos recessivos (Coates *et al.*, 2010). Recentemente, foi explorada a hipótese da exposição à radiação, poluentes tóxicos e metais pesados serem uma possível causa da ELA (Ash *et al.*, 2019). A interação entre fatores ambientais, vias genéticas e moleculares potencia o desenvolvimento desta doença (Bennett *et al.*, 2019; Jimenez-Pacheco *et al.*, 2017).

A apresentação clássica clínica desta doença é caracterizada pelo envolvimento dos músculos bulbares, membros torácicos e músculos respiratórios. É reconhecida como uma doença heterogénica, pois possui vários fenótipos consoante a localização das lesões de neurónio motor superior (NMS) ou neurónio motor inferior (NMI) (Simone *et al.*, 2020).

O diagnóstico da ELA é realizado pela história clínica e exames complementares, nomeadamente, análise do líquido cefalorraquidiano e ressonância magnética (Masrori *et al.*, 2020).

O tratamento desta doença é baseado no manejo multidisciplinar que se foca em minimizar os sinais clínicos adquiridos pela doença, dando uma melhor qualidade de vida e aumento do tempo de sobrevivência dos pacientes (Mathis *et al.*, 2016).

A interligação entre MD e ELA são as semelhanças genéticas que ambas as doenças apresentam, ou seja, a mutação no nucleótido SOD1 (Nardone *et al.*, 2015). Em ELA aproximadamente 20% dos casos apresentam a mutação SOD1 (Valdmanis *et al.*, 2009).

Assim sendo, são realizados vários estudos clínicos em animais para avaliar os mecanismos patofisiológicos da ELA. Estes ensaios são realizados em roedores, contudo, modelos caninos possuem várias vantagens (Rakhit *et al.*, 2002). Os cães não apresentam uma elevada expressão da mutação de SOD1, ou seja, não são induzidos processos patológicos diferentes dos doentes com ELA. Os resultados dos estudos realizados em cães com MD permitem uma melhor compreensão da eficácia das intervenções terapêuticas no tratamento da ELA (Coates *et al.*, 2010).

1.1.8 Terapêutica clínica da mielopatia degenerativa

Atualmente, não há literatura descrita sobre o tratamento eficaz para a MD. Uma das primeiras abordagens realizada é o manejo médico após a apresentação dos primeiros sinais clínicos, recorrendo a anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ou corticosteroides. O anti-inflamatório de eleição na MD é a prednisolona, pois ajuda no manejo de sinais neurológicos, no entanto há pouca evidência que o uso de corticosteroides retroceda a progressão da doença (Corral, 2020).

Um possível protocolo inicial será a combinação de exercícios ativos, suplementação vitamínica com vitamina B e vitamina E, ácido aminocapróico e N-acetilcisteína (Clemmons, 1992; Dewey & Costa, 2016). O ácido aminocapróico atua no bloqueio das vias de inflamação e reduz a degradação de fibrina (Clemmons, 1992). Por sua vez, a N-acetilcisteína é um precursor da glutatona e elimina radicais livres, o que impede a ativação de enzimas que causam lesões nos tecidos (Boothe, 2001). A utilização de vitaminas permite a melhoria de cães com MD, pois inibe a libertação de prostaglandinas e citoquinas, que por sua vez, atuam na cascata de inflamação (Clemmons, 1992).

A neuroreabilitação demonstrou ser essencial no manejo da MD, pois aumenta o tempo médio de vida e a qualidade de vida dos doentes. Quando os doentes com MD não são submetidos a um manejo multimodal, a progressão da doença atinge o estágio final dentro de 6 meses após o diagnóstico inicial (Clemmons, 1992; Polizopoulou *et al.*, 2008). Um estudo realizado por Kathmann e colaboradores (2006), relatou que a fisioterapia diária prolongou o tempo de sobrevivência dos cães afetados. O estudo era composto por 22 cães com MD que receberam vários níveis de fisioterapia. O protocolo consistia em exercícios ativos e passivos, independentemente da progressão da doença. Cães com um protocolo intensivo de fisioterapia demonstraram maior tempo de sobrevivência (8 meses), relativamente aos cães submetidos a um protocolo moderado (4 meses) ou sem protocolo (1 mês) (Kathmann *et al.*, 2006).

Um outro estudo enunciou que dos cães submetidos ao mesmo protocolo descrito por Kathmann em 2001, 15-20% não demonstraram agravamento do estado geral, sobrevivendo alguns por mais 4 anos (Polizopoulou *et al.*, 2008).

O prognóstico da MD continua a ser reservado e, na maioria dos casos, os cães são eutanasiados entre 6 a 12 meses após os primeiros sinais clínicos. Segundo um estudo realizado na raça de *Pembroke Welsh Corgis*, o tempo médio de vida destes animais é de 1,25 anos (Coates *et al.*, 2007).

A reabilitação poderá ser uma componente de elevada importância na melhoria de cães afetados com doenças neurológicas, pois melhora a qualidade de vida do animal

substancialmente (Kathamann *et al.*, 2006). A reabilitação é uma área em medicina veterinária, sendo emergente na prática clínica e que consiste em várias técnicas, tais como, exercícios terapêuticos, modalidades físicas, massagens e hidroterapia (Tomlinson, 2012).

O conjunto destas modalidades associadas potencia a recuperação do bem-estar do animal a longo prazo (McGonagle & Taylor, 2004).

1.1.8.1. Electroestimulação

A electroestimulação (EE) é uma modalidade da neuroreabilitação animal que tem como principais objetivos: o fortalecimento muscular; correção postural; aumento da amplitude articular (ROM); redução de edemas; diminuição de espasticidade e espasmos musculares (Prydie & Hewittt, 2015). Estudos demonstram que a aplicação da electroestimulação nos tecidos, potencia os fatores neuroquímicos responsáveis pela regeneração (Mohammad *et al.*, 2011) e, em nervos periféricos seccionados, acelera a re-inervação dos tecidos alvos, nomeadamente, dos músculos (Franz *et al.*, 2013).

A aplicação de corrente elétrica possibilita a ativação de nervos sensoriais e motores e, tem como finalidade, a contração muscular ou manejo da dor (Prydie & Hewittt, 2015). A modalidade de estimulação elétrica apresenta vários tipos, sendo os principais, estimulação elétrica funcional (FES) e estimulação elétrica neuromuscular (NMES).

O FES é uma modalidade de neuromodulação que recorre a uma corrente de baixa intensidade que possibilita a contração muscular (Hamid *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2021), com séries de pulsos elétricos curtos, que estimulam os neurónios motores superiores adjacentes à placa motora ou através de estimulação aferente periférica (Martins *et al.*, 2021; Holsheimer *et al.*, 1998). Ao induzir a passagem de corrente há um recrutamento de fibras musculares, de neurónios motores de grandes diâmetros, pois estes apresentam fibras de velocidade de condução rápida, possibilitando uma maior resistência à fadiga muscular (Fouad *et al.*, 2012). Para evitar este desgaste são aplicados os seguintes parâmetros: frequência da corrente, magnitude da corrente, tipo de onda da corrente, amplitude do pulso e tempo de tratamento (Hamid *et al.*, 2008).

A inervação do tecido alvo é uma componente importante na escolha dos parâmetros, pois em tecidos não inervados os parâmetros utilizados são de 60- 100 Hz e, em tecidos inervados, a frequência utilizada é de 25- 50 Hz acima de 2,5 mA (Bockstahler & Levine,

2014). Os parâmetros utilizados são de 60 Hz, de 6- 24 mA, 1:4 ciclo de trabalho e rampa para cima de 2-4 segundos para cima, com ponto máximo de 8 segundos e 1 a 2 segundos para baixo (Bockstahler & Levine, 2014; Martins *et al.*, 2021) durante 10 minutos. A modalidade é realizada duas a três vezes ao dia, durante uma semana, consoante a evolução neurológica de cada doente. Um eletrodo é colocado na região da pele correspondente a zona anatomia L7-S1 e o outro eletrodo é colocado próximo à região motora ventromedial do grupo de músculos flexores dos membros pélvicos (Martins *et al.*, 2021). Após o FES os doentes possuem uma janela terapêutica de 40 minutos, da qual, o treino locomotor será introduzido (Nooijen *et al.*, 2009; Van Hedel *et al.*, 2010).

A NMES consiste na administração de uma corrente elétrica com o objetivo de despolarizar o nervo motor e, consequentemente, permitir uma contração do músculo. É utilizada na prevenção da atrofia muscular, movimento articular e na reeducação muscular (Bockstahler & Levine, 2014).

Esta modalidade está inserida em vários programas de reabilitação com o intuito de aumentar o recrutamento muscular e, posteriormente, o aumento da força muscular (Thrasher *et al.*, 2013, Bochkezan *et al.*, 2018). Doentes neurológicos beneficiam da utilização desta técnica, nomeadamente, em lesões da medula espinhal ou outras doenças neurológicas com sinais de paralisia ou parésia (Bockstahler & Levine, 2014).

Um dos principais efeitos secundários será a fadiga muscular provocada pelo recrutamento inverso das fibras musculares. O NMES recruta fibras do tipo II (contração rápida) e, em seguida, fibras do tipo I (contração lenta), que é o oposto da contração voluntária (Bockstahler & Levine, 2014). No entanto, este processo pode ser alterado através da regulação dos parâmetros elétricos, nomeadamente, a frequência.

Para realizar a contração é necessário localizar o ponto motor, ou seja, a área em que o nervo motor entra no músculo e este ponto é encontrado na porção ventral de cada músculo. Um dos eletrodos é colocado sobre a área do ponto motor selecionado e o outro eletrodo é posicionado mais distalmente ao músculo. Os eletrodos podem ser colocados apenas no músculo com o objetivo de realizar uma contração ou na articulação, sobre a qual músculo atua, ou em grupo de músculos opostos para realizar uma co-contração (Goldberg *et al.*, 2018).

Nesta modalidade os parâmetros elétricos utilizados são de 25 a 50 Hz, em que cada tratamento deve durar entre 15 a 20 minutos (Bockstahler & Levine, 2014).

Esta modalidade está indicada em vários tipos de etiologias, nomeadamente, atrofias musculares, desordens circulatórias, cicatrização de tendões e fraturas, edema articular e dor

músculo-esquelética crónica (Canapp, 2007). Porém, esta técnica isoladamente não é completamente eficiente, ou seja, conjugada com exercícios ativos ou passivos possibilita um melhor *outcome* para os doentes (Niebaum *et al.*, 2018)

A EE é contraindicada em inflamações ativas, infeções, lesões na pele, doentes com epilepsia ou convulsões e doentes com pacemakers. Antes da aplicação desta técnica o doente tem de ser avaliado e deve ser realizada tricotomia na zona pretendida (Goldberg *et al.*, 2018).

1.1.8.2. Terapia de laser

Para o manejo de doenças neurológicas a terapia de laser (TLs) é considerada uma opção viável, como por exemplo, no caso da MD. A utilização de laser promove a melhoria da função neurológica, movimento e qualidade de vida dos doentes (Riegel & Godbold, *et al.*, 2017). A TLs permite o aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e aumento da taxa metabólica celular, que por sua vez, promove os fibroblastos a produzirem mais colagénio e os condrócitos a produzirem matriz da cartilagem (Prydie & Hewitt, 2015). Outras propriedades da TLs são o aumento da angiogénese, circulação sanguínea, libertação de citocinas (Riegel & Godbold, 2017). A sua utilização é indicada em feridas, úlceras, trauma, condições músculo-esqueléticas, artrites e condições inflamatórias (Niebaum *et al.*, 2018).

A TLs pode ser benéfica na prevenção da fadiga ou lesões musculares. Está descrito que esta modalidade é utilizada para aumentar o desempenho muscular (Ferraresi *et al.*, 2016; Hamblin, 2017). Após esforços físicos, a TLs previne a dor e desconforto muscular, facilita a recuperação após atividade física e reduz a lesão muscular (Leal *et al.*, 2010; Borsa *et al.*, 2013, Hamblin, 2017).

Atualmente, há vários estudos clínicos que comprovam a eficácia da TLs na resposta inflamatória das lesões causadas pela MD. Há uma supressão das citocinas anti-inflamatórias, redução da astrogliose (El Massri *et al.*, 2017) e melhoria da função axonal, quando recorremos à TLs (Hsieh *et al.*, 2012; Masoumipoor *et al.*, 2014). Ao ser aplicada a energia do laser, são estimulados os recetores das mitocôndrias, ocorrendo o aumento da taxa de respiração celular e do fluxo sanguíneo para a região alvo. Perante estes efeitos, a aplicação da TLs na coluna torácica e lombar dos doentes com MD permite uma melhor oxigenação dos tecidos alvos (Riegel & Godbold, 2017).

Segundo um estudo, a TLs retarda os défices motores, porém, numa fase inicial da doença (Moges *et al.*, 2009). Outro estudo, doentes com hérnias discais submetidos a TLs

demonstraram melhorias na locomoção, o que comprova o poder significativo que a TLs possui na medula espinhal dos doentes (Draper *et al.*, 2012).

Um estudo realizado sobre os efeitos da TLs na reabilitação de animais com MD, evidenciou que os doentes que foram submetidos a TLs e fisioterapia demonstraram uma menor progressão da doença e o aumento do tempo médio de vida, em relação aos animais que não foram incluídos no programa de reabilitação (Miller *et al.*, 2020).

Em suma, a TLs apresenta uma função protetora sobre os neurónios motores nos estágios iniciais da MD através da diminuição de lesões secundárias à medula espinhal e fadiga muscular (Miller *et al.*, 2020).

1.1.8.3. Treino locomotor

O treino locomotor (TL) consiste, após uma lesão, na recuperação da postura, marcha, controlo da postura, equilíbrio e qualidade de vida. Ao realizar o TL permitimos a ativação da função neuromuscular, em vista de, retreinar o sistema nervoso a recuperar a sua função específica (Brazg *et al.*, 2017, Martins *et al.*, 2021). Para ativar o sistema neuromuscular são necessárias várias repetições, com o objetivo de obter neuroplasticidade (Martins *et al.*, 2021). Em humanos, o TL permite a libertação de fatores tróficos, o que possibilita alterações de neuro-reorganização e metabolismo muscular, angiogenese e neurogénese (Dobkin *et al.*, 2012).

O tapete rolante terrestre (TRT) é uma das modalidades essenciais de neuroreabilitação em medicina veterinária. O treino locomotor proporciona a melhoria da massa muscular e aumenta a capacidade oxidativa do músculo (Hicks, 2020). Estas alterações permitem um aumento da atividade física diária do doente. Após utilização da passadeira terrestre existe um ganho de tamanho e massa muscular, em lesões da medula crónicas e agudas (Hicks, 2020). O TRT mantém os circuitos nervosos e possibilita a melhoria da marcha. Doentes sujeitos a treino locomotor demonstram uma locomoção organizada, consistente e (Martinez *et al.*, 2013) simétrica (Rossignol *et al.*, 2015).

Um dos parâmetros que influencia o TRT é a intensidade e, por sua vez esta, depende do movimento, velocidade ou carga efetuada pelo doente. A utilização do TRT permite ao doente uma melhoria na espasticidade, função cardiorrespiratória, angiogénese e neuroplasticidade. Os mecanismos subjacentes após TRT abrangem o aumento da capacidade

cardiorrespiratória e metabólica e o aumento da síntese e libertação de fatores de crescimento dos nervos (Prydie & Hewitt, 2015).

O tapete rolante aquático (TRA) é um elemento fundamental da reabilitação pois estimula o sistema neuromuscular de uma forma funcional e, juntamente com outras modalidades, possibilita efeitos essenciais na recuperação do animal (Waining *et al.*, 2011). É indicado para redução de claudicações, aumento da capacidade cardiovascular, aumento da flexibilidade das articulações e para manejo de condições músculo-esqueléticas como artrites, fraturas, recuperação pós-operatórias, tendinites, distensões e artrites (King *et al.*, 2013). Em contraste, a aplicação do TRA de forma inadequada possibilita lesões e prejudica as condições pré-existentes do animal (Waining *et al.*, 2011). Tem como principais objetivos, o fortalecimento e reeducação de grupos individuais de músculos e articulações e melhora a mobilidade. Os elementos-chave do TRA são a velocidade do tapete e a profundidade da água, dado que, a marcha do animal vai ser determinada consoante estes parâmetros (Hicks, 2020).

O TRA aumenta a flexão e extensão dos membros e consegue produzir uma maior amplitude articular, em comparação com o treino locomotor terrestre (Marsolais *et al.*, 2003; Monk *et al.*, 2006).

1.2 Medicina Regenerativa

Nos últimos anos a medicina regenerativa tornou-se uma área cada vez mais emergente em medicina veterinária. A medicina regenerativa baseada na administração de células estaminais, isoladas de tecidos adultos, em tecidos lesionados, pode potencialmente regenerar estruturalmente o tecido ou órgão (Ratajczak *et al.*, 2019; Mocchi *et al.*, 2020).

As células estaminais (CE) são células indiferenciadas caracterizadas pela capacidade de se diferenciarem em várias linhagens celulares e se proliferarem (Kolios & Moodley, 2013). A utilização de CE, tem em vista, várias aplicações e áreas, nomeadamente, crescimento de novos tecidos ou órgãos, aumento da viabilidade dos órgãos em transplantes e promoção da regeneração de linhas celulares (Edgar *et al.*, 2020).

A medicina regenerativa é uma das soluções para doenças, nomeadamente, leucemia, linfomas, imunodeficiências e doenças metabólicas (Kolios & Moodley, 2013). Está comprovado que a utilização de CE possibilita o aumento de funções neurológicas e atividade motora (Barnabé & Heider *et al.*, 2008).

1.2.1 Classificação das células estaminais

1.2.1.1 Potencial de diferenciação das células estaminais

As células estaminais podem ser classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação, que depende da origem e da linhagem de células das quais são obtidas. Em relação ao potencial de diferenciação as CE podem ser: totipotentes; pluripotentes; multipotentes; oligopotentes e unipotentes (Kolios & Moodley, 2013).

As células totipotentes têm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células do organismo, incluindo, tecidos embrionários e extraembrionários (Bozdag *et al.*, 2018). São encontradas nas fases iniciais do desenvolvimento fetal e formam estruturas, tais como, a placenta e anexos (Rossant, 2001).

O zigoto é o exemplo mais comum de uma célula totipotente (Rossant, 2001). Após a formação do zigoto, a massa interna do blastocisto torna-se pluripotente e através desta estrutura é formado o hipoblasto e epiblasto (Bajada *et al.*, 2008). O hipoblasto cria o saco vitelino e o epiblasto vai formar as 3 camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) (Bajada *et al.*, 2008) que, por sua vez, vão originar todos os tecidos e os órgãos (Kolios & Moodley, 2013).

As células multipotentes são derivadas de diferentes tipos de tecidos, nomeadamente, da medula óssea, tecido adiposo, osso, sangue do cordão umbilical e dão origem a tecidos da mesoderme, tais como, tecido adiposo, osso, cartilagem e músculo (Augello *et al.* 2010). As células mais reconhecidas deste grupo são as células estaminais mesenquimatosas (CEM) (Kolios & Moodley, 2013) e estas possuem capacidades imunomoduladora e anti-inflamatórias (Lee *et al.* 2011; Kim *et al.* 2010). As CEM interagem com linfócitos e, mediante a ativação do mediador pró-inflamatório secretam fatores que regulam a inflamação (Singer & Caplan, 2011).

As células oligopotentes possuem a capacidade de se renovarem e formarem linhas celulares para tecidos específicos (Kolios & Moodley, 2013), como por exemplo, as células hematopoiéticas que se diferenciam em linhagens linfoides e mieloides (Marone *et al.*, 2002).

Por fim, as células unipotentes são capazes de se diferenciar em um único tipo específico de células, tais como, as células musculares (Bentzinger *et al.*, 2012).

1.2.1.2. Origem das células estaminais

As CE podem ser classificadas em três tipos com base na sua origem: células embrionárias, adultas e células estaminais residentes.

As células embrionárias derivam da massa interna dos blastocistos e estas camadas são separadas e transferidas para cultura, em condições específicas, para desenvolver as linhagens pluripotentes (Bongso, 2006). Possuem uma maior capacidade de autorrenovação, do que as células encontradas em tecidos adultos, pois não proliferam extensivamente e só podem ser diferenciadas em células específicas do tecido (Kolios & Yuben, 2013).

As células estaminais adultas são provenientes de tecidos adultos, tais como, as CEM e as células provenientes do tecido da placenta. Apresentam capacidade anti-inflamatória e podem ser obtidas de qualquer tecido proveniente de uma das 3 camadas (Kolios & Yuben, 2013).

Por último, as CE ainda podem ser classificadas como células estaminais residentes. Após uma lesão, estas células controlam a capacidade de alguns tecidos e órgãos se renovarem (Passier & Mummery, 2003). Residem em microambiente de células e, por sua vez, este controla a autorrenovação e diferenciação das células (Yeung *et al.*, 2011). Quando ocorre uma lesão, as células estaminais residentes são ativadas através de marcadores específicos, que possibilitam a regeneração (Yeung *et al.*, 2011).

1.2.2 Células mesenquimatosas na medicina regenerativa

As CEM são células multipotentes com capacidade de se diferenciarem em diferentes linhagens de células, permitindo a regeneração dos tecidos (Kolios & Moodley, 2013). As CEM fazem parte da constituição de quase todos os tecidos e são facilmente extraídas, o que as torna ideais para a regeneração tecidual (Barry *et al.*, 2013). Consoante o efeito terapêutico pretendido, as CEM apresentam várias origens: proveniente de tecidos da mesoderme (cartilagem, gordura, músculo, osso e medula óssea); endoderme (fígado e timo) e ectoderme (pele, polpa dentária, dura mater) (Phinney & Prockop, 2007). As CEM derivadas da medula óssea e do tecido adipócito apresentam maiores taxas de sucesso e, por esse motivo, são as mais utilizadas em medicina regenerativa (Takemistu *et al.*, 2012).

As CEM são as células mais aplicadas, uma vez que, em culturas possuem a capacidade de se diferenciarem em diferentes tipos de células, tais como, osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos; cardiomiócitos, hepatócitos; células epiteliais e endoteliais e, por último, neurónios (Barry *et al.*, 2013).

A “*The International Society for Cellular Therapy*” definiu determinados critérios para a classificação das CEM: possuírem aderência ao plástico em condições standard; expressarem os fatores CD105, CD73 e CD90 e não expressarem os CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a e CD19 e complexo de histocompatibilidade classe II e serem capazes de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Miguel *et al.*, 2012).

Ao utilizarmos CEM temos de ter em conta a sua fonte: autóloga ou alogénica. As células autólogas são recolhidas do próprio animal e são administradas novamente no mesmo animal. Pelo contrário, as células alogénicas são recolhidas de um animal saudável (dador) para serem administradas no doente (Quimby & Borjesson, 2018).

Segundo alguns autores, as células alogénicas podem não ser eficazes e sobrevivem num curto espaço de tempo no organismo, comparativamente, as células autólogas (Togel *et al.*, 2013). No entanto, outro estudo enuncia que as células alogénicas possuíam maior proliferação e efeito terapêutico (Wang *et al.*, 2013). A maior vantagem apresentada pelas células alogénicas é não submeter o doente ao processo de recolha e a possibilidade de utilizar animais jovens e saudáveis (Quimby & Borjesson, 2018).

1.2.3 Aplicações das células estaminais mesenquimatosas

As CEM devido ao seu poder de diferenciação em vários tipos de tecidos são as mais utilizadas na área de medicina regenerativa, tanto em medicina humana como em medicina veterinária. Estão presentes em quase todos os tecidos, incluindo, a medula óssea, tecidos adiposos e sinóvia (Han *et al.*, 2019).

A utilização de CE está descrita em várias doenças, como por exemplo, diabetes mellitus (Trivedi *et al.*, 2008), leucemia mieloide crónica (Hackanson *et al.*, 2011), cirrose (Chien-Tsun *et al.*, 2008), fibrose pulmonar (Tzouvelekis *et al.*, 2011), doença de Crohn’s (Clerici *et al.*, 2008), falha cardíaca (Pouly *et al.*, 2008) e doenças do sistema nervoso, como a esclerose múltipla (Uccelli *et al.*, 2011), doença de Parkinson (Filho *et al.*, 2018) e outras doenças neurológicas (Gogel *et al.*, 2011).

Há vários casos em que podemos recorrer aos benefícios da CEM, nomeadamente, a regeneração óssea, reparação da cartilagem, regeneração de outros tecidos músculo-esqueléticos, “reconstrução” do sistema nervoso central e nervos periféricos, restauração do miocárdio, regeneração do fígado, “reconstrução” traqueal e regeneração da pele (Han *et al.*, 2019).

A nível cardíaco há vários estudos que demonstram a eficácia da utilização de CEM tendo em conta, que quase todas as doenças cardíacas resultam em lesão do miocárdio (Guo *et al.*, 2020). As CEM têm a capacidade de se diferenciarem em cardiomiócitos (Han *et al.*, 2019) e a sua finalidade consiste na atenuação de lesões no miocárdio (Toma *et al.*, 2002). Segundo alguns, o uso de CEM possibilita a melhoria da função cardíaca através da remodelação a volta das lesões (Oshita *et al.*, 2020). Um exemplo prático será o enfarte de miocárdio, no qual, as CEM são aplicadas de forma a diminuir os processos inflamatórios desencadeados pelo enfarte (Andrzejewska *et al.*, 2021).

Em casos de regeneração do fígado, as CEM são uma alternativa pelas mesmas razões referidas anteriormente no texto. No entanto, as CEM não se diferenciam em hepatócitos, o que pode promover a fibrogénese do fígado (Di *et al.*, 2008). Em relação a doenças respiratórias, tais como, defeitos na traqueia por estenose traqueal ou neoplasia, em que é necessária a recessão parcial ou reconstrução da traqueia, uma das opções será a utilização de CEM para recuperação do epitélio (Han *et al.*, 2019).

As doenças esqueléticas são recorrentemente encontradas na prática clínica, nomeadamente, a osteoartrite (Drazilov *et al.*, 2018), displasia da anca e doenças do disco intervertebral (Viktorova & Savchenkova *et al.*, 2020). Nestas, as CEM possuem o potencial de restaurar a cartilagem e reduzir a dor, através das suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias. Em casos de osteoartrite (Sasaki *et al.*, 2019), as CEM podem ser injetadas intra-articularmente e, nomeadamente em casos de displasia da anca (Viktorova & Savchenkova *et al.*, 2020).

A regeneração da cartilagem pode ser complicada, pois trata-se de uma zona avascular (Han *et al.*, 2019). As CEM podem ser uma alternativa, pois possuem a capacidade de se diferenciar em condrócitos (Han *et al.*, 2019). Assim, a reconstrução da cartilagem exige uma combinação de fatores de estimulação, co-cultura de condrócitos e células estaminais (Zou *et al.*, 2018). Por fim, as CEM podem ser utilizadas em lesões renais (Jiang *et al.*, 2015), doenças pulmonares (Dai *et al.*, 2018) e regeneração da bexiga (Zhou *et al.*, 2018).

Assim, e tal como referido anteriormente, a MD correlaciona-se com a ELA, sendo um dos possíveis tratamentos da ELA a administração de CEM, que atenua os sintomas demonstrados pela doença. Após a administração foram reportados sinais de neuroprotecção, estimulação da reparação dos tecidos nervosos e aumento do tempo de vida (Fontanilla *et al.*, 2016). Em outros estudos, a administração de CEM intratecais demonstrou melhorias na função motora e redução da degenerescência dos neurónios (Chudickova *et al.*, 2019). A utilização de

CEM possibilitou, ainda, a redução da astrogliose e microgliose, através das suas capacidades anti-inflamatórias e redução dos níveis pró-inflamatórios de citocinas (Andrzejewska et al., 2021).

Capítulo III

1. Objetivo do estudo

O presente estudo clínico *cohort* retrospectivo controlado tem como objetivo avaliar a capacidade de resposta de regeneração neural de cães com MD, avaliando a progressão positiva do estado neural ou a manutenção em estado funcional, após a aplicação de um programa regenerativo composto por Protocolo de Neuroreabilitação Funcional Intensivo (PNRFI) e administração de CE.

Neste estudo retrospectivo hipotizamos a associação do PNRFI com as CE, como sendo um possível tratamento para a MD, indicando a progressão positiva mais prolongada dos doentes.

1.1 – Material e Métodos

O presente estudo clínico foi composto por 18 cães com diagnóstico de MD que se apresentaram em consulta no Hospital Veterinário da Arrábida/Centro de Reabilitação Animal da Arrábida (HVA/CRAA) durante o período de 5 de Maio de 2017 a 5 de Dezembro de 2021. O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias- Faculdade de Medicina Veterinária (ULHT- FMV). Todos os tutores assinaram termos de consentimento (Anexo 2), para a realização do estudo de medicina regenerativa, no que diz respeito à abordagem das CE.

1.2- Apresentação da amostra populacional

No presente estudo *cohort* retrospectivo controlado, dezoito cães paraparésicos não ambulatoriais com escala [OFS 3(6)-3(8)], sem hiperestesia espinhal e com neurolocalização T3-L3 foram selecionados, tendo por base, a execução do teste genético de MD associado a exame de neuroreabilitação funcional com a demonstração de sinais clínicos compatíveis com lesão de NMS e indicativos de alguma cronicidade e espasticidade. O diagnóstico de MD foi realizado por exclusão, descartando doenças imunomediadas, nomeadamente, babesiose,

erlichiose e leishmaniose, assim como, doenças parasitárias referindo-nos à neosporose e toxoplasmose. A mielite viral por esgana foi também descartada, bem como, a presença de proteínas no LE, excluindo outras causas de mielite.

Os critérios de exclusão deste estudo foram gatos e cães com mielopatias compressivas, tais como, doença do disco intervertebral com lesão de Hansen tipo I e II, doenças degenerativas com presenças de quistos araquenóides medulares, lesões de origem traumática, doentes de mielopatias vasculares (tromboembolismos) e doenças imunomediadas, como referido anteriormente.

Com o rigor da seleção dos doentes por regra de independência, estes foram alocados aleatoriamente, quanto a raça, peso, idade, sexo e teste genético. A recolha de dados durou um período de 4,5 anos, permitindo a formação de grupo de estudo (GE) constituído por $n=11$ cães e a formação de grupo de controlo (GC) composto por $n=7$.

A aleatorização dos cães foi pelo processo de randomização cego à medida que foram admitidos à Consulta de Neuroreabilitação Funcional (CNRF). Foi utilizado um saco com dois dados numerados em S e C, sendo o S (*study*) e o C (*control*). O operador selecionado foi um médico veterinário do HVA/CRAA não pertencente ao estudo, ou seja, era neutro e cego quanto à escolha dos animais. A diferença entre o n do grupo de estudo e do grupo de controlo foi aleatória.

Tendo em consideração a amostra total ($n=18$), foi realizada a caracterização da mesma quanto à raça em 55,6% (10/18) Pastor Alemão, 11,1% (2/18) Collie e raça indeterminada e, por fim, com 5,6% (1/18), Serra da Estrela, Malamute do Alasca, Setter Irlandês, Weimaraner, respetivamente.

No que diz respeito ao sexo 66,7 % (12/18) foram machos e 33,3% (6/18) foram fêmeas. Em relação ao teste genético com base na mutação SOD1 foram incluídos 55,6% (10/18) doentes com genótipo heterozigótico e 44,4% (8/18) doentes com genótipo homozigótico.

Quanto às categorias quantitativas contínuas, nomeadamente idade e peso, a idade do estudo encontrou-se entre 7 e 13 anos, com média de 10 anos e 4 meses e mediana de 10 anos, assim como a moda. Tendo em visão o peso, no estudo os valores fluíram entre 16 e 45 kg, observando-se média de 31,5 kg, mediana 32,5 kg e moda de 36 kg.

A presença de elevada percentagem de doentes geriátricos justifica as ocorrências clínicas possíveis no estudo.

1.3- Desenho do estudo

Este estudo em âmbito clínico retrospectivo controlado, após admissão ao estudo, os dezoito doentes, foram dirigidos à CNRF realizada sempre pelo mesmo instrutor/examinador de CCRP (*Certified Canine Rehabilitation Practitioner*) e certificado pela Universidade do Tennessee.

Na CNRF foi avaliada a marcha em ambiente controlado e calmo, num corredor de 6 metros, em vista de classificar os doentes segundo a escala OFS (*Open Field Score*)(Olby *et al.*, 2001; Olby *et al.*, 2014). Todas as observações foram registadas com o auxílio de câmara Canon EOS Rebel T6 (EOS 1300D).

Ainda foram observados os seguintes parâmetros:

- Estado mental;
- Palpação da coluna vertebral;
- Postura associada a reações posturais (teste de posicionamento proprioceptivo e demonstração de base de sustentação alargada);
- Reflexos periféricos (tais como: reflexo de *Babinski*, reflexo cutâneo do tronco, reflexo patelar, reflexo extensor cruzado, reflexo flexor e reflexo tibial cranial);
- Avaliação da sensibilidade à dor, tanto superficial quanto profunda.

Durante o exame foram utilizados Pinça *Halstead* mosquito ABC Curva 12 cm e martelo de *Taylor* 18 cm. No que diz respeito aos reflexos periféricos, estes foram classificados como ausentes, diminuídos e aumentados/clónicos. Através da palpação do doente foi efetuada a avaliação do tónus muscular, bem como, a amplitude de extensão e flexão de todas as articulações, de modo a assinalar a presença de espasticidade e/ou rigidez muscular.

Na Figura 3 foi representado o algoritmo de admissão dos doentes ao estudo e a sua progressão durante dois meses.

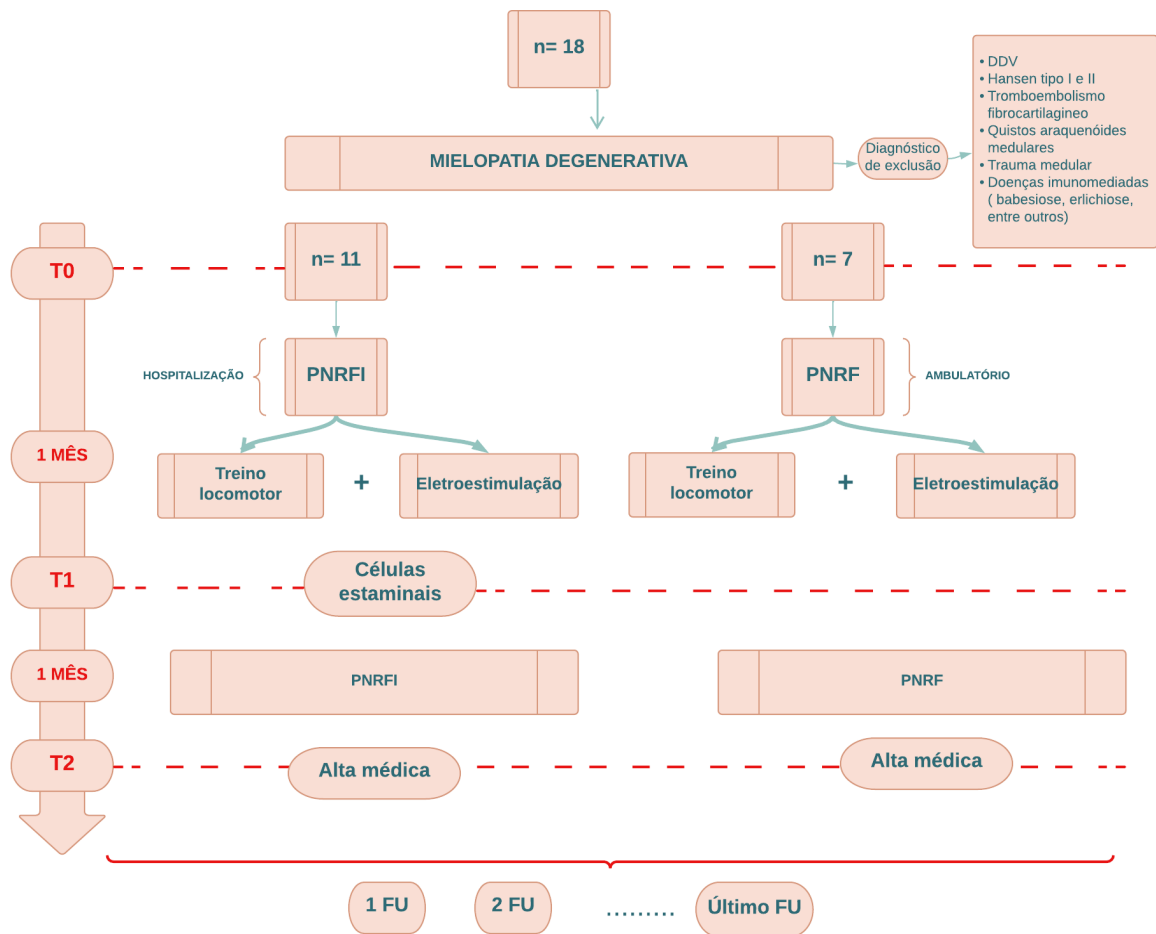


Figura 3- Algoritmo representativo do estudo clínico. DDV: doença do disco intervertebral, PNRFI: Protocolo de Neuroreabilitação Intensivo, PNRF: Protocolo de Neuroreabilitação Funcional. Monitorizações: T0= entrada no estudo; T1= administração de células estaminais; T2= alta médica; *Follow ups*: oito dias (1 FU), quinze dias (2 FU) e, posteriormente, a cada mês.

1.4 Protocolos de Neuroreabilitação Funcional

Os doentes do GE e do GC apresentaram um exame de neuroreabilitação com marcha correspondente a paraparésicos não ambulatoriais com escala de [OFS 3(6)-3(8)]. Estes doentes apresentavam reflexo patelar e tibial cranial clónicos, mas com reflexo flexor diminuído, reflexo cutâneo do tronco a terminar em L5 e, por fim, demonstraram todos sensibilidade à dor profunda (SDP) presente.

Como foi verificado no algoritmo exposto anteriormente, todos os doentes (n=18) foram submetidos a protocolos de reabilitação funcional, durante o período de 2 meses. O GE realizou o Protocolo de Neuroreabilitação Funcional Intensivo (PNRFI) e o GC foi sujeito ao Protocolo

de Neuroreabilitação Funcional (PNRF). Os protocolos aplicados a ambos os grupos diferiram a níveis de intensidade de treino e, em certas modalidades de treino, respeitando a evolução neurológica e capacidade de cada doente. No caso do GE, este grupo ainda foi submetido a administração de CE, sendo uma das variáveis a ter em conta ao avaliar estes dois grupos.

Está descrito em várias literaturas que o treino locomotor (TRT + TRA) contribui para a regeneração dos axónios (Doyle *et al* 2006, English *et al.*, 2007, English *et al.*, 2011, Cannoy *et al.*, 2016). Regularmente, no estudo os cães foram submetidos a protocolos diários, consoante, as suas capacidades locomotoras e cardiorrespiratórias. Tanto no GE e GC o TRT + TRA foi realizado de forma consistente com supervisão de médico ou enfermeiro veterinário da área.

1.5. Treino locomotor no grupo de estudo

No tapete rolante terrestre (TRT) (*Superior Fit Fur Life Treadmill*) os doentes realizaram treinos diários, três vezes ao dia, durante uma semana. Para não atingir a fadiga muscular, o TRT iniciou-se com sessões de treino curtas, cerca de 10-20 minutos, a velocidades baixas de 0,9 a 1,2 km/h. Após as primeiras sessões de TRT, a intensidade do exercício e duração são aumentadas para 20-30 minutos de treino e com velocidades de 1,2 a 2 km/h. Ao fim de duas semanas, o doente está apto para realizar o PNRFI de 30-40 minutos, três vezes ao dia, com velocidade de 2-2,8 km/h. No final do protocolo, foi expectável o animal realizar 60 minutos de TRT, duas vezes ao dia, com velocidade 2,8-3,2 km/h e inclinação de 10%, de forma autónoma, segundo as capacidades respiratórias de cada doente (Tabela 1). A prescrição das sessões de TRT foram seis dias por semana.

No tapete rolante aquático (TRA) (*Hidro Pysio EUA*) os doentes realizaram treino aquático num período de curta duração, para a adaptação do mesmo ao meio aquático. A velocidade foi de 0,9 a 1,2 km/h, durante dez minutos, tendo em atenção, o nível da água. A linha de água escolhida para o PNRFI foi o côndilo lateral do fémur, de modo, a permitir a capacidade de produzir maior amplitude articular (ROM) (Barnicoat and Wills, 2016). Na segunda semana, o tempo de treino aumenta para vinte minutos com velocidade de 1,2km/h a 2 km/h. Na terceira semana de PNRFI, o objetivo foi o doente atingir velocidades de 2 a 2,8 km/h num espaço de tempo de trinta minutos. No final do protocolo, a velocidade foi de 2,8 km/h a 3,2km/h durante 60 minutos com inclinação de 5% a 10% (Tabela 1). Quanto à prescrição das sessões de TRA, apenas foram de cinco dias por semana.

Para complementar o protocolo foram adicionados exercícios de cinesioterapia, tais como, subir e descer escadas, marcha em diferentes tipos de piso, *cavaletti* e subir e descer rampas. Normalmente, o doente fez este treino durante cinco a dez minutos, duas a cinco vezes por dia, quatro a cinco dias por semana.

No sentido de ajudar à correção dos défices sensoriais utilizaram-se exercícios em pranchas de desequilíbrio com dez repetições, e ainda exercícios de estação e movimentos de bicicleta, duas a cinco vezes por dia, quatro a cinco dias por semana.

1.6 Treino locomotor no grupo de controlo

Os doentes pertencentes ao GC foram submetidos ao protocolo de PNRF e neste protocolo o treino locomotor é semelhante, no entanto, os parâmetros de intensidade, frequência e duração diferem do protocolo de PNRFI. É de extrema importância referir que no PNRF os doentes não estão hospitalizados, mas sim, em regime ambulatorio.

No TRT os doentes efetuaram o programa com velocidades de 0,8 a 1,8 km/h, duas vezes por dia, com sessões de quinze minutos. As sessões de treino no TRA foram de 10 a 40 minutos com velocidades de 0,8-1,8 km/h. Ambas as sessões de TRT e TRA foram prescritas cinco dias por semana.

Neste programa também foram executados exercícios de cinesioterapia idênticos ao GE, estando representados na Tabela 7. Quanto à prescrição foi de quatro a cinco dias, em regime ambulatorio.

Tabela 7- Treino Locomotor do grupo de estudo e grupo de controlo. I: Intensidade do TRT+ TRA; F: Frequencia TRT+ TRA; Duração do TRT + TRA

			Tapete Rolante Terrestre (TRT)			Tapete Rolante Aquática (TRA)		Cinesioterapia
Grupo de estudo	PNRFI		I	F	T	I	T	
		1 semana	0,9-1,2	5	10-20	0,9-1,2	10	Marcha em diferentes pisos; 5 min ; 3 x/dia.
		2 semana	1,2-2	4	20-30	1,2-2	20	Marcha em diferentes pisos; 5 min ; 3 x/dia <i>Cavaletti</i> ; 5 min; 2x/dia
		3 semana	2-2,8	3	30-40	2-2,8	30	Marcha em diferentes pisos; 10 min ; 2 x/dia <i>Cavaletti</i> ; 10min; 2x/dia
		4 semana	2,8-3,2	2	40-60	2,8-3,2	60	Marcha em diferentes pisos; 10 min ; 1 x/dia <i>Cavaletti</i> ; 10min; 1x/dia Subir e descer rampas/escadas; 5min; 3x/dia
Grupo de controle	PNRF	Ambulatório	0.,8 -1,8	2	15 - 30	0,8 - 1,8	10 - 40	Marcha em diferentes pisos; 10 min ; 2 x/dia <i>Cavaletti</i> ; 5 min; 2x/dia

1.7- Electroestimulação no grupo de estudo

O GE foi submetido ao FES associado ao treino locomotor para obtermos uma reorganização neural do doente com MD (English *et al.*, 2007) consistindo na estimulação de nervos, com a colocação de eléctrodo na zona anatómica L7-S1 e outro na região do ponto motor dos músculos flexores (Figura 4). Os parâmetros utilizados foram de 40-60 Hz a 10-36 mA, ciclo de contração/descanso 1:4, *ramp up/down* 4 segundos, *plateau* de 8 segundos no tempo de pico máximo e rampa descendente de 2 segundos. A electroestimulação foi realizada duas a três vezes ao dia, durante 5 dias, consoante a evolução do doente (Tabela 8).



Figura 4- Exemplo de estimulação elétrica funcional

Tabela 8- Eletroestimulação do grupo de estudo e grupo de controlo. EE: Eletroestimulação; FES: Estimulação elétrica funcional; EEM: eletromioestimulação motora; FT:Frequência do tratamento

Electromioestimulação	Grupo de estudo	FES		Hz	mA	FT
			1 semana	40-60	10-36	4
			2 semana			3
			3 semana			2
			4 semana			1
	Grupo de controlo	EEM	Ambulatório	40	10-20	2

1.8- Electromioestimulação no grupo de controlo

O programa de electroestimulação aplicada ao GC foi semelhante ao do GE, contudo, os parâmetros utilizados foram de 40 Hz a 10-20 mA e a localização anatómica dos elétrodos diferiu. Os elétrodos foram colocados nos grupos musculares e na região dos mecanorreceptores, ou seja, no órgão Tendinoso de Golgi e junto no ponto motor do músculo. Este ponto motor é a região próxima da junção neuromuscular, assim sendo, o GC efetuou o programa de electromioestimulação motora (EEM).

A EEM estimula diretamente o sistema nervoso periférico, pois os elétrodos não foram colocados ao longo do trajeto dos nervos periféricos, como efetuado pela FES. Os doentes foram submetidos à EEM, três dias por semana, a cada 48 horas.

1.9- Protocolo de administração de células estaminais

No GE foram aplicados dois tipos de células mesenquimatosas alogénicas diferentes quanto à sua origem. Parte das células foram da membrana sinovial provenientes do Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto (ICETA), na responsabilidade pela Professora Ana Collete Pereira de Castro Osório. Outra parte foram provenientes do tecido adiposo do FAT-Stem Laboratories®, Bélgica e continham $>15 \times 10^6$ de células em 1 ml de tubo. A Vetherapy® e a ICETA foram as responsáveis pelo transporte das células, que preservaram as condições ideais de armazenamento.

Em relação as células provenientes do ICETA a preparação das mesmas consistiu em três momentos: preparação e inativação do soro autólogo; a receção celular e a preparação da dose. Nos parágrafos seguintes, será descrito o processo inerente à primeira etapa das CE.

A preparação das CE foi realizada no Centro de Reabilitação e Regeneração Animal de Lisboa, em ambiente estéril e com equipamento adequado. A primeira etapa foi efetuada em câmara de fluxo laminar, na qual, o soro autólogo foi preparado em ambiente estéril com equipamento adequado. Anteriormente, o sangue do animal foi recolhido para um tubo seco e, após a colheita, o sangue foi transferido para um tubo de *Falcon* de 15 ml.

Após esta etapa, o(s) tubo(s) foram centrifugados a 2500-3000 rpm durante dez minutos, transferindo-se o soro para um novo tubo de *Falcon* estéril, em que de seguida foi descartado o depósito. O tubo de *Falcon* foi colocado em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. A seguir, o tubo de *Falcon* foi colocado em gelo para arrefecimento. No passo seguinte efetuou-se a filtração do soro, na qual, foi retirado o êmbolo de uma seringa de 20 ml e a mesma foi acoplada a filtro de 0,22µm. Com pipeta de *Pasteur* estéril foi transferido o soro para a seringa com o filtro. De seguida, o conjunto da seringa mais o filtro foi colocado no topo do tubo de *Falcon* estéril. O embolo da seringa foi acoplado e o soro é transferido, através do filtro para o novo tubo de *Falcon* estéril. Com todas estas fases concluídas, o soro está apto para ser utilizado e congelado a -20°C.

Posteriormente, as células foram enviadas em *vials* com dosagem pretendida, armazenadas em gelo e suspensas em soro autólogo. Após a receção os *vials* devem ser prontamente processados.

A etapa seguinte foi a preparação da dose das células e, mais uma vez, o procedimento foi efetuado num ambiente estéril e com equipamento adequado. O soro autólogo e *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) foram colocados em banho-maria a temperatura de 37°C. O *vial* também foi aquecido em banho-maria com a mesma temperatura. A seguir, o conteúdo do *vial* foi rapidamente recolhido através da pipeta de *Pauster* e transferido para tubo de *Falcon* estéril. A este tubo foi adicionado 2 ml de soro autólogo inativado e centrifugado com as células, através de pipeta de *Pauster* estéril.

Em seguida, foi adicionado o meio de cultura DPBS estéril ao tubo de *Falcon* até perfazer um volume de 10 ml. Foi realizada a centrifugação a 1600 rpm durante dez minutos. O sobrenadante foi descartado num movimento único. A seguir, foi adicionado 2 ml de soro autólogo ao precipitado de células, ou seja, o *pellet* e, consoante, o local da administração das células foi adicionado mais 2 ml. De forma a desfazer o *pellet* celular e homogenizar a suspensão celular foram realizados movimentos *up and down* com a pipeta de *Pasteur*. A suspensão de células obtida deverá ser imediatamente administrada e no caso de ser impossibilitada a sua administração, terão de ser mantidas refrigeradas até à sua aplicação (por um período máximo de 12 horas).

1.10 - Administração das células estaminais

A administração das células estaminais foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV) pelo chefe do departamento de neurologia, Professor Doutor António Ferreira e equipa.

Após chegada do doente à FMV este foi encaminhado para uma sala adequada ao procedimento, em que foi realizado o acesso vascular periférico do doente. Este foi submetido a fármaco hipnótico, tendo sido administrado propofol (2mg/kg) para realização da intubação endotraqueal. O doente foi ligado a isoflurano com concentração alveolar média de um. Durante o procedimento realizou-se fluidoterapia na taxa de manutenção.

Em seguida, a tricotomia foi realizada na região cervical dorsal e feita a assepsia da pele da zona em questão. A zona anatómica para a administração foi a protuberância occipital externa e a apófise espinhosa do eixo (C2) (Figura 5). No meio foi inserida agulha descartável de calibre 22 polegadas com estilete, perto da borda cranial das asas do atlas. A agulha penetrou

no espaço subaracnóideu e o estilete foi removido. Cerca de 1 ml de LE foi extraído pela agulha para um tubo estéril e, nesse momento, foram administrados o mesmo volume de CE (Figura 6).

Posteriormente, o doente é colocado na posição vertical durante dez minutos, com o objetivo de as CE fluírem pela totalidade da medula espinhal.



Figura 5- Procedimento da administração das células estaminais



Figura 6- Seringa com células estaminais cedidas pelo Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto (ICETA)

1.11-Monitorização Clínica do Estudo

No GE na admissão do estudo (T0) , todos os doentes foram avaliados pela instrutora de CCRP certificada pela Universidade do Tennessee, quanto ao seu estado neurológico e classificados segundo a escala OFS (Tabela 9). Posteriormente, os doentes foram avaliados a cada quinze dias. No término do primeiro mês em PNRFI, foi realizada a aplicação de CE (T1) e mantida a avaliação quinzenal. Os doentes em estudo obtiveram alta clínica um mês após a administração de CE (T2), ou seja, ao fim de dois meses em PNRFI (T2).

No GC, ao fim de dois meses de PNRF, mas sem CE os doentes obtiveram a sua alta clínica.

Tabela 9- Escala de classificação de marcha OFS (adaptado de Olby,2001; Olby 2014)

Estadio 1	0- Paraplégico e sem sensibilidade à dor profunda 1- Paraplégico com sensibilidade à dor profunda 2- Paraplégico com movimento voluntário da cauda
Estadio 2	3- Protração mínima sem carga do membro pélvico com movimento de uma articulação 4- Protração sem carga dos membros pélvicos com movimento de >1 articulação em <50% do tempo 5- Protração sem carga dos membros pélvicos com envolvimento uma articulação > 50% do tempo
Estadio 3	6- Protração com suporte de peso do membro pélvico < 10% do tempo 7- Protração com suporte de peso do membro pélvico 10 a 50% do tempo 8- Protração com suporte de peso do membro pélvico > 50% do tempo
Estadio 4	9- Protração com suporte de peso 100% do tempo com fraqueza dos membros pélvicos. Erros 90% do tempo (como por exemplo:) cruzar e arrastar os membros pélvicos. Erros 50-90% do tempo 10- Protração com suporte de peso 100% do tempo com fraqueza dos membros pélvicos. Erros 50-90% do tempo 11- Protração com suporte de peso 100% do tempo com fraqueza dos membros pélvicos. Erros < 50% do tempo.
Estadio 5	12- Marcha atáxica, sem fraqueza muscular, com erros > 50% do tempo (por exemplo, falta de coordenação com os membros torácicos, cruzar os membros pélvicos, <i>bunny hoping</i>) 13- Marcha atáxica de membros pélvicos, sem fraqueza muscular com erros < 50% do tempo 14- Marcha dos membros pélvicos normal

Os *follow-ups* foram realizados oito dias (1 FU), quinze dias (2 FU) e, posteriormente, a cada mês (3 FU, 4 FU, ...) após a alta médica, como representado no diagrama de monitorizações (Figura 7).

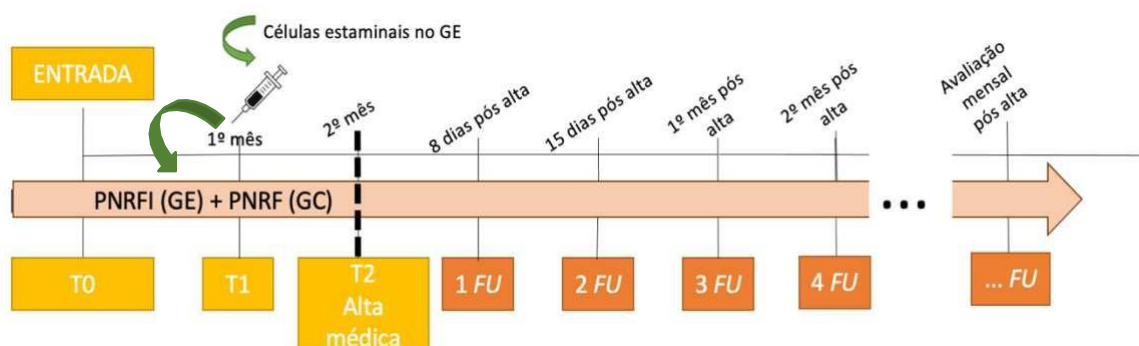


Figura 7- Diagrama de monitorizações do grupo de estudo (GE) e controlo (GC). FU: Follow up, PNRFI: Protocolo de neuroreabilitação funcional intensivo. PNRF: Protocolo de neuroreabilitação funcional.

1.12 Recolha dos dados clínicos

A população do presente estudo clínico foi categorizada segundo raça, sexo, idade, peso, teste genético, escala OFS, tempo médio de vida, tempo de sobrevivência e ocorrências clínicas.

Para simplificar os dados obtidos no estudo, na categoria qualitativa binominal raça, a amostra populacional foi dividida em raça indefinida e raça definida.

Em relação à categoria qualitativa binominal sexo, a população em estudo foi dividida em macho (0) e fêmea (1).

Na categoria da idade, categoria quantitativa contínua, a amostra populacional foi dividida em doentes com ≤ 9 anos (0) e doentes com > 9 anos (1).

Relativamente, à categoria peso, categoria quantitativa contínua, a população do estudo foi dividida em grupo com peso ≤ 30 Kg (0) e grupo com peso > 30 kg (1).

Na categoria do teste genético, sendo considerado qualitativa binominal, a população de estudo foi dividida em homozigóticos (0) para a mutação SOD1 e heterozigóticos (1) para a mutação SOD1.

Para a categoria ordinal da escala OFS, os doentes foram classificados como não ambulatorios (0), quase ambulatorios (1) e ambulatorios (2), sendo considerado:

- não ambulatorio com OFS ≤ 4 (9)
- quase ambulatorios com OFS 4(10) até 4(11)
- ambulatorios com OFS > 4 (11).

Na categoria de não ambulatorios OFS ≤ 4 (9) estão envolvidos o n=18 de cães, que foram selecionados e incluídos no estudo em T0 com [OFS 3(6)-3(8)].

Quanto a categoria do tempo médio de vida (meses), categoria quantitativa contínua, foi avaliado no GE e no GC, mas também no subgrupo de heterozigóticos e homozigóticos de ambos os grupos.

Para a categoria do tempo de sobrevivência dos doentes (anos), categoria quantitativa contínua, os doentes foram classificados em:

- Tempo de sobrevivência ≤ 1 ano (0)
- Tempo de sobrevivência 1- 2 anos (1)
- Tempo de sobrevivência ≥ 2 anos (2)

Na categoria qualitativa binominal de ocorrências clínicas dividiu-se a população em osteoartrite na articulação na coxofemoral ausente (0) e osteoartrite na articulação coxofemoral presente (1).

No estudo, o doente para ser considerado “ambulatório” tem de realizar dez ou mais passos sem cair e apresentar capacidade autónoma para se levantar, ou seja, classificação OFS > 4 (11). Um cão “quase ambulatório” apresenta escala OFS de [4(10)- 4(11)], possuindo capacidade autónoma de locomoção, em que realiza mais que três passos e menos de dez passos, embora a postura dos membros pélvicos tenha tendência para flexão.

Na subdivisão da categoria ordinal de “não ambulatórios” encontram-se os cães com capacidade inferior a três passos e sem capacidade voluntária e autónoma de se levantarem, classificando-os com escala OFS $\leq 4(9)$.

1. 13 - Análise Estatística

A base de dados relativa ao presente estudo foi realizada com o auxílio do programa informático Microsoft Office Excel 2013 ® (Microsoft, EUA) e o programa de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* ® (SPSS), versão 22.0 (IBM, EUA).

A análise estatística realizada foi composta por componente de estatística descritiva para categorização da amostra, através da análise de frequências das variáveis em estudo. Como variáveis quantitativas contínuas foram analisadas a “Idade”, o “Peso” e “Tempo Médio de Vida” e “Tempo de sobrevivência” e como variável qualitativa ordinal a “escala OFS” nos vários momentos de avaliação anteriormente descritos. As variáveis qualitativas binominais analisadas foram “Raça”, “Sexo” e “Teste Genético”.

Relativamente à análise estatística inferencial foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk* ($n < 50$), para verificar a normalidade da amostra, considerando um $p > 0,05$ como indicativo de aceitação da normalidade da mesma. Foram ainda realizados testes de Qui-Quadrado para cruzamento das variáveis categóricas, considerando valores de $p < 0,05$ como significativos para averiguar analogias relevantes.

A análise estatística realizada pretendia essencialmente determinar se existem diferenças significativas entre a evolução dos doentes do GE comparativamente com o GC e ainda averiguar se o genótipo influenciou os resultados obtidos na escala OFS, após os protocolos.

Capítulo IV- Resultados

O presente estudo clínico contemplou 18 cães (n=18) cuja raça foi considerada indeterminada constituindo 11,1% (2/18) da amostra populacional, enquanto, os cães de raça definida constituíram 88,9% (16/18). A raça com mais prevalência foi o Pastor Alemão com 55,6% (10/18), seguido do Collie e de raça indeterminada com 11,1% (2/18) e, por fim, o Malamute do Alasca, Serra da Estrela, Setter Irlandês e Weimaraner com 5,6% cada (1/18), respetivamente. Relativamente ao sexo, o estudo foi constituído por 66,7% (12/18) machos e 33,3% (6/18) fêmeas.

A média das idades em estudo foi de 10,44 (mediana 10 anos; moda 10; desvio padrão 1,688; variância 2,850), com idade mínima de 7 anos e máxima de 13 anos. Na população em estudo verificou-se que 72,2% (13/18) dos doentes têm idade superior a 9 anos.

O peso médio dos doentes em estudo foi de 31,56Kg (mediana 32,5Kg; moda 26; desvio padrão 7,254; variância 52,614), com peso mínimo de 16Kg e máximo de 45Kg.

As frequências da idade e peso foram avaliadas para amostra global em estudo, assim como, para o GE e GC individualmente e os resultados encontram-se sumarizados nas tabelas 10, 11 e 12, respetivamente.

Tabela 10- Análise da distribuição quanto à idade e peso da amostra populacional global. DP: Desvio Padrão, SEM: *std error of mean*

	Global (n=18)					
	Média	Mediana	Moda	DP	SEM	Variância
Idade	10,44	10	10	1,69	0,40	2,85
Peso	31,56	32,5	26	7,25	1,71	52,61

Tabela 11- Análise da Distribuição quanto à idade e peso do grupo de estudo. DP: Desvio Padrão; SEM: *std error of mean*

	Grupo de estudo (n=11)					
	Média	Mediana	Moda	DP	SEM	Variância
Idade	10,64	11	9	1,86	0,56	3,46
Peso	29,36	27	26	8,2	2,47	67,26

Tabela 12- Análise da Distribuição quanto à idade e peso do grupo de controlo. DP: Desvio Padrão. SEM: std error of mean

	Grupo de controlo (n=7)					
	Média	Mediana	Moda	DP	SEM	Variância
Idade	10,14	10	10	1,46	0,55	2,14
Peso	35	34	34	3,79	1,43	14,33

Na população de n=18, a distribuição do peso e da idade apresentou-se como normal, sendo possível, visualizar nos histogramas representados nos gráficos 2 e 3. A distribuição normal é comprovada pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para $n < 50$ com $p=0,993$ para o peso e $p=0,414$ para a idade.

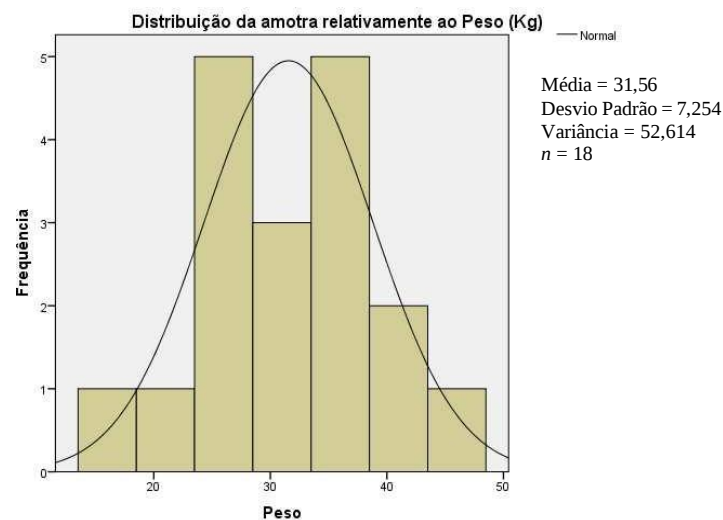


Gráfico 2- Histograma relativo à distribuição da amostra populacional relativamente ao peso (kg)

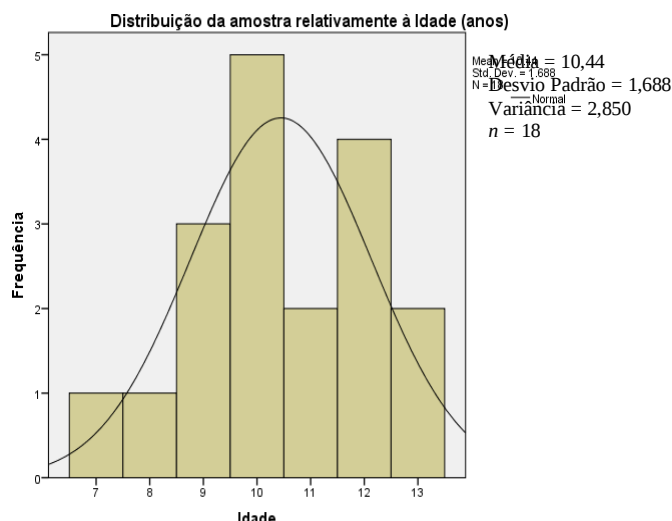


Gráfico 3- Histograma relativo á distribuição da amostra populacional relativamente à idade (anos)

Em relação ao teste genético com base na mutação SOD1 foram incluídos 55,6% (10/18) doentes com genótipo heterozigótico e 44,4% (8/18) doentes com genótipo homozigótico. Verificou-se que das fêmeas 88, 3% (5/6) possuíam genótipo homozigótico, enquanto, os machos 75% (9/12) possuíam genótipo heterozigótico, representado por $X^2 (1, n=18) = 0,019$.

Relativamente aos resultados do teste genético do GE, verificou-se que 54,5% (6/11) dos doentes possuíam genótipo heterozigótico para o gene SOD1 e 45,5% (5/11) homozigótico para o mesmo. Quanto ao GC 57,1% (4/7) apresentou o genótipo heterozigótico e 42,9% (3/7) genótipo homozigótico.

Tendo em conta a escala aplicada no estudo (OFS), foi possível verificar quanto ao GE (n=11) na Tabela 13 e no Gráfico 4 o seguinte:

- Em T0 todos os doentes encontravam-se na categoria de não ambulatorios com escala OFS ≤ 4 (9);
- Em T1 4 doentes na categoria de não ambulatorios; 1 na categoria de quase ambulatorio e 6 ambulatorios;
- Em T2 apenas 2 doentes na categoria de não ambulatorios e 9 na categoria de ambulatorios;
- Relativamente aos *follow ups* verificou-se em 1FU, 2 doentes na categoria de não ambulatorios, 6 na categoria de quase ambulatorios e 3 na categoria de ambulatorios;
- Considerando o último *follow up* de cada doente constatou-se 6 doentes na categoria de não ambulatorios, 1 na categoria de quase ambulatorio e 4 na categoria ambulatorio.

Tabela 13- Evolução dos doentes no grupo de estudo segundo a OFS, ao longo dos momentos temporais (T0,T1, T2, 1FU, UFU)

	T0	T1	T2	1 FU	UFU
AMBULATÓRIO OFS > 4(11)		6 doentes OFS 4(12) n=3 OFS 5(12) n=3	9 doentes OFS 5(12) n=4 OFS 5(13)n=3 OFS 5(14)n=2	3 doentes OFS 5(12) n=3	4 doentes OFS 5(13) n=3 OFS 5(14) n=1
QUASE AMBULATÓRIO OFS 4(10) - 4(11)		1 doente OFS 4(10) n=1		6 doentes OFS 4(10) n=1 OFS 4(11) n=5	1 doente OFS 4(11) n=1
NÃO AMBULATÓRIO OFS ≤ 4(9)	11 doentes OFS 3(6) n=4 OFS 3(8) n=7	4 doentes OFS 3(6) n=1 OFS 3(8) n=3	2 doentes OFS 3(6) n=1 OFS 3(8) n=1	2 doentes OFS 3(6) n=2	6 doentes OFS 2(5) n=2 OFS 3(7) n=1 OFS 3(8) n=1 OFS 4(9) n=2

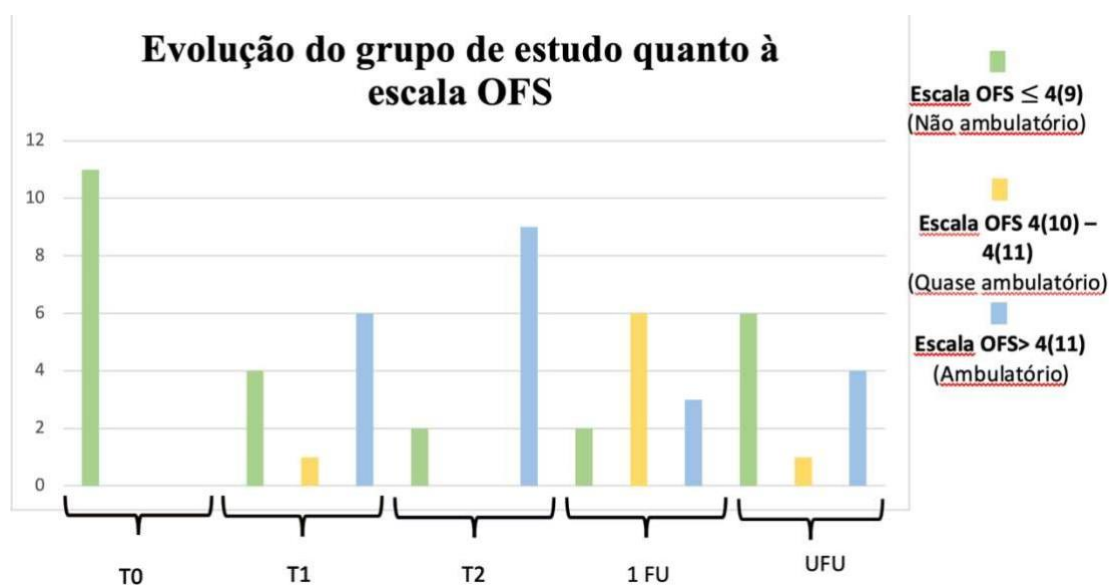


Gráfico 4- Evolução do Grupo de Estudo quanto à sua escala de classificação OFS

A Tabela 13 e o Gráfico 4, como já referido anteriormente, demonstram a evolução da totalidade dos doentes ao longo do tempo, mas não se concentra nos detalhes de como cada doente progride e ultrapassa, segundo a OFS, para categorias diferentes. Portanto foi elaborado a Figura 10, de modo a observar a progressão longitudinal dos doentes.

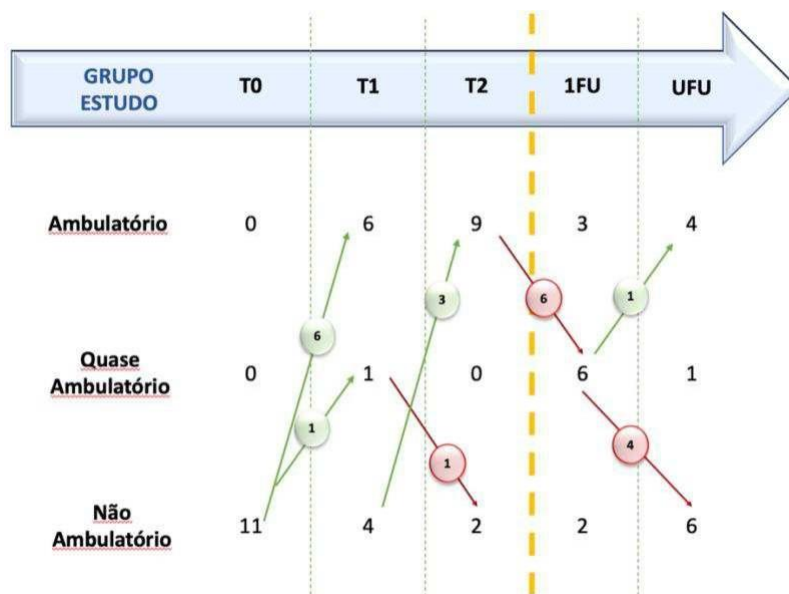


Figura 10- Evolução dos doentes do Grupo de Estudo ao longo dos momentos temporais

No estudo observou-se um doente homozigótico em T0 com escala OFS 3(8) que progrediu para 4(10) em T1, mas regrediu para o grau de OFS inicial, tendo sido mantido grau neurológico similar de OFS 3(7) até à respetiva eutanásia.

Um doente heterozigótico manteve-se durante o estudo até à sua eutanásia em OFS 3(6)-OFS 3 (7), embora no último *follow up* a deterioração foi evidente com grau de OFS 2(5).

Relativamente, à progressão dos doentes do GC, apenas se avaliou segundo categorias da ambulação e sem a utilização da ferramenta de classificação OFS, como se pode observar no Gráfico 5 :

- Em T0 todos os doentes encontravam-se na categoria de não ambulatório (n=7);
- Em T1, 3 doentes na categoria de não ambulatórios, 2 em quase ambulatórios e 2 em ambulatórios;
- Em T2, 5 doentes em não ambulatórios e 2 em quase ambulatórios, verificando-se a mesma distribuição em 1FU;
- UFU, (n=7) encontravam-se não ambulatórios.

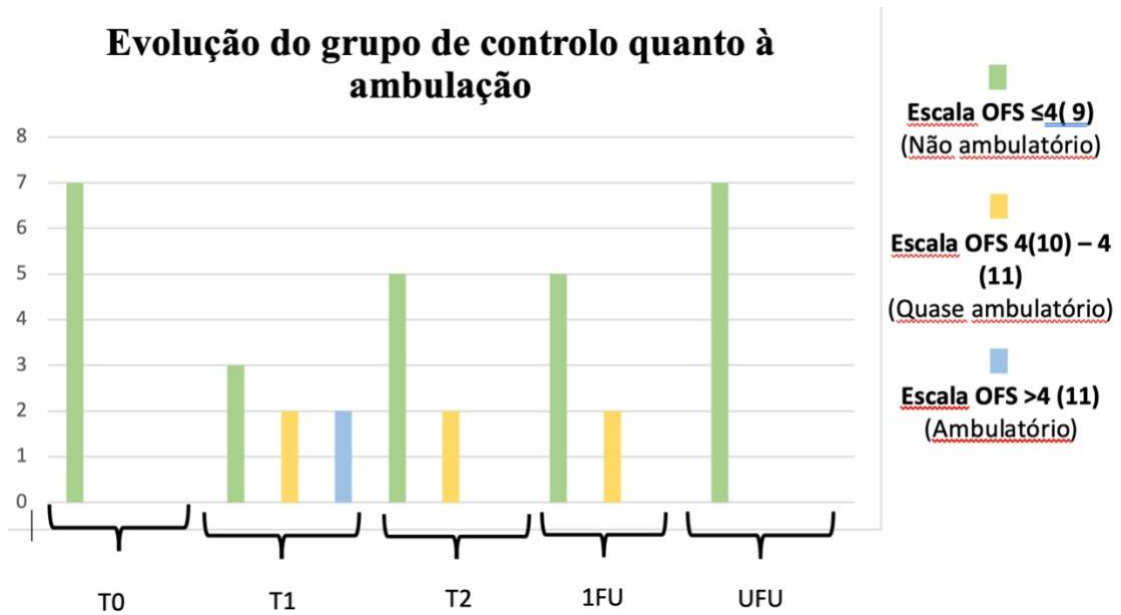


Gráfico 5- Evolução do Grupo de Controlo quanto à ambulação

De modo, a avaliar a progressão dos doentes do GC ao longo do plano longitudinal do estudo, elaborou-se a Figura 11, podendo concluir que no momento temporal UFU os 7 doentes encontravam-se na categoria de não ambulatório.

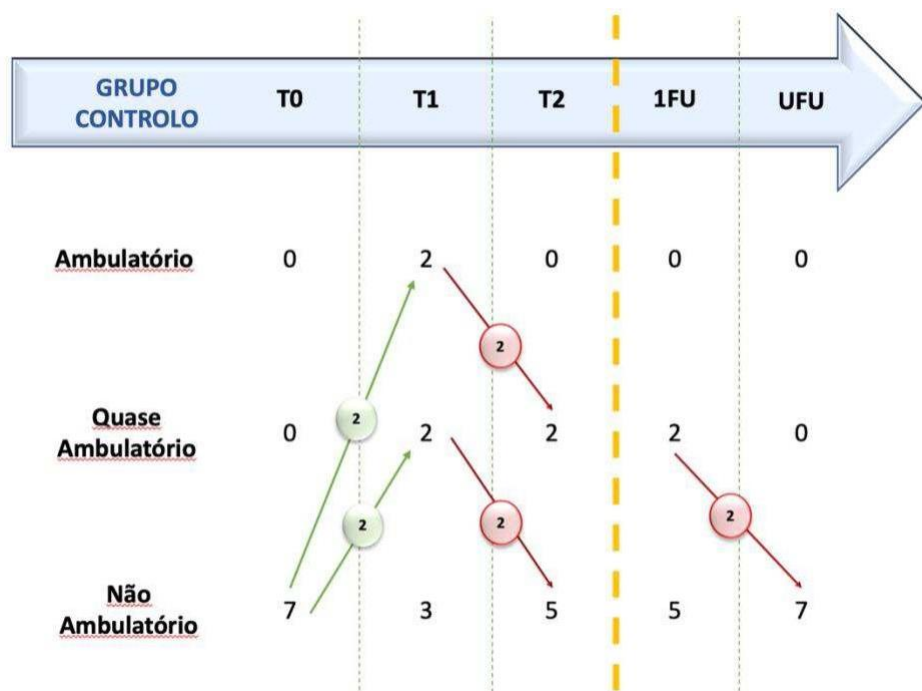


Figura 11- Evolução dos doentes do Grupo de Controlo ao longo dos momentos temporais.

Na comparação da média da ambulação do GE com o GC constatou-se que no GE a evolução foi positiva até T2 com reta decrescente até ao último *follow up*, e no GC reta ascendente até T1 seguida de declínio extremo, obtendo graus neurológicos muito inferiores.

No Gráfico 6 podemos ainda observar que os valores médios da ambulação foram superiores no GE de forma constante, ou seja, de T0 a UFU.

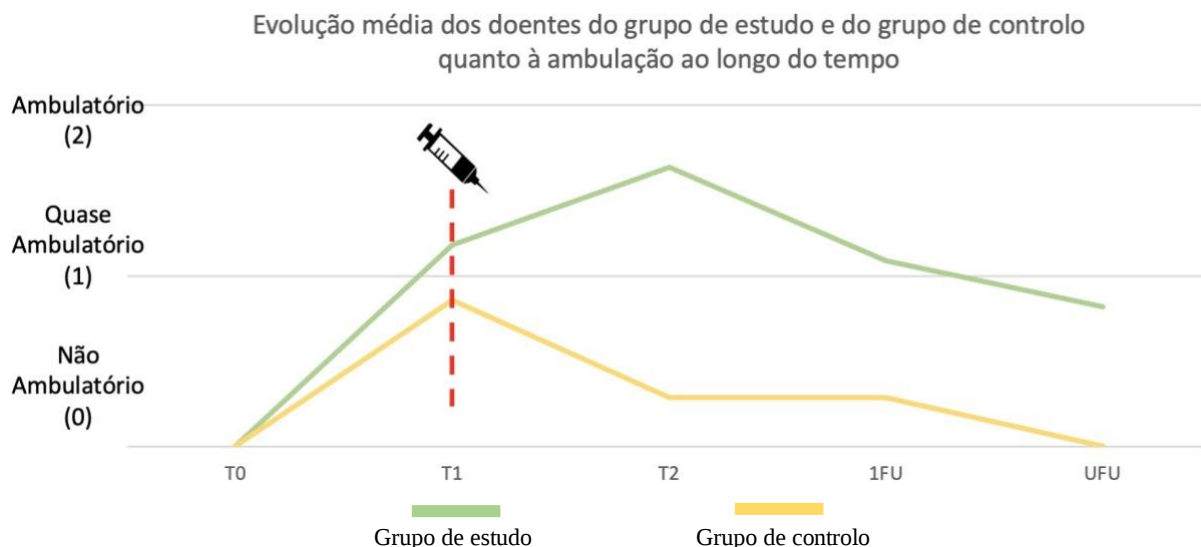


Gráfico 6- Evolução média dos doentes do grupo de estudo e grupo de controlo quanto á sua ambulação ao longo do tempo.

Após a administração de células em T2, os doentes do GE obtiveram ambulação contrastando com nenhum doente no GC, obtendo desta forma significância de $X^2 (2, n=18)=0,002$.

Quando avaliados os resultados obtidos em T2 em $n=18$, comparativamente com os resultados obtidos em T1, verificou-se significância de $X^2 (4, n=18)=0,02$, uma vez que, no GE, de quatro cães não ambulatórios, três passaram para o estado de ambulação.

Quanto ao GE, os três doentes não ambulatórios evoluíram para ambulatórios, obtendo relação de significância fraca com $X^2 (2, n=11)=0,051$, embora no GC devido à deterioração neurológica com significância de $X^2 (2, n=7)=0,03$ como se pode observar pela reta amarela no Gráfico 5.

No GE, na passagem de T2 para o 1FU dos 9 doentes ambulatórios 3 progrediram positivamente e 6 regrediram o seu estado neurológico, para quase ambulatório. Em relação ao UFU todos os cães homozigóticos encontravam-se não ambulatórios, enquanto, os cães heterozigóticos ($n=6$) obtiveram diversificação segundo a evolução, pois 4 permaneceram ambulatórios, um quase ambulatório e, apenas, um não ambulatório. Apresentando deste modo significância de $X^2 (2, n=11)=0,022$.

Quanto ao tempo médio de vida, verificou-se no GE média de 13,02 meses e no GC média de 3,71 meses, desde T0. Quanto ao genótipo verificou-se que o tempo médio de vida para os cães heterozigótico ou homozigótico do GE e GC foi de 15,33 e 4,5 meses, respetivamente.

Comparativamente, os cães homozigóticos do GE e do GC apresentaram em média 10,25 e 2,66 meses, respetivamente (Tabela 8). Na Tabela 14 é possível verificar ainda os mínimos, máximos, desvio padrão e variância para cada grupo, assim como a classificação ao teste genético.

Tabela 14- Estatística descritiva do tempo médio de vida (meses) relativamente ao Grupo de Controlo e ao Grupo de Estudo.

Tempo médio de vida (meses)	Grupo Estudo		Grupo Controlo	
	Heterozigóticos	Homozigóticos	Heterozigóticos	Homozigóticos
Mínimo	2,26		2,49	
	3	2,26*	3	2,49
Máximo	29		6	
	29	18	6	3
Média	13,02		3,71	
	15,33	10,25	4,5	2,66
Desvio Padrão	9,12		1,58	
	10,67	6,94	1,73	0,29
Variância	83,23		2,5	
	113,87	48,15	3	0,09

*Doente 11= eutanasiado por ocorrências clínicas após o 1FU

Na comparação entre os grupos, quanto à categoria tempo de sobrevivência podemos observar diferença entre GE e GC, tendo sido presente fraca significância de X^2 (2, n=18)=0,057. Para uma melhor interpretação, os resultados de ambos os grupos estão representados na Tabela 15.

Tabela 15- Estatística descritiva do tempo de sobrevivência (anos) relativamente à população total, grupo de estudo e ao grupo de controlo

Tempo de sobrevivência	População Total	Grupo Estudo	Grupo Controlo
< 1 ano	66,7%	45,5%	100%
1 a 2 anos	27,8%	45,5%	0%
>2 anos	5,6%	9,1%	0%

A categoria tempo de sobrevivência não demonstrou significância, em relação ao sexo, raça, idade, peso, teste genético e presença de osteoartrite na articulação coxofemoral.

Relativamente às ocorrências de osteoartrite na articulação coxofemoral observou-se que esta estava presente em 55,6% (10/18) e ausente 44,4%(8/18) na população total. Quanto ao GE verificou-se ausência em 54,5% (6/11) e presença em 45,5% (5/11). No GC esteve presente em 71,4% (5/7) dos doentes e ausente em 28,6% (2/7). Não foram detetadas correlações significativas relacionadas com as ocorrências mencionadas anteriormente, embora clinicamente se tenham observado influências pontuais.

Capítulo V- Discussão

O estudo *cohort* retrospectivo controlado foi composto por 18 cães, respeitando as regras da aleatorização de um processo cego. O presente estudo clínico apresenta amostra populacional com distribuição normal, quanto ao peso e à idade, assim sendo, em relação a estas categorias quantitativas contínuas foi comprovado a homogeneidade, pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para $n < 50$, tendo sido obtido $p = 0,993$ e $p = 0,414$, respetivamente.

O estudo apresenta distribuição quanto ao sexo de maior prevalência para o género masculino com 66,7% (12/18), discordando com Coates *et al* (2007), em que no universo total de 21 cães apenas 5 foram machos e 16 foram fêmeas. Em contraste, estes resultados divergem da distribuição populacional do estudo de March *et al* (2009), do qual se verificou, que em um total de 18 cães, 14 eram fêmeas e 4 foram machos. A discordância entre os estudos é justificada pela ausência de predisposição sexual, como referido por Coates & Wininger (2010) e Dewey & Costa (2016).

A presença de predominância de raça definida é reportada por Coates & Wininger (2010) na revisão bibliográfica, assim como no nosso estudo. Ainda é pertinente referir que o Pastor Alemão obteve 55,6% (10/18) no nosso estudo, indo de encontro com outros artigos sobre MD (Averill, 1973; Braund & Vandeveld, 1979; Johnston *et al.*, 2000; Awano *et al.*, 2009; Holder *et al.*, 2014).

Recentemente, um estudo realizado por Donner *et al* (2018), sobre a frequência e distribuição de doenças de variância genética em raças indeterminadas e definida afirma que a

MD foi a doença número um do ranking, obtendo-se para as raças indeterminadas 7,8% e para as raças definidas 5,4% de prevalência.

Quanto à idade o estudo está de acordo com a bibliografia, considerando que a idade média do aparecimento dos sinais clínicos foi de 10 anos e 4 meses (Averill, 1973; Griffiths and Duncan, 1975; Braund and Vandeveld, 1978; Bichsel et al., 1983; Matthews and de Lahunta, 1985; Johnston et al., 2000; Coates & Wininger et al., 2010; Mataragka et al., 2021).

Na categoria quantitativa contínua “peso” os valores variam de estudo para estudo, uma vez que, este está diretamente relacionado com as raças que compõem a amostra populacional. Um dos exemplos desta variabilidade são os estudos realizados em *Pembroke Welsh Corgi*, em que estes apresentam uma média de 11 kg, ficando muito a quem do peso apresentado pelos animais do nosso estudo, tendo sido este de 31,56 kg (Coates et al., 2007; Ogawa et al., 2014). Estudos em que a amostra populacional seja constituída por raças de médio e/ou grande porte apresentam peso de >25 kg, como é referido por Polizopoulou et al (2008).

No presente estudo clínico a amostra populacional tanto do GE como do GC, têm a presença de doentes com genótipo heterozigótico e homozigótico, sabendo ainda que, a distribuição entre estes dois grupos foi similar com maior prevalência em ambos para o genótipo heterozigótico.

Em cães saudáveis o genótipo homozigótico para o gene SOD1 encontra-se presente em 34% (248/437) (Awano et al., 2009). Frequentemente, os cães homozigóticos vão exibir sinais clínicos (Boeykens et al., 2020), embora, já tenha sido considerado que cães homozigóticos podem não demonstrar sintomatologia (Morgan et al., 2013; Adams et al., 2010).

O mecanismo patogénico por detrás do desenvolvimento desta doença ainda não é totalmente reconhecido, apesar de a MD ser comparada transversalmente com a ELA (Zeng et al., 2014). Uma das hipóteses colocadas será o mecanismo de efeito tóxico da mutação da proteína SOD1 (Kobatake et al., 2016), o que pode explicar a apresentação sob forma lenta da MD (Cappuccio et al., 2014).

Nos doentes homozigóticos sintomáticos é comum ocorrer alterações degenerativas graves, nomeadamente, desmielinização e perda axonal na substância branca, possível justificação para o desfecho do GC. Em heterozigóticos, alterações degenerativas também estão presentes no funículo da substância branca da medula espinhal, no entanto, estes apresentam alterações menos evidentes do que os homozigóticos (Kobatake et al., 2017), como verificado no presente estudo.

Dois estudos referem que cães homozigóticos têm evolução clínica progressiva negativa, sendo sugerido fisioterapia de modo a prolongar o tempo de vida (Kathmann *et al.*, 2006; Holder *et al.*, 2014). O nosso estudo também corrobora esta hipótese, sendo que os doentes homozigóticos tiveram evolução clínica negativa, em comparação com os heterozigóticos, no entanto, melhor do que o referido na literatura (Kathmann *et al.*, 2006; Holder *et al.*, 2014).

Os doentes do nosso estudo clínico possuem a doença de forma lenta e demonstram sinais clínicos (Zeng *et al.*, 2014, Fizsdon *et al.*, 2020), com apresentação em T0 de paraparésicos não ambulatorios com escala OFS 3(6)-3(8), tendo sido, todos sujeitos aos PNRF e PNRFI, no GC e no GE, respetivamente.

No estudo em relação ao GC e o último *follow up* não se obteve ambulação. No GE ocorreu significância de $X^2(2, n=11)=0,022$, quando considerado o teste genético, pois nenhum cão homozigótico se apresentou ambulatorio, justificado possivelmente pela forma autossómica recessiva (Awano *et al.*, 2009) indicativa de mecanismo tóxico com possível indução de degenerescência neuronal (Rothstein, 2009). Em relação aos heterozigóticos, apenas um cão foi considerado não ambulatorio no UFU, possivelmente justificado pelo facto de surgirem cães com sinais clínicos de MD, mas não homozigóticos (Adams *et al.*, 2010)

Ao longo dos diferentes tempos de monitorização, comparando os dois grupos (GE+GC), observou-se que o GE apresenta uma evolução superior ao GC, sugerindo que os protocolos multidisciplinares intensivos e regenerativos são os que obtêm os melhores resultados, confirmado pelo $X^2(2, n=18)=0,002$, indicativo de forte significância do resultado entre grupos em T2.

No GE, sem a administração das células estaminais apenas com o PNRFI, ou seja, até T1 (1 mês) obteve-se a ambulação para seis doentes indicando 50% a mais de evolução positiva, sugerindo a reorganização neural, a melhoria da massa muscular e da marcha através do treino locomotor no TRT e TRA (Hicks, 2020; Martinez *et al.*, 2013; Rossignol *et al.*, 2015) associado a FES (Noojien *et al.*, 2009; Van Hedel *et al.*, 2010) respeitando a janela terapêutica de 40 minutos.

No entanto, ainda no GE a grande evolução foi de T1 para T2, passando nove cães para ambulatorios na alta médica. Justificando deste modo, a ação da reabilitação intensiva e a aplicação de programas regenerativos, ou seja, a associação entre dos PNRFI e a administração das CE, sendo estas possivelmente importantes na proliferação tecidual regenerativa (Kolios & Yuben, 2013; Mochhi *et al.*, 2020; Edgar *et al.*, 2020).

Tanto o GE como o GC apresentaram progressão positiva ascendente de T0 a T1, após este momento temporal, todos os cães do GC pioraram o seu grau neurológico, ao contrário, da grande maioria de cães em GE. No GE apenas dois cães no UFU pioraram o quadro neurológico ficando não ambulatorios, indicando a progressão lenta e progressiva desta doença (Coates *et al.*, 2007).

A linha média de valores de OFS ao longo do estudo, nos tempos de monitorizações, assim como, no 1FU e UFU, quanto ao GE apresenta-se com valores superiores do que se observou para o GC, como é exposto no Gráfico 5, indicando a possibilidade de regeneração neural através da associação dos PNRFI e CE.

Em relação ao tempo médio de vida no GE foi obtida uma média de 13 meses, ou seja, 396 dias, contrastando com uma média de sobrevivência de 255 dias dos cães que recebiam apenas fisioterapia intensiva (Kathmann *et al.*, 2006). Assim sendo, em dois meses de PNRFI + CE obteve-se, aproximadamente, mais 50% de tempo médio de vida para os cães com MD. Na comparação do tempo médio de vida do GE com o GC, a diferença foi de cerca de 10 meses e comparando os resultados do GC com o grupo de estudo de Kathmann obteve-se piores resultados, no entanto, os critérios de inclusão foram diferentes. No estudo de Kathmann, os doentes entraram paraparésicos /atáxicos, e no presente estudo o estado neurológico dos doentes foi de apresentação grave [OFS 3(6)-3(8)].

No presente estudo foi comparado o genótipo e o tempo médio de vida, obtendo-se uma grande diferença entre heterozigóticos e homozigóticos de ambos os grupos. Podemos observar na Tabela 8, o tempo médio de vida máximo para o GE que foi de 29 meses e quanto para o GC de 6 meses, no entanto, o tempo mínimo foi de 2,26 para o GE e de 2,49 para o GC. Esta última interligação deveu-se a saída do estudo de um doente que foi eutanasiado após o 1FU.

Quanto ao tempo de sobrevivência observou-se 100% dos cães do GC ficaram na categoria de < 1 ano enquanto, 55% dos cães do GE sobreviveram ≥ 1 ano estando 45,5% na categoria 1 a 2 anos, sugerindo que o tempo de sobrevivência foi superior com os protocolos PNRFI + CE, possível justificação para a fraca significância representada por $X^2 (2, n=18)=0,057$.

O estudo apresentou como limitações o n reduzido da amostra, embora os grupos tenham sido homogéneos quanto à idade, peso e teste genético. A avaliação da progressão neurológica foi efetuada com a variável de resposta OFS, podendo ter sido associado estudos cinemáticos e cinéticos da marcha ao longo dos momentos temporais, de modo a obter avaliação menos empírica. Outra limitação foi não apresentar nenhum estudo histopatológico *post-*

mortem, de forma a comprovar a presença de MD. Por fim, serão necessários estudos com *follow up* mais prolongados, mas devido a idades destes doentes será sempre um condicionante.

Capítulo VI- Conclusão

Após a realização deste estudo em cães com MD de apresentação não ambulatoriais graves foi evidenciado o trabalho dos protocolos de reabilitação intensivos associados a medicina regenerativa, concluindo-se significância de $X^2(2, n=11)=0,022$ no último *follow up* entre grupos, indicando uma evolução neurológica positiva para o grupo de estudo que obteve um tempo médio de vida de 396 dias, podendo atingir um valor máximo de 883 dias, ou seja, mais prolongado em qualidade de vida.

Ao avaliar o progresso de cada doente, demonstrou-se que a evolução clínica também depende do resultado do teste genético, sendo que, os animais homozigóticos têm um pior prognóstico que os heterozigóticos.

Atualmente, a MD não apresenta tratamento definitivo e devido à limitação da dimensão da amostra populacional, mais estudos sobre os efeitos da reabilitação e o papel regenerativo das células estaminais deverão ser realizados e potenciados no futuro, permitindo uma melhor qualidade e tempo de vida a estes doentes.

Capítulo VII - Referências bibliográficas

- Adams, J., Catchpole, B., Holder A., Volk, H.(2010).Prevalence of a superoxide dismutase 1 (Sod1:c.118G>A) in a referral population of German shepherd dogs from the UK. BSAVA Congress 2010 Scientific Proceedings: Veterinary Programme. (Abstract).
- Aggelakis, K., Zacharaki, F., Dardiotis, E. et al. (2010) +. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Greek multiple sclerosis (MS) patients with bout-onset MS. *Neurol Sci* 31, 253–257. <https://doi.org/10.1007/s10072-009-0155-2>
- Andrzejewska, A.; Lukomska, B.; Janowski, M. (2019). Mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem cells* 37(7): 855- 864 doi:10.1002/stem.3016
- Ash, P. E. A., Dhawan, U., Boudeau, S.; Lei, S.; Carlomagno, Y.; Knobel, M.; Al Mohanna, L. F A; Boomhower, S. R; Newland, M. C ; Sherr, D. H; Wolozin, (2019). Heavy metal neurotoxicants induce ALS-linked TDP-43 pathology. *Toxicological Sciences*, 167 (1):105-115 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy267>
- Augello, A., Kurth, T.B., Cosimo, De B. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*;20:121–133. 10.22203/ecm.v020a11
- Averill, DR. (1973). Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 162:1045–51.
- Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A., Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O’Brien, D. P., Lindblad-Toh, K., & Coates, J. R. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2794–2799. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812297106>
- 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. doi:10.1002/term.83
- Barclay, K.B., Haines, D.M (1994). Immunohistochemical evidence for immunoglobulin and complement deposition in spinal cord lesions in degenerative myelopathy in German shepherd dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 58(1): 20–24. PMID: 8143248
- Barnabé-Heider, F., Frisén, J. (2008). Stem Cells for Spinal Cord Repair. *Cell Stem Cell*. 3(1):16-24 doi:10.1016/j.stem.2008.06.011
- Barry, F., Murphy, M. (2013). Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol* 9, 584–594 <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.109>
- Bennett, S.A., Tanaz, R., Cobos, S.N., Torrente, M.P. (2019). Epigenetics in amyotrophic lateral sclerosis: a role for histone post-translational modifications in neurodegenerative disease. *Translation Research*. 204, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.10.002>
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., von MJ, Rudnicki, M.A. (2012). The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. *Bioessays* doi: 10.1002/bies. 201200063
- Bichsel, P., Vandeveld, M., Lang, J., Kull- Hächler, S. (1983). Degenerative myelopathy in a family of Siberian husky dogs. *Journal of American Veterinary Association* 1983;183(9):998–1000.
- Bochkezanian, V., Newton, R.U., Trajano, G.S. Vieira, A., Pulverenti, T.S. Blazeovich, A.J. (2018). Effect of tendon vibration during widepulse neuromuscular electrical stimulation (NMES) on muscle force production in people with spinal cord injury (SCI). *BMC Neurology*. 18(1) 2-3 doi: 0.1186/s12883-018-1020-9

- Boeykens, F., Peelman, L., Bhatti, S., Broeckx, B. (2020). Genetic insights in canine degenerative myelopathy. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 89(5). 10.21825/vdt.v89i5.16951
- Bongso, A. (2006). Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 331:13-22 doi: 10.1385/1-59745-046-4:13
- Boothe, D. M. (2001): Drugs acting on coagulation and clotting. In: Boothe, D. M. *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 107-124 W. B. Saunders, Philadelphia
- Borsa, P.A., Larkin, K.A., True, J.M. (2013). Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. *J Athl Train*; 48(1): 57–67 10.4085/1062-6050-48.1.12.
- Boylan, K., Yang, C., Crook, J., Overstreet, K., Heckman, M., Wang, Y., Borchelt, D., Shaw, G. (2009). Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. *Journal of Neurochemistry*, 111(5), 1182–1191. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06386.x
- Bozdog, S.C., Yuksel, M.K., Demire, T. (2018). Adult Stem Cells and Medicine. In Turksen, K. *Cell Biology and Translational Medicine*. 1: 17–36 https://doi.org/10.1007/5584_2018_184
- Braund, K.G., Vandevelde, M. (1978). German Shepherd dog myelopathy: a morphologic and morphometric study. *American Journal of Veterinary Research*. 39(8):1309-1315. PMID: 697138
- Brazg G, Fahey M, Holleran CL, Connolly M, Woodward J, Hennessy PW, et al. (2017). Effects of training intensity on locomotor performance in individuals with chronic spinal cord injury: a randomized crossover study. *Neurorehabil Neural Repair*. 31:944–54. doi: 10.1177/1545968317731538
- Canapp, D.A. (2007). Clinical techniques in small animal practice. *Clin Tech Small Anim Pract* 22:160–165.
- Capucchio MT, Spalenza V, Biasibetti E, Bottero MT, Rasero R, Dalmaso A, Sacchi P. (2014). Degenerative myelopathy in German Shepherd Dog: comparison of two molecular assays for the identification of the SOD1:c.118G>A mutation. *Mol Biol Rep*. Feb;41(2):665-70. doi: 10.1007/s11033-013-2904-9. Epub 2014 Jan 5. PMID: 24390315.
- Chang, H. S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yabuki, A., Kohyama, M., & Yamato, O. (2013). Genotyping assays for the canine degenerative myelopathy-associated c.118G>a (p.E40K) mutation of the SOD1 gene using conventional and real-time PCR methods: A high prevalence in the pembroke welsh corgi breed in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(6), 795–798. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0451>
- Chien-Tsun, C.; Yu-Ru V. Shih; Tom K. Kuo; Oscar K. Lee; Yau-Huei Wei (2008). Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal. *Stem Cells*. , 26(4), 960–968. doi:10.1634/stemcells.2007-0509
- Clemmons, R. M. (1992). Degenerative myelopathy. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 22(4), 965–971. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(92\)50087-](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(92)50087-)
- Clemmons, R.M, Cheeseman, J.A., Kamishina, H., Oji, T. (2006). Genetic analysis of a spontaneous canine model of primary progressive multiple sclerosis. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*. (Abstract).
- Clerici, M., Cassinotti, A, Onida, F; Trabattoni, D. ;Annaloro, C., Della Volpe, A., Rainone, V; Lissoni, F.; Piergiorgio Duca; Sampietro, L., Fociani, P., Vago, G., Foschi, D., Ardizzone, S., Lambertengh, G., Bianchi, G. (2011). Immunomodulatory effects of unselected haematopoietic stem cells autotransplantation in refractory Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, 43(12), 946–952. doi:10.1016/j.dld.2011.07.021

- Coates, J. R., & Wininger, F. A. (2010). Canine degenerative myelopathy. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(5), 929–950. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.05.001>
- Coates, J. R., March, P. A., Oglesbee, M., Ruaux, C. G., Olby, N. J., Berghaus, R. D., O'Brien, D. P., Keating, J. H., Johnson, G. S., & Williams, D. A. (2007). Clinical Characterization of a Familial Degenerative Myelopathy in Pembroke Welsh Corgi Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(6), 1323–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb01955.x>
- Cooper, J.J., Young, B.D., Griffin, J.F., Fosgate, G.T., Levine, J.M (2014) Comparison between non-contrast computed tomography and magnetic resonance imaging for detection and characterization of thoracolumbar myelopathy caused by intervertebral disk herniation in dogs. *Veterinary Radiology Ultrasound* , 55: 182–9. doi: 10.1111/vru.12114
- Corral, C. (2020). Canine degenerative myelopathy. *The Veterinary Nurse*, 11(5), 228–231. doi:10.12968/vetn.2020.11.5.228
- Crisp, M.J., Beckett, J., Coates, J.R., Miller, T.M (2013). Canine degenerative myelopathy: Biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Experimental Neurology*, 248:1-9. 10.1016/j.expneurol.2013.05.009
- da Costa, R. C., & Moore, S. A. (2010). Differential diagnosis of spinal diseases. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(5), 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.06.002>
- Dai, R.R.; Yu, Y.C.; Yan, G.F.; Hou, X.X.; Ni, Y.M.; Shi, G.C. (2018). Intratracheal administration of adipose derived mesenchymal stem cells alleviates chronic asthma in a mouse model. *BMC Pulm. Med.*, 18, 131
- Dewey, C.W., da Costa, R.C. (2016). Myelopathies: Disorders of the Spinal Cord. In Dewey, C.W., da Costa, R.C. *Practical Guide to Canine and Feline Neurology* (pp. 353-356).
- Di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, Sanavio F, Cannito S, Zamara E, Bertero M, Davit A, Francica S, Novelli F, Colombatto S, Fagioli F, Parola M (2008). Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* ;57(2):223-31. doi: 10.1136/gut.2006.111617. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17639088.
- Dobkin, B.H., Duncan, P.W. (2012). Should body weight-supported treadmill training and robotic-assistive steppers for locomotor training trot back to the starting gate? *Neurorehabil Neural Repair*. 26:308–17. doi: 10.1177/1545968312439687
- Donner J, Anderson H, Davison S, Hughes AM, Bouirmane J, Lindqvist J, et al. (2018) Frequency and distribution of 152 genetic disease variants in over 100,000 mixed breed and purebred dogs. *PLoS Genet* 14(4): e1007361. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007361>
- Draper, W.E; T.A. Schubert; R.M. Clemmons; S.A. Miles (2012). Low-level laser therapy reduces time to ambulation in dogs after hemilaminectomy: a preliminary study, *J Small Anim Pract*, 53(8), –doi:10.1111/j.1748-5827.2012.01242.x
- Edgar, L., Pu, T., Porter, B., Aziz, J. M., La Pointe, C., Asthana, A., & Orlando, G. (2020). Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *British Journal of Surgery*, 107(7), 793–800. doi:10.1002/bjs.11686
- El Massri N, Moro C, Torres N, et al. (2016). Near-infrared light treatment reduces astrogliosis in MPTP-treated monkeys. *Exp Brain Res*, 234 (11):3225–3232. 10.1007/s00221-016-4720-7
- Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. (2016). Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *J Biophotonics*, 9:1273–1299 10.1002/jbio.201600176

- Filho, M.D.; Ribeiro, P.; Oliveira, Lucas F.; de Paula, Diógenes R.M.; Capuano, Vanessa; de Assunção, Thaís S.F.; da Silva, Valdo J.D. (2018). Therapy With Mesenchymal Stem Cells in Parkinson Disease. *The Neurologist*, 23(4), 141–147. doi:10.1097/NRL.0000000000000188
- Fiszdon, K. Joanna, G., Siewruk, K. (2020). Canine Degenerative Myelopathy – pathogenesis, current diagnostics possibilities, and breeding implications regarding genetic testing. *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 19(1), 2020, 3–10.
- Fontanilla, C. V., Gu, H., Liu, Q., Zhu, T. Z., Zhou, C., Johnstone, B. H., March, K. L., Pascuzzi, R. M., Farlow, M. R., & Du, Y. (2016). Corrigendum: Adipose-derived Stem Cell Conditioned Media Extends Survival time of a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific reports*, 6, 20747. <https://doi.org/10.1038/srep20747>
- Fouad, K.; Tetzlaff, W. (2012). Rehabilitative training and plasticity following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2012, 235, 91–99
- Franz, C. K.; Singh, B.; Martinez, J. A.; Zochodne, D. W.; Midha, R. (2013). Brief Transvertebral Electrical Stimulation of the Spinal Cord Improves the Specificity of Femoral Nerve Reinnervation. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 27(3), 260–268. doi:10.1177/1545968312461717
- Gabssi, S., Gouider-Khouja, N., Belal, S., Fki, M., Kefi, M., Turki, I., Ben Hamida, M., Kayden, H., Mebazaa, R., & Hentati, F. (2001). Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *European Journal of Neurology*, 8(5), 477–481. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00273.x>
- Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J.S. *et al.* (2010). Extracellular ATP and the P2X₇ receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 7, 33. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-33>
- Gögel, S., Gubernator, M. & Minger, S. Progress and prospects: stem cells and neurological diseases. *Gene Ther* 18, 1–6 (2011). <https://doi.org/10.1038/gt.2010.130>
- Goldberg, E.M., Sprague, S. (2018). Modalities Part 3: Electrotherapy and Electromagnetic Therapy. In Golberg, M.E., Tomlison, J.E., *Physical Rehabilitation for Veterinary Technicians and Nurses*, pp. 241-257. USA: Wiley Blackwell
- Golubczyk, D., Malysz-Cymborska, I., Kalkowski, L. *et al.* (2019). The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol* 56, 5740–5748 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1488-3>
- Gordon, P.H. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging Disease*, 4:295–310. <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2013.0400295>.
- Griffiths, I.R., Duncan, I.D. (1975). Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 16(2): 461- 471. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1975.tb05773.x>
- Guillemain, R.; Deloche, A.; Fabiani, J.; Menasché, P. (2008). Cardiac stem cells in the real world, *Cardiothoracic Transplantation* 135(3), 673–678. doi:10.1016/j.jtcvs.2007.10.024
- Guo, Y., Yu, Y., Hu, S. *et al.* The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis* 11, 349 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2542-9>
- Guzzi, R.F., Formenton, M.R., Colombia, K.P., Veras, M., Joaquim, J.F.G., & Fantoni, D.T (2014). Mielopatia Degenerativa Em Cães: Um Desafio Na Medicina Veterinária E Na Reabilitação Animal. *Revista UNIMAR CIÊNCIAS*, 23(1–2), 11–16.
- Hackanson, B., Waller, C.F. Long-term follow-up of patients with chronic myeloid leukemia having received autologous stem cell transplantation. *Ann Hematol* 90, 395–399 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00277-010-1094-y>
- Hamblin MR. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*, 4(3), 337–361. 10.3934/biophy.2017.3.337

- Hamid, S.; Hayek, R. (2008). Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: An overview. *Eur. Spin. J.*, 17, 1256–1269
- Han, Yu; Li, Xuezhou; Zhang, Yanbo; Han, Yuping; Chang, Fei; Ding, Jianxun (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8(8), 886–. doi:10.3390/cells8080886
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Zhao, W. *et al.* (2009). Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 389–398 (2009). <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9171-5>
- Hicks, A. L. (2020). Locomotor training in people with spinal cord injury: is this exercise?. *Spinal Cord*, 59(1):1-8 doi:10.1038/s41393-020-0502-y
- Holder, A.L., Price, J.A., Adams, J.P. *et al.* (2014). A retrospective study of the prevalence of the canine degenerative myelopathy associated superoxide dismutase 1 mutation (*SOD1:c.118G > A*) in a referral population of German Shepherd dogs from the UK. *Canine Genet Epidemiol* 1, 10. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-10>
- Holsheimer, J. (1998). Computer modelling of spinal cord stimulation and its contribution to therapeutic efficacy. *Spin. Cord*, 36, 531–540
- Hsieh Y-L, Chou L-W, Chang P-L, Yang C-C, Kao M-J, Hong C-Z.(2012). Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia- inducible factor 1a (HIF-1a). *J Comp Neurol*;520(10): 2903–2916. 10.1002/cne.23072.
- Imounan, F., Bouslam, N., Aasfaral, J., El-Alaouil, K., Regraguil, W., Benhaddou, E.A, Bouhouchel, A., Benomar, A., Yahyaouil, M. (2012). Vitamin E in ataxia and neurodegenerative diseases: a review. *World Journal of Neuroscience*, 2:217-222. 10.4236/wjns.2012.24033
- Jiang, M. H.; Li, G.; Liu, J.; Liu, L.; Wu, B.; Huang, W.; He, W.; Deng, C.; Wang, D.; Li, C.; Lahn, B. T.; Shi, C.; Xiang, A. P. (2015). Nestin+kidney resident mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney ischemia injury. *Biomaterials*, 50, 56–66. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.01.029
- Jimenez-Pacheco, A., Franco, J.M., Lopez, S., Gomez-Zumaquero, J.M., Leal-Lasarte, M.M., Caballero-Hernandez, D.E., Cejud-Guillén, M., Pozo, D.(2017) Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Advances Experimental Medicine and Biology*. 978, 255–275. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1>.
- Johnston, P.E.J., Barrie, J.A. McCulloch, M.C. Anderson, T.J, Griffiths, I. R. (2000). Central Nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Veterinary Record*. 146: 629-33. 10.1136/vr.146.22.629
- Johnston, P.E.J., Knox, K. Gettinby, G. Griffiths, I.R. (2001). Serum alphasatocopherol concentrations in German shepherd dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Veterinary Record*, 148:403-407.
- Jones, J. C., Inzana, K. D., Rossmeisl, J. H., Bergman, R. L., Wells, T., & Butler, K. (2005). CT myelography of the thoraco-lumbar spine in 8 dogs with degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Science*, 6(4), 341. doi:10.4142/jvs.2005.6.4.341
- Kathmann, I., Cizinauskas, S., Doherr, M. G., Steffen, F., & Jaggy, A. (2006). Daily Controlled Physiotherapy Increases Survival Time in Dogs with Suspected Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 927–932. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01807.x>
- King, M.R., Haussler, K.K., Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W., Reiser, R.F. (2012). Mechanisms of aquatic therapy and its potential use in managing equine osteoarthritis. *Equine vet. Educ.* 25(4). doi:10.1111/j.2042-3292.2012.00389.x
- Kneller, S. L., Oliver, J.E., Lewis, R.E. (1975) Differential diagnosis of progressive caudal paresis in an aged German shepherd dog. *Journal of American Hospital Association*, 11:414–7

- Kobatake, Y., Nakata, K., Sakai, H., Sasaki, J., Yamato, O., Takashima, S., Nishii, N., Maeda, S., Islam, M.S., Kamishina, H. (2021). The Long-Term Clinical Course of Canine Degenerative Myelopathy and Therapeutic Potential of Curcumin. *Veterinary Sciences*. 8, 192 <https://doi.org/10.3390/vetsci8090192>
- Kobatake, Y., Sakai, H., Tsukui, T., Yamato, O., Kohyama, M., Sasaki, J., Kato, S., Urushitani, M., Maeda, S., & Kamishina, H. (2017). Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 372, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.10.034>
- Kohyama, M., Kitagawa, M., Kamishina, H. Kobatake, Y., Yabuki, A., Sawa, M., Kakita, S., Yamato, O. (2017). Degenerative myelopathy in the Collie breed: a retrospective immunohistochemical analysis of superoxide dismutase 1 in an affected Rough Collie, and a molecular epidemiological survey of the SOD1: c118 G>A mutation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 9(2):375-379. 10.1292/jvms.16-0391
- Kolios, G.; Moodley, Y (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. doi:10.1159/000345615
- Leal, E.C.P., Lopes-Martins, R.A., Frigo L, *et al.* (2010). Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J Orthop Sport Phys Ther* ;40 (8) :524–532. 10.2519/jospt.2010.3294.
- Leigh, P.N (2007). Amyotrophic lateral sclerosis. In: Eisen, A.A., Shaw, P.J., *Motor neuron disorders and related diseases*, 249-68, Amsterdam: Elsevier
- Levine, D.; Bockstahler, B. (2014). Electrical Stimulation. In *Canine Rehabilitation and Physical Therapy*, Millis, D.L., Levine, D.; Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, USA
- Long, S.N.J. (2009). Degenerative myelopathy in Chesapeake Bay retrievers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 23 401-402.
- Lorenz, D.M. Coates, J.R., Kent, M. (2012). Pelvic limb paresis, paralysis or ataxia. In Lorenz D.M., Coates J.R., Kent M, *Handbook of veterinary neurology*. pp130-132, St. Louis: Elsevier
- Lovett MC, Coates JR, Shu Y, Oglesbee MJ, Fenner W, Moore SA. (2014). Quantitative assessment of hsp70, IL-1 β and TNF- α in the spinal cord of dogs with E40K SOD1-associated degenerative myelopathy. *Vet J*.200(2):312-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.03.003.
- Mandrioli, L., Gandini, G., Gentilini, F., Chiocchetti, R., Turba, M. E., Avallone, G., Pellegrino, V., Menchetti, M., Kobatake, Y., Kamishina, H., & Cantile, C. (2021). Degenerative Myelopathy in Hovawart Dogs: Molecular Characterization, Pathological Features and Accumulation of Mutant Superoxide Dismutase 1 Protein. *Journal of Comparative Pathology*, 182, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.11.006>
- March, P. A., Coates, J. R., Abyad, R. J., Williams, D. A., O'Brien, D. P., Olby, N. J., Keating, J.H., Oglesbee, M. (2009). Degenerative Myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi Dogs. *Veterinary Pathology*, 46(2), 241–250. doi:10.1354/vp.46-2-241
- Marone, M.; Ritis, Daniela de; Bonanno, G.; Mozzetti, S.; Rutella, S.; Scambia, G.; Pierelli, L. (2002). Cell Cycle Regulation in Human Hematopoietic Stem Cells: From Isolation to Activation. *Leukemia & Lymphoma*, 43(3), 493–501. doi:10.1080/10428190290011967
- Marsolais, G.S., Dvorak, G., Conzezmus, M.G. (2002). Effects of postoperative rehabilitation on limb function after cranial cruciate ligament repair in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220, 1325-133 0.2460/javma.2002.220.1325
- Martinez, M.; Delivet-Mongrain, H.; Rossignol, S. (2013). Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. *Journal of Neurophysiology*, 109(12), 2909–2922. doi:10.1152/jn.01044.2012
- Martins Â, Gouveia D, Cardoso A, Viegas I, Gamboa Ó and Ferreira A (2021). A Comparison Between Body Weight-Supported Treadmill Training and Conventional Over-Ground Training

- in Dogs With Incomplete Spinal Cord Injury. *Front. Vet. Sci.* 8:597949. doi: 10.3389/fvets.2021.597949
- Martins, Â.; Gouveia, D.; Cardoso, A.; Carvalho, C.; Coelho, T.; Silva, C.; Viegas, I.; Gamboa, Ó.; Ferreira, A. (2021). A Controlled Clinical Study of Intensive Neurorehabilitation in Post-Surgical Dogs with Severe Acute Intervertebral Disc Extrusion. *Animals*, 11, 3034. <https://doi.org/10.3390/ani11113034>
- Masoumipour M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. (2014). Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci*; 29 (5):1593–1598 10.1007/s10103-014-1552-1.
- Masrori, P.; Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 27 (10): 1918– 1929 <https://doi.org/10.1111/ene.14393>
- Mataragka, A., Ikonopoulou, J., Zervas, G. S., Vamvakidis, C. D., Tzimotoudis, N., Hager-Theodorides, A. L., Gazouli, M., & Kominakis, A. (2021). Allele and genotype frequencies of the SOD1 gene polymorphism associated with canine degenerative myelopathy in Belgian Malinois dogs in Greece. *Veterinary World*, 14(6), 1472–1479. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1472-1479>
- Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Vallat, J.-M., Corcia, P., & Le Masson, G. (2016). Management and therapeutic perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 17(3), 263–276. doi:10.1080/14737175.2016.1227705
- Matthews, N.S., de Lahunta, A. (1985). Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. *Journal of American Veterinary Association*, 186(11):1213–5. PMID: 4008305
- Mcgonagle, L.; Taylor, R.A. (2004). History Of Canine Rehabilitation. In: Millis, D. L.; Levine, D.; Taylor, R. A. *Canine Rehabilitation & Physical Therapy*, p 01-07 Philadelphia: Elsevier
- Miller, A. D., Barber, R., Porter, B. F., Peters, R. M., Kent, M., Platt, S. R., & Schatzberg, S. J. (2009). Brief communication: Degenerative myelopathy in two boxer dogs. *Veterinary Pathology*, 46(4), 684–687. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0270-M-BC>
- Miller, Lisa A.; Torraca, D.; De Taboada, L. (2020). Retrospective Observational Study and Analysis of Two Different Photobiomodulation Therapy Protocols Combined with Rehabilitation Therapy as Therapeutic Interventions for Canine Degenerative Myelopathy. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 38(4), 195–205. doi:10.1089/photob.2019.4723
- Mocchi, M., Dotti, S., Bue, M. D., Villa, R., Bari, E., Perteghella, S., Grolli, S. (2020). Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier? *Cells*, 9(6), 1453. doi:10.3390/cells9061453
- Moges H, Vasconcelos OM, Campbell WW, et al. (2009). Light therapy and supplementary Riboflavin in the SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Lasers Surg Med*; 41(1):52–59 10.1002/lsm.20732
- Mohammad S. Alrashdan; Mi-Ae Sung; Yunhee Kim Kwon; Hun-Jong Chung; Sung-June Kim; Jong-Ho Lee (2011). Effects of combining electrical stimulation with BDNF gene transfer on the regeneration of crushed rat sciatic nerve. *Acta Neurochirurgica*. 153(10), 2021–2029. doi:10.1007/s00701-011-1054-x
- Monk, M. L., Preston, C. A., McGowan, C. M. (2006) Effects of early intensive postoperative physiotherapy on limb function after tibial plateau levelling osteotomy in dogs with deficiency of the cranial cruciate ligament. *American Journal of Veterinary Research* 67, 529-536 10.2460/ajvr.67.3.529
- Morgan BR, Coates JR, Johnson GC, Shelton GD, Katz ML. (2013). Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy,

- a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 2014 Apr;92(4):531-41. doi: 10.1002/jnr.23332.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R.H., Itoyama, Y. (2001). Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease *Journal of Neuroscience*, 21(23): 9246-54. 10.1523/JNEUROSCI.21-23-09246.2001
- Nakamae, S.; Kobatake, Y.; Suzuki, R.; Tsukui, T.; Kato, S.; Yamato, O.; Sakai, H.; Urushitani, M.; Maeda, S.; Kamishina, H. (2015). Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience*, 303, 229–240. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.066
- Nardone, R., Höller, Y., Taylor, A.C., Lochner, P., Tezzon, F., Golaszewski, S., Brigo, F., Trinka, E. (2015). Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology*. 119(1):64-73. 10.1016/j.zool.2015.09.003
- Neeves, J., & Granger, N. (2015). An update on degenerative myelopathy in dogs. *Companion Animal*, 20(7), 408–412. <https://doi.org/10.12968/coan.2015.20.7.408>
- Neeves, J., Granger, N. (2015). An update on degenerative myelopathy in dogs. *Companion Animal*, 20(7), 408–412. doi:10.12968/coan.2015.20.7.408
- Niebaum, K., McCauley, L., Medina, C. (2018). Rehabilitation Physical Modalities. In Zink, C., Van Dyke, J.B., *Canine Sports Medicine and Rehabilitation*. pp 148-155. EUA: Willey Blackwell
- Nooijen, C.F.; ter Hoeve, N.; Field-Fote, E.C. (2009). Gait quality is improved by locomotor training in individuals with SCI regardless of training approach. *J. Neuroeng. Rehab*, 6, 36.
- Norris, S. P.; Likanje, M. N.; Andrews, J. A. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: update on clinical management. *Current Opinion in Neurology*, 33(5), 641–648. doi:10.1097/WCO.0000000000000864
- Ogawa, M., Uchida, K., Park, E. S., Kamishina, H., Sasaki, J., Chang, H. S., Yamato, O., & Nakayama, H. (2011). Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(10), 1275–1279. <https://doi.org/10.1292/JVMS.11-0097>
- Ogawa, M., Uchida, K., Yamato, O., Inaba, M., Uddin, M. M., & Nakayama, H. (2014). Neuronal Loss and Decreased GLT-1 Expression Observed in the Spinal Cord of Pembroke Welsh Corgi Dogs With Canine Degenerative Myelopathy. *Veterinary Pathology*, 51(3), 591–602. <https://doi.org/10.1177/0300985813495899>
- Olby NJ, De Risio L, Muñana KR, Wosar MA, Skeen TM, Sharp NJ, Keene BW (2001) Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. *Am J Vet Res.* Oct;62(10):1624-8. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1624.
- Olby, N. (2014) Lesion localization and differential diagnosis. In Platt, S.R. & Olby, N., *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology* (4th ed).(271-296). Gloucester: BSAVA
- Oshita J.; Okazaki, T.; Mitshura, T.; Imura, T. ; Nakagawa, K.; Otsuka, T.; Kurose, T.; Tamura, T.; Abiko, M.; Takeda, M.; Kawahara, Y.; Yuge, L.; Kurisu, K. (2020). Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats. *Neurologia medico-chirurgica*, . doi:10.2176/nmc.oa.2019-0186
- P. De Miguel, M.; Fuentes-Julian, S.; Blazquez-Martinez, A.; Y. Pascual, C.; A. Aller, M.; Arias, J.; Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Current Molecular Medicine*, 12(5): 574-591
- Passier, R., Mummery, C. (2003). Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res.* 58(2):324-35. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00770-8
- Pellegrino, F. C. (2013). Degenerative myelopathy: current state of knowledge. Literatura review. *Mielopatia Degenerativa: Estado Actual Del Conocimiento. Revision Bibliografica.*, 29(2013), 63–86.

- Phinney, D.G.; Prockop, D.J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. *Stem Cells* 25(11), 2896–2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637
- Polizopolou, Z.S., Koutinas, A.F. Patsikas, M., Soubasis, N. (2008). Evaluation of proposed therapeutic protocol in 12 dogs with tentative degenerative myelopathy. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56: 1588-2705
- Pouly, J.; Bruneval, P.; Mandet, C.; Proksch, S, Peyrard, S; Amrein, C.; Bousseaux, V.; Prydie, D., Hewitt, I. (2015). Modalities. In Prydie, D., Hewitt. *Practical Physiotherapy for Small Animal Practice*. Oxford: Wiley Blackwell
- Quimby, J. M; Borjesson, D. L. (2018). Mesenchymal stem cell therapy in cats: Current knowledge and future potential. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(3), 208–216. doi:10.1177/1098612X18758590
- Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, X.-F., Crow, J. P., Chakrabarty, A. (2002). Oxidation-induced Misfolding and Aggregation of Superoxide Dismutase and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47551–47556. doi:10.1074/jbc.m207356200
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., & Kucia, M. (2019). Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs). *Circulation Research*, 124(2), 208–210. doi:10.1161/circresaha.118.314287
- Riegel, R.J., Godbold, J.C. (2017). *Laser Therapy in Veterinary Medicine Photobiomodulation*. UK: Willey Blackwell
- Rossant, J. (2001). Stem Cells from the mammalian blastocyst. *Stem cell*; 19 (6):477-482 10.1634/stemcells.19-6-477
- Rossignol, S., Martinez, M., Escalona, M., Kundu, A., Delivet- Mongrain, H., Alluin, O., Gossard, J-P. (2015). The "beneficial" effects of locomotor training after various types of spinal lesions in cats and rats. *Prog Brain Res*. 218: 173-98. 10.1016/bs.pbr.2014.12.009
- Rothstein, J.D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 65(1): 53-54 <https://doi.org/10.1002/ana.21543>
- Sasaki A, Mizuno M, Mochizuki M, Sekiya I. (2019) Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs. *World J Stem Cells*; 11(5): 254-269 doi: 10.4252/wjsc.v11.i5.254
- Shaw, P., Eggett, C.J. (2000). Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 247. I17–I27
- Singer, N.G.; Caplan, A. I. (2011). Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* , 6(1), 457–478. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130230
- Srzić Dražilov S, Mrkovački J, Spasovski V, Fazlagić A, Pavlović S, Nikčević G. (2018). The use of canine mesenchymal stem cells for the autologous treatment of osteoarthritis. *Acta Vet Hung*, 66(3):376-389. doi: 10.1556/004.2018.034. PMID: 30264620.
- Steinacker, P., Feneberg, E., Weishaupt, J., et al (2015). Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: A prospective study on 455 patients. *Journal of Neurology Psychiatry*, 87:12– 20. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2015-311387>
- Summers, B.A., Cummings, J.F., de Lahunta A. *Veterinary neuropathology*. St. Louis (MO): Mosby; 1995. p. 189–207.
- Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I. et al. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 8, 150 (2012). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-150>
- Thrasher TA, Ward JS, Fisher S. (2013). Strength and endurance adaptations to functional electrical stimulation leg cycle ergometry in spinal cord injury. *Neurorehabil*, 33(1):133–8.
- Toedebusch, C.M., Bachrach, M.D., Garcia, V.B., Johnson, G.C., Katz, M.L., Shaw, G.; Coates, J.R., Garcia, M.L. (2017). Cerebrospinal Fluid Levels of Phosphorylated Neurofilament Heavy

- as a Diagnostic Marker of Canine Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 513–520. doi:10.1111/jvim.14659
- Togel, F., Cohen, A., Zhang, P., et al. (2009). Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Dev*, 18:475–85. 10.1089/scd.2008.0092
- Toma, C. (2002). Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation*, 105(1), 93–98. doi:10.1161/hc0102.101442
- Tomlinson, C. L.; Patel, S.; Meek, C.; Herd, C. P.; Clarke, C. E.; Stowe, R.; Shah, L.; Sackley, C.; Deane, K. H. O.; Wheatley, K.; Ives, N. (2012). Physiotherapy intervention in Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 345 <https://doi.org/10.1136/bmj.e5004>
- Trivedi, P., Hematti, P. (2008). Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Experimental Hematology*, 36:350- 359
- Turba, M. E., Loechel, R., Rombolà, E., Gandini, G., & Gentilini, F. (2017). Evidence of a genomic insertion in intron 2 of SOD1 causing allelic drop-out during routine diagnostic testing for canine degenerative myelopathy. *Animal Genetics*, 48(3), 365–368. <https://doi.org/10.1111/age.12525>
- Tzouvelekis, A., Koliakos, G., Ntoliou, P. et al. Stem cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: a protocol proposal. *J Transl Med* 9, 182 (2011). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-182>
- Uccelli, A.; Laroni, A.; Freedman, M.(2011). Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Review*, 10(7), 649–656. doi:10.1016/s1474-4422(11)70121-1
- Valdmanis, P.N; Belzil, V.V.; Lee, J.; Dion, P.A.; St-Onge, H., Hince, P., Funalot, B., Couratier, P., Clavelou, P., Camu, W., Rouleau, G. (2009). A Mutation that Creates a Pseudoexon in SOD1 Causes ALS. *Annals of Human Genetics*, 73(6): 652-657 <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2009.00546.x>
- Van Hedel, H.J.; Dietz, V. (2010). Rehabilitation of locomotion after spinal cord injury. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 28, 123–134
- Viktorova, E.V., Savchenkova, I.P. (2020). Multipotent mesenchymal stem cells in clinical veterinary practice. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 548 07207 doi:10.1088/1755-1315/548/7/072072
- Vu, Lucas T., Bowser, R. (2017). Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 14(1), 119–134. doi:10.1007/s13311-016-0503-x
- Wainig, M.; Young, I. S.; Williams, S. B. (2011). Evaluation of the status of canine hydrotherapy in the UK. *Veterinary Record*, 168(15), 407–407. doi:10.1136/vr.c6842
- Wang J, Liao L, Wang S, et al. (2013). Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. *Cytotherapy*;15:893–904 10.1016/j.jcyt.2013.01.218
- Waxman, F.J, Clemmons, R.M., Johnson, G., Evermann, J.F., Johnson, M.I., Roberts, C., Hinrichs, D.J. (1980). Progressive myelopathy in older German Shepherd dog.II. Presence of circulating suppressor cells. *Journal of Immunology*, 124(3): 1209-1215. PMID: 6444648
- Wijnrocx, K., François, L., Stinckens, A., Janssens, S., Buys, N. (2016). Half of 23 Belgian dog breeds has a compromised genetic diversity, as revealed by genealogical and molecular data analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 1-9. <https://doi.org/10.1111/jbg.12203>
- Williams, D.A. Batt, R.M. Sharp, N.J.H (1984). Degenerative myelopathy in German Shepherd dogs: an association with mucosal biochemical changes and bacterial over- growth in the small intestine. *Clinical Science*. 66, 25.
- Williams, D.A., Prymak, C., Baughan, J. (1985). Tocopherol (vitamin E) status in canine degenerative myelopathy. *Proceedings of 3rd Annual American College of Veterinary Internal Medicine, Veterinary Medicine Forum*.

- Wininger, F. A., Zeng, R., Johnson, G. S., Katz, M. L., Johnson, G. C., Bush, W. W., Jarboe, J. M., Coates, J. R. (2011). Degenerative myelopathy in a Bernese mountain dog with a novel SOD1 missense mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 1166-1170. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0760.x>
- Yeung, T.M., Chia, L.A., Kosinski, C.M., Kuo, C.J. (2011). Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68: 2513-2523 <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0687-5>
- Yokota, S., Kobatake, Y., Noda, Y., Nakata, K., Yamato, O., Hara, H., Sakai, H., Nishida, H., Maeda, S., & Kamishina, H. (2018). Activation of the unfolded protein response in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience Letters*, 687, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.040>
- Zeiler, G. E., van der Zwan, H., & Oosthuizen, M. C. (2013). Genetic testing of canine degenerative myelopathy in the south african boxer dog population. *Journal of the South African Veterinary Association*, 84(1), 1–5. <https://doi.org/10.4102/jsava.v84i1.1005>
- Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolichski, A., Ivansson, E., Perloski, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, D. P., Guo, J., Katz, M. L., & Johnson, G. S. (2014). Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 515–521. <https://doi.org/10.1111/jvim.1231>
- Zhou,Z.;Yan,H.;Liu,Y.D.;Xiao,D.D.;Li,W.;Wang,Q.;Zhao,Y.;Sun,K.;Zhang,M.;Lu,M. J. (2018) Adipose-derived stem-cell-implanted poly(ε-caprolactone)/chitosan scaffold improves bladder regeneration in a rat model. *Regen. Med.*, 13, 331–342
- Zou, J.Y.; Bai, B.; Yao, Y.C. (2018) Progress of co-culture systems in cartilage regeneration. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 18, 1151–1158, 10.1080/14712598.2018

Apêndices

Anexo 1- Doenças espinhais comuns com base no acrónimo VITAMIN-D (adaptado de Costa & Moore, 2010)

Mecanismo	Doença
Vascular	<u>Mielopatia por embolia cartilaginosa</u> Hemorragia epidural Hemorragia da medula espinhal
Inflamatória/Infeciosa	<u>Discoespondilite (bacteriana ou fúngica)</u> <u>Meningite (meningite-artrite responsiva a anti-inflamatórios não esteroides ou meningite bacteriana)</u> <u>Meningomielite infecciosa (bactérias, fungos, rickettsial, viral) ou não infecciosa</u> Empiema espinhal Osteomielite vertebral
Trauma	Traumatismo espinhal (fraturas ou luxações) Extrusão de disco traumática Subluxação atlantoaxial traumática
Tóxica	Nenhuma
Anómala	Instabilidade atlantoaxial Malformação de <i>Chiari</i> e siringomielia Hemivértebra Quistos Aracnoides Exostoses cartilaginosas múltiplas Espinha bífida
Metabólica	Nenhuma
Nutricional	Fraturas patológicas devido a doença óssea metabólica
Neoplásica	Tumores espinhais primários ou metástases
Degenerativa	Hérnia de disco intervertebral Mielopatia degenerativa Estenose degenerativa lombossagrada Osteoartrite das facetas articulares Quistos sinoviais extradurais

De desenvolvimento	Espondilomielopatia cervical
--------------------	------------------------------

Anexo 2- Termo de consentimento para entrada no estudo de Mielopatia Degenerativa



Estudo de Neuro-Reabilitação Funcional e Medicina Regenerativa para Mielopatia Degenerativa em Cães

Após o diagnóstico de conclusão, da doença de mielopatia degenerativa e sua confirmação com teste genético, em laboratório credenciado:

O tutor _____, do cão/cadela de nome _____ e microchip _____, toma conhecimento e concorda com os seguintes pontos:

- Y Um mês de neuro-reabilitação funcional intensiva (treino locomotor, associado a electroestimulação do sistema nervoso central e periférico);
- Y Aplicação de células estaminais na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), sobre a orientação do Prof. Dr. António Ferreira (para este ponto será necessário assinar o termo de anestesia da Ordem dos Médicos Veterinários);
- Y Um mês de neuro-reabilitação intensiva (treino locomotor);
- Y Realização em casa de estimulação da marcha, ou passeadeira terrestre, de acordo com o plano prescrito;
- Y Vir às consultas de *follow-up*, após as *guidelines* de avaliação e monitorização da marcha, segundo a escala de avaliação da Prof. Dr. Natasha Olby;
- Y Este estudo não tem interferência no bem estar animal, apenas de referir que as células estaminais são alogénicas, portanto, segundo a ciência sujeitas a reação anafilática, embora na literatura seja raro este acontecimento, como na nossa prática clínica.

Comprometo-me, ainda, ao pagamento prévio das células estaminais, de forma a permitir a sua encomenda e preparação*.

Assinatura tutor:

Assinatura Médico Veterinário Responsável :

C.P. e Vinheta:

*O pagamento das células estaminais após efetuado não está sujeito a possível reembolso ou devolução.