

ALESSANDRA DE OLIVEIRA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES INFECTADOS
NATURALMENTE PELO VÍRUS DA CINMOSE CANINA NA FASE
NEUROLÓGICA COM O USO DE CÉLULAS-TRONCO DE EPITÉLIO
OLFATÓRIO FETAL CANINO**

São Paulo

2014

ALESSANDRA DE OLIVEIRA PINHEIRO

Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3057
FMVZ

Pinheiro, Alessandra de Oliveira

Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal / Alessandra de Oliveira Pinheiro. -- 2014.

108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Cinomose. 2. Células-tronco. 3. Infecciosa. 4. Tratamento. 5. Vírus. I. Título.



CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 13.1.1757.74.6

Projeto: Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.

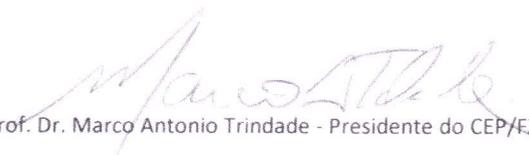
Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Pelo Comitê de Ética:

- Aprovado.**
- Não aprovado.**
- Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.**
- Retirado de pauta.**

Pirassununga, 11 de dezembro de 2013.

Notifique-se o interessado.


Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente do CEP/FZEA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Tratamento de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase aguda com o uso de células tronco de epitélio olfatório fetal canino", protocolado sob o nº 2914/2013, utilizando 13 (treze) cães de 0-5anos e 20 (vinte) fetos de cães de 40 a 60 dias de gestação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

São Paulo, 27 de novembro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINHEIRO, Alessandra de Oliveira.

Título: Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha querida filha Sophia, que soube ser compreensiva nas muitas horas que não pude
estar ao seu lado...e ao*

*Meu querido Rodrigo (in memorian), que mesmo ausente é minha inspiração nos momentos
de felicidade....meu muito obrigado.*

AGRADECIMENTOS

O que dizer nesse momento de grande felicidade, em que concluo uma etapa de minha vida que foi sonhada por mim....somente por mim!

Diante todas as dificuldades e exigências familiares, ergui a cabeça....enfrentei.....e vim! Estou hoje aqui, na busca crescente e insistente que não se aquieta e que me move ao desconhecido.

Foram muitas pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas nesse crescimento profissional e mesmo espiritual, pois também pude aprender a ser uma pessoa serena mesmo nos momentos de adversidade.

Nesse momento gostaria de agradecer primeiramente a pessoa que acreditou em mim e abriu as portas me dando a oportunidade de crescer....meu Orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, muito obrigada pela atenção e oportunidade de crescimento profissional, me guiando neste caminho fabuloso do conhecimento....

À minha companheira de coração, trabalho, lar, problemas, choros e risos...Mariana Três Cardoso, que me acompanhou durante toda essa caminhada com bom humor e sorriso largo...me ajudando com nossos sofridos cães com cinomose.

Ao meu grande amigo Atanásio Vidane,...com sua calma e dom nato na arte de ensinar, foi um grande companheiro durante este trajeto, sempre me dizendo no meu momento de pressa e pavor...tenha paciência, calma.... Essas palavras sempre tiveram para mim um efeito anestésico capaz de me acalmar e conseguir reorganizar meus pensamentos.

À Vanessa querida amiga que me recebeu desde o começo com os braços abertos, mostrando o fabuloso mundo até então invisível para mim (filhinhas invisíveis né Van rs) e que com seu sorriso e bom humor sempre fez o meu dia ser surpreendente e de alto astral....por sinal combinamos muito né Van....rs.

Aos companheiros de grupo e do Laboratório LMMD que me orientaram em muitos momentos durante a execução deste experimento... Aline, Nayra, Juliano, Rafael, Cury, Natália, Kelly, Ana Carolina, Tiago, Mariane Martucci, Luciana, Nina, Luciana, Danielle Passarelli e entre outros que mesmo indiretamente somaram conhecimento neste trabalho, meu muito obrigado!

À amiga veterinária Juliana Casals, que me surpreende a cada dia com seu amor ilimitado aos animais, obrigada por toda colaboração neste trabalho, mesmo sabendo que houve momentos dolorosos para você, agradeço profundamente por sua ajuda!

À minha querida mãe Maria Luiza, que mesmo sabendo de todos os desafios que já enfrentei em minha vida, sempre acreditou em mim, mesmo não tendo a oportunidade de realizar meu sonho antes, devido nossas dificuldades, ela sempre soube que não desistiria....e hoje estou aqui encerrando mais uma fase de minha vida com extrema alegria e sensação de dever cumprido.

Ao meu pai pela compreensão em aceitar minha ausência, que mesmo demonstrando imparcialidade, sinto que torce por mim sempre.

Ao querido amigo, companheiro, amante e marido Rodrigo (*in memoriam*) que não pode compartilhar este momento de alegria, mas que se tornou mesmo com sua ausência, uma inspiração na arte de ser feliz sempre, não importando o julgamento alheio....Felicidade é o que importa, o resto a gente corre atrás!

Agradeço a Deus por todas estas pessoas maravilhosas colocadas em meu caminho, com as quais pude aprender muito e crescer como pessoa.

Agradeço a agência financiadora CAPES pelo suporte financeiro ao projeto.

*A conquista é um acaso que talvez
dependa mais das falhas dos vencidos do
que do gênio do vencedor.*

Madame de Staël

RESUMO

PINHEIRO, A. O. de. Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino. [Assessment of the experimental treatment of dogs naturally infected with the canine distemper virus neurological phase using the stem cells from fetal canine olfactory epithelium]. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A cinomose é uma doença infecciosa de ocorrência mundial que acomete diversas espécies de carnívoros domésticos e selvagens. Devido ao alto nível de mortalidade de pacientes com cinomose, tratamentos alternativos e eficazes tornam-se necessários. A terapia utilizando células-tronco é uma ciência em formação considerada uma alternativa terapêutica promissora no tratamento de diversas patologias degenerativas, hereditárias e inflamatórias. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a resposta sistêmica dos animais infectados com o vírus da cinomose canina tratados com terapia medicamentosa convencional (Grupo Suporte - GS) e animais que receberam tratamento convencional associado à terapia celular com células-tronco mesenquimais de epitélio olfatório fetal canino (Grupo suporte + terapia celular- GSTC). O GS foi composto por cinco animais (n=5) e o GSTC composto por três animais (n=3) que foram acompanhados pelo período de quinze dias com avaliação da evolução da patologia de acordo com as principais alterações clínicas e laboratoriais através da análise das alterações hematológicas, avaliação bioquímica e urinária. Os resultados nos mostram que houve uma alta taxa de mortalidade em ambos os grupos (GS=4) e (GSTC=2) devido à gravidade dos sinais clínicos na fase aguda da doença, nos fornecendo dados imprecisos da evolução clínica dos pacientes. Conclui-se que faz necessário, estudos posteriores que selecionem animais na fase crônica da doença, devido à estabilização do quadro clínico e às características celulares das células-tronco, que podem se tornar um potencial método de controle do processo inflamatório sistêmico causado pelo vírus da cinomose, bem como promotor da reparação de células e tecidos lesionados pela injúria viral direta, através da diferenciação e repovoamento de células danificadas, restaurando a integridade e funcionalidade do Sistema Nervoso Central (SNC).

Palavras- chave- Cinomose. Células-tronco. Infecciosa. Tratamento. Vírus.

ABSTRACT

PINHEIRO, A. O. de. **Assessment of the experimental treatment of dogs naturally infected with the canine distemper virus neurological phase using the stem cells from fetal canine olfactory epithelium.** [Avaliação do tratamento experimental de cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase neurológica com o uso de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino]. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Canine distemper is an infectious disease of world occurrence that affects many species of domestic and wild carnivores. Due to the high level of mortality in patients with cinomose, and effective alternative treatments are necessary. Cellular therapy is a promising therapeutic alternative for the treatment of various degenerative, hereditary and inflammatory diseases. Therefore, this study aimed to evaluate and compare the systemic response of animals infected with canine distemper virus treated using conventional drug therapy (support group - SG) and with cell therapy with using mesenchymal stem cells from canine fetal olfactory epithelium (Support group + therapy cell), following the evolution of the pathology according to the main clinical and laboratory findings through the analysis of hematological abnormalities, and urinary biochemical evaluation. The GS was composed of five animals (n = 5) and the GSTC composed of three animals (n = 3) were followed by fifteen days period with evaluation of the evolution of the disease according to the main clinical and laboratory findings by analyzing haematological, biochemical and urinary assessment. The results showed that a high mortality rate (SG=4) e (SG+SC=2) due to the severity of clinical signs in the acute phase of the disease, providing inaccurate data on the clinical evolution of patients. We conclude that is necessary, to select animals that further studies in the chronic phase of the disease, due to the stabilization of the clinical and cellular characteristics of stem cells, which can be a potential method of controlling systemic inflammation caused by the virus distemper, as well as a promoter of cell and tissue repair lesioned by direct viral injury, through differentiation and repopulation of damaged cells, restoring the integrity and functionality of the Central Nervous System (CNS).

keywords: Distemper. Stem cells. Infectious. Treatment. Virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho experimental do projeto.....	37
Figura 2 -	Coleta e processamento de amostras de epitélio olfatório fetal canino.....	57
Figura 3 -	Células-tronco mesenquimais em cultivo em diferentes passagens.....	58
Figura 4 -	Visualização das placas com formação de colônias.....	60
Figura 5 -	Células em 12 ^a passagem após processo de criopreservação celular.....	61
Figura 6 -	Imagem de diferenciação adipogênica.....	62
Figura 7 -	Imagem de diferenciação osteogênica.....	63
Figura 8 -	Imagem de diferenciação condrogênica.....	64
Figura 9 -	Imagem de diferenciação neurogênica.....	65
Figura 10 -	Expressão positiva de marcadores mesenquimais de células em terceira passagem.....	66
Figura 11 -	Expressão negativa de marcadores hematopoiéticos de células em terceira passagem.....	67
Figura 12 -	Expressão de marcadores neuronais.....	68
Figura 13 -	Controle negativo das amostras de marcadores mesenquimais hematopoiéticos e neuronais.....	69
Figura 14 -	Histogramas de citometria de fluxo.....	71
Figura 15 -	Inoculação em camundongos Nudes.....	72
Figura 16 -	Eutanásia dos camundongos Nudes com coleta de amostras de tecidos.....	73
Figura 17 -	Imagens histológicas das amostras coletadas dos camundongos Nudes.....	74
Figura 18 -	Imagens histológicas das amostras coletadas dos camundongo.....	75
Figura 19 -	Imagens histológicas das amostras coletadas dos camundongos Nudes.....	76
Figura 20 -	Teste de RT-PCR das amostras.....	79

Figura 21 - Principais sinais clínicos de cães com cinomose.....84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Representação gráfica do perfil de crescimento das células-tronco mesenquimais de epitélio olfatório fetal canino.....	59
-------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio de cultura utilizado para cultivo.....	39
Tabela 2 -	Composição do meio de criopreservação celular.....	40
Tabela 3 -	Especificação dos anticorpos primários específicos utilizados para a caracterização de marcadores mesenquimais e marcadores neuronais de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.....	46
Tabela 4 -	Especificação dos anticorpos secundários utilizados na caracterização de marcadores mesenquimais e marcadores neuronais de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.....	47
Tabela 5 -	Primers utilizados nas reações de RT-PCR para o Vírus da cinomose canina.....	50
Tabela 6-	Formação de colônias.....	60
Tabela 7-	Relação dos valores de células criopreservadas antes e após o descongelamento.....	61
Tabela 8 -	Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores mesenquimais e hematopoiéticos de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.....	70
Tabela 9-	Relação dos animais que compreenderam os grupos experimentais de acordo com a idade, sexo, raça, esquema vacinal e resultado do PCR.....	78
Tabela 10-	Relação dos resultados de PCR das amostras dos animais o Grupo Suporte e Grupo Suporte Terapia Celular.....	79
Tabela 11 -	Relação dos sinais clínicos sistêmicos observados no primeiro atendimento.....	80
Tabela 12 -	Relação dos sinais neurológicos observados no primeiro atendimento.....	82
Tabela 13 -	Localização das lesões no Sistema Nervoso Central.....	83
Tabela 14 -	Diferença estatística em relação aos grupos na avaliação hematológica.....	85
Tabela 15 -	Diferença estatística em relação ao tempo na avaliação hematológica.....	86
Tabela 16 -	Relação do tratamento proposto nos grupos GS e GSTC.....	89
Tabela 17-	Relação da evolução clínica de acordo com o tratamento proposto.....	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVO	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4.1 CINOMOSE CANINA	26
4.1.1 Etiologia	26
4.1.2 Fisiopatologia	26
4.1.3 Sinais Clínicos	27
4.1.4 Diagnóstico.....	28
4.1.5 Tratamento.....	30
4.1.6 Prognóstico	31
4.1.7 Prevenção e Controle.....	31
4.2 Células-tronco e terapia celular	31
4.2.1 Células-tronco derivadas de epitélio olfatório fetal canino	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL	37
5.2 LABORATÓRIOS	38
5.3 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR.....	38
5.3.1 Obtenção dos animais.....	38
5.3.2 Coleta de amostras de epitélio olfatório fetal canino.....	38
5.3.3 Isolamento e cultivo de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino	39
5.3.4 Criopreservação.....	39
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO FETAL CANINO	40
As células-tronco foram testadas com a aplicação de diversos testes de caracterização celular.	40
5.4.1 Curva de crescimento das células de epitélio olfatório fetal canino	40
5.4.2 Avaliação da capacidade de formação de colônias.....	42

5.4.3 Viabilidade celular.....	42
5.4.4 Diferenciação In vitro.....	43
5.4.4.1 Diferenciação Adipogênica	43
5.4.4.2 Diferenciação Osteogênica	44
5.4.4.3 Diferenciação Condrogênica	44
5.4.4.4 Diferenciação Neurogênica	45
5.4.5 Métodos celulares.....	45
5.4.5.1 Caracterização imunofenotípica por Imunocitoquímica.....	45
5.4.5.2 Caracterização imunofenotípica por Citometria de fluxo.....	47
5.4.6 Avaliação do potencial carcinogênico das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em camundongos imunossuprimidos – Balb/c Nude	48
5.5 TESTE PRÉ-CLÍNICO	48
5.5.1 Animais e critérios de inclusão.....	49
5.5.2 Grupos experimentais.....	49
5.5.3 Acondicionamento dos animais.....	49
5.5.4 Avaliação Clínico/Laboratorial	50
5.5.5 Realização de RT-PCR.....	50
5.5.6 Avaliação Hematológica	52
5.5.7 Avaliação Bioquímica	52
5.5.8 Avaliação Urinária.....	53
5.5.9 Tratamento.....	53
5.5.10 Acompanhamento clínico e laboratorial.....	54
5.5.11 Análise Estatística	54
6 RESULTADOS	56
6.1 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR.....	56
6.1.1 Coleta, isolamento e cultivo de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino	56
6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO FETAL CANINO	58
6.2.1 Curva de crescimento das células de epitélio olfatório fetal canino	59
6.2.2 Avaliação da capacidade de formação de colônias.....	60
6.2.3 Viabilidade celular.....	61
6.2.4 Diferenciação In vitro.....	62
6.2.4.1 Diferenciação Adipogênica	62
6.2.4.2 Diferenciação Osteogênica	63
6.2.4.3 Diferenciação Condrogênica	63
6.2.4.4 Diferenciação Neurogênica	64

6.2.5 Métodos celulares.....	65
6.2.5.1 Caracterização imunofenotípica por Imunocitoquímica.....	65
6.2.5.2 Imunocitoquímica de marcadores neuronais	68
6.2.4.3 Caracterização imunofenotípica por Citometria de fluxo.....	70
6.2.6 Avaliação do potencial carcinogênico das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em camundongos imunossuprimidos – Balb/c Nude.	72
6.3 TESTE PRÉ-CLÍNICO	77
6.3.1 Realização de RT-PCR.....	78
6.3.2 Evolução da doença de acordo com os sinais clínicos sistêmicos e neurológicos.....	79
6.3.3 Avaliação Hematológica	84
6.3.4 Avaliação Bioquímica	86
6.3.5 Avaliação Urinária.....	87
6.3.6 Tratamento e acompanhamento clínico laboratorial.....	88
7 DISCUSSÃO	92
8 CONCLUSÃO	98
REFERENCIAS	99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma das doenças mais comuns e importantes da espécie canina, que determina altos índices de mortalidade, possuindo índices de letalidade inferior apenas comparado à raiva canina (BARBOSA; PASSOS, 2008; ZACHARY, 2009). É uma enfermidade infecciosa altamente contagiosa de distribuição mundial (BEER, 1988) que acomete membros da família Canidae (cães, lobos, raposas, coiotes, dingo, chacal e guaraxains), além de mamíferos das famílias Felidae (leopardo, leões, tigres, e guepardos), Mustelidae (furão, visão, doninha, arminho, marta, texugo, cangambá e lontra), Viverridae (civet), Procyonidae (urso formigueiro, panda e urso negro) e Cercopithecidae (macaca mulatta) (BEER, 1988; WEISTINS, 2007; MEGID et al., 2009; QUI et al., 2011; COTTRELL et al., 2013).

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem características desejáveis, como autorrenovação, diferenciação em diversas linhagens celulares, apoio de fatores na hematopoiese, crescimento e secreção de citocinas, imunorregulação com capacidade de interagir com células envolvidas na resposta imune e controle da resposta inflamatória sistêmica, que podem se tornar candidatas promissoras na terapia celular (BYDLOWSKI et al., 2009; PACINI, 2014). As células-tronco mesenquimais são amplamente estudadas e utilizadas em doenças que envolvem o sistema nervoso central (lesões medulares crônicas, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, traumatismo raquimedular agudo, anóxia neonatal, isquemia cerebral, epilepsia, doença de Parkinson e lesões de nervos periféricos) (PAULA et al., 2005; BYDLOWSKI et al., 2009) doenças do sistema hematológico (leucemias e linfomas) e doenças cardiovasculares (OKAMOTO; CAMPOS, 2004). Segundo Granger et al., (2012) as células-tronco de epitélio olfatório são amplamente estudadas em animais e seres humanos em ensaios clínicos randomizados que envolvem o sistema nervoso central.

Por sua incidência e relevância tanto em animais domésticos como em silvestres, o presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta sistêmica dos animais infectados pelo vírus da cinomose canina, tratados experimentalmente com células-tronco de epitélio olfatório fetal canino, através do acompanhamento das alterações laboratoriais e evolução dos sinais clínicos, baseado na hipótese de que a terapia celular pode promover benefícios na resposta imunomoduladora e recuperação dos pacientes através da possível reparação tecidual do SNC e outros sistemas acometidos pela injúria viral direta.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A cinomose canina é uma doença de cães e carnívoros selvagens, causada por um morbilivírus da família *Paramyxoviridae*, altamente contagiosa e com incidência mundial. Devido à alta taxa de mortalidade de cães infectados pelo vírus da cinomose, com a utilização de protocolos terapêuticos empregados atualmente, faz-se necessário o estudo de terapias alternativas e inovadoras. Os carnívoros domésticos são considerados um modelo ideal para estudo de disfunções ou doenças que acometem os seres humanos, pois possuem similaridades de inúmeras desordens de ordem genética e/ou doenças crônicas e degenerativas. Além disso, eles também podem ser facilmente manipulados, o que torna viável a condução de experimentos com resultados mais confiáveis.

A utilização da terapia com células-tronco mesenquimais (MSCs) em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose, com quadro multissistêmico e envolvimento do sistema nervoso central (encefalomielite), é justificada devido a capacidade de diferenciação em células neuronais e não-neuronais que podem favorecer a reparação tecidual causada pela injúria viral, além de controlar a resposta inflamatória sistêmica devido sua ação imunomoduladora.

Portanto, o presente estudo visa aprofundar o conhecimento a respeito da resposta clínica e sistêmica proporcionada pela terapia com célula-tronco, auxiliando no tratamento sistêmico e neurológico causada pela injúria viral direta, esperando-se que os resultados deste experimento possam contribuir para estudos da resposta imunomoduladora das células-tronco sobre uma doença viral com alta morbidade na medicina veterinária.

OBJETIVOS

3 OBJETIVO

O objetivo deste experimento é avaliar os efeitos do tratamento experimental com células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em animais infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase aguda com comprometimento neurológico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Isolar, caracterizar e formar um banco de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.
- * Testar o tratamento experimental com células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina na fase aguda.
- * Avaliar e comparar as alterações hematológicas, bioquímicas e urinárias de cães infectados com o vírus da cinomose canina, tratados e não tratados com células-tronco de epitélio olfatório fetal canino.
- * Avaliar a evolução da patologia acompanhando a evolução clínica e neurológica dos cães infectados.

REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CINOMOSE CANINA

4.1.1 Etiologia

A cinomose é uma doença causada por um RNAvírus da família *Paramyxoviridae* e do gênero *morbilivírus* (NOLETO, 2009; ZACHARY, 2009) com simetria helicoidal que mede aproximadamente 100- 130nm e que antigenicamente está relacionado com os vírus da peste dos pequenos ruminantes, da peste bovina, do sarampo em humanos, do sarampo nas focas, morbilivírus equino e morbilivirose do golfinho e do boto (CORREA; CORREA, 1979; WEISTINS, 2007; ZACHARY, 2009). Esse vírus infecta animais imunossuprimidos, não imunizados ou que apresentam esquema vacinal incompleto e que tenham contato direto com animais infectados ou meio ambiente contaminado (NOGUEIRA et al., 2009). Susceptível ao calor, luz, detergentes, desinfetantes e ácidos, no meio ambiente a dessecação desse vírus ocorre 14 horas após o contato com raios solares e em laboratório o vírus é inativado à 56° por 10-30 minutos. Quando conservado em baixas temperaturas, ele se mantém viável por meses à 4°C e quando congelado, por anos. Os desinfetantes comuns, como os fenóis e amônio quaternário, destroem facilmente o vírus, além de detergentes e ácidos (pH < 4,4) (SCHMIDT, 1987; FENNER et al., 1987; McCANDLISH, 2001; SHERDING, 2008).

4.1.2 Fisiopatologia

A cinomose canina é uma doença viral de apresentação clínica aguda, subaguda ou crônica que afeta principalmente o sistema respiratório, gastrintestinal e nervoso (MANGIA; PAES, 2008; SONNE et al., 2009). A patogênese e a gravidade da doença são influenciadas

de acordo com as condições imunológicas do hospedeiro, idade do animal, virulência e dose da cepa envolvida (SHERDING, 2008; NELSON; COUTO, 2010).

Os animais infectados e doentes eliminam o agente através de secreções oculonasais, lacrimais, salivares, urinárias e aerossóis (BEER, 1988). Os animais susceptíveis são infectados através das vias respiratórias superiores ou por via digestória por contato direto com secreções e aerossóis ou indireto por fômites, alimentos e água contaminada por secreções de cães enfermos (CORREA; CORREA, 1979). O vírus ingerido é absorvido por macrófagos orofaríngeos, mas não são capazes de sobreviver em contato com o ácido clorídrico (McCANDLISH, 2001).

Após o contato do vírus com o epitélio respiratório ou digestório ocorre a replicação e disseminação viral pelos macrófagos para os gânglios linfáticos regionais (retrofaríngeos e bronquiais) e tonsilas. Entre quatro e seis dias ocorre nova replicação e disseminação aos tecidos linfóides sistêmicos envolvendo fígado, baço, timo, linfonodos mediastínicos e mesentéricos e trato gastrintestinais, causando aumento inicial na temperatura corporal e leucopenia. No período do oitavo ao décimo dias o vírus se dissemina aos tecidos do epitélio (epiteliotropismo) e sistema nervoso central (SNC) (neurotropismo). Após este período o efeito subsequente varia conforme a resposta imune do hospedeiro, que pode incluir a fase subclínica com recuperação total e eliminação do vírus através da resposta imune rápida e efetiva do organismo; fase crônica pela resposta imunológica lenta ou parcial com sintomas multissistêmicos ausentes ou discretos com possibilidade de resultar em uma encefalomielite desmielinizante crônica pela instalação do vírus no SNC; e forma aguda com sinais multissistêmicos e encefalomielite no SNC pela resposta imune ineficiente e que causa alta taxa de mortalidade (BEER, 1988; MANGIA; PAES, 2008; SHERDING, 2008; ZACHARY, 2009).

4.1.3 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da cinomose são multissistêmicos e variáveis, desenvolvem-se pouco tempo após a infecção e acomete o trato respiratório, gastrointestinal e SNC (SHERDING, 2008; SONNE et al., 2009; DIAS et al., 2012). O vírus é capaz de causar

imunodepressão grave que favorece sinais sistêmicos causadas por infecções bacterianas secundárias (CHRISMAN, 1985).

As alterações clínicas observadas inicialmente no exame físico incluem prostração, inapetência, febre, secreção ocular serosa ou mucopurulenta, aumento das tonsilas e linfonodos, ruídos bronquiais, crepitações e sibilos nos cães com broncopneumonia, vômitos, diarreia, desidratação, dermatite pustulosa abdominal, hiperqueratose nasal e coxins podais. O envolvimento de hiperqueratose em coxins podais indica que possivelmente ocorrerá envolvimento de SNC (CHRISMAN, 1985; McCANDLISH, 2001; LITFALLA et al., 2008; NELSON; COUTO, 2010). Além disso, os cães infectados durante o desenvolvimento da dentição podem apresentar hipoplasia de esmalte dentário (McCANDLISH, 2001). No exame oftalmológico podem ser identificadas alterações como coriorretinite, neurite óptica e deslocamento de retina (NELSON; COUTO, 1994). De acordo com Rezende (2009), através de estudos histopatológicos do coração de cães com cinomose, observa-se presença de alterações miocárdicas, caracterizadas por miocardite, degeneração hialina, hiperemia e hemorragia.

As doenças inflamatórias do SNC são causadas por microorganismos infecciosos, parasitários ou reações imunes (LORENZ, 2006). O vírus da cinomose é uma das principais causas de doenças neurológicas em cães. Os sinais neurológicos podem surgir durante a apresentação multissistêmica ou após meses da cura da manifestação inicial da doença, consideradas irreversíveis e tratadas sintomaticamente quando não há indicação de eutanásia (CHRISMAN, 1985; BRITO et al., 2009). Entre os sinais neurológicos mais comuns se incluem mioclonia, convulsões, ataxia, incoordenação, hiperestesia, andar em círculos, rigidez muscular, vocalização, reações de medo e cegueira (HOSKINS, 2004). Sinais neurológicos como paresia e ataxia dos membros posteriores podem ser causados por acometimento da medula espinhal tóracolombar, que pode evoluir para quadro de tetraplegia em caso de acometimento de medula cervical (CHRISMAN, 1985).

4.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da cinomose se baseia na anamnese e nos sinais clínicos. Nos casos subagudos o diagnóstico clínico pode se tornar inviável (HOSKINS, 2004). Os métodos

utilizados para diagnóstico laboratorial se baseiam na pesquisa por inclusões virais, isolamento viral, imunofluorescência indireta, RT-PCR, n-PCR e RT-iiPCR (SCHIMIDT, 1987; NELSON; COUTO, 1994; AMARAL, 2008; WILKES et al., 2014)

Segundo trabalho realizado por Hoskins (2004) as principais alterações laboratoriais identificadas em cães com cinomose, são anemia normocítica normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, e elevação da fração alfa 2 das globulinas e que são alterações laboratoriais que podem auxiliar no diagnóstico clínico. Entretanto, McCandlish (2001) os achados bioquímicos são inespecíficos.

A anemia normocítica normocrômica é atribuída ao aumento da destruição eritrocitária, seja pela destruição direta pelo vírus ou pela reação imunomediada através da deposição de imunocomplexos na membrana dos eritrócitos e pela diminuição da produção de eritrócitos (MENDONÇA et al., 2000).

O leucograma pode se apresentar variável de acordo com apresentação clínica, com episódios de leucopenia devido a replicação viral no sistema linfóide ou leucocitose devido à infecções bacterianas oportunistas que levam à leucocitose por neutrofilia (SILVA et al., 2005).

Durante a fase aguda a linfopenia se caracteriza por uma depleção transitória de células T helper (CD4), células T citotóxicas (CD8) e células B (CD21) no sangue periférico. O reduzido número de células imunes circulantes se justifica pelo dano celular ocorrido nos órgãos linfóides que alteram a produção celular e pela apoptose de leucócitos no sangue periférico. Os linfócitos T são mais afetados pelo CDV vírus que os linfócitos B, ocorrendo a depleção rápida de linfócitos T Helper (CD4) por várias semanas. A destruição de linfócitos T citotóxicos é menor, sendo capazes de se recuperarem em menor tempo (PINOTTI et al., 2009).

As inclusões citoplasmáticas denominadas Corpúsculos de Lentz são visualizadas em eritrócitos e leucócitos na fase de viremia da doença e, quando identificadas, são seguramente patognomônico da cinomose canina, mesmo sem alterações clínicas identificáveis (ALMEIDA et al., 2009). De acordo com Noletto et al. (2011) a infecção transplacentária tem sido relatada em cães domésticos, com presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em cães neonatos.

A análise do líquido cerebrospinal pode ser realizada para diagnosticar processo inflamatório do SNC, na qual, nos animais com cinomose pode ocorrer aumento de celularidade, com concentração de proteínas elevada. Em outros casos, pode-se observar exclusivamente aumento de proteínas, sem diferença no valor de celularidade ou mesmo se

apresentar normal (CHRISMAN, 1985). A sorologia do líquido cérebro espinhal deve ser realizada para pesquisa de anticorpos contra agentes infecciosos. Em animais saudáveis deve-se encontrar pouco ou nenhum anticorpo. Em cães que apresentam grande quantidade de anticorpos intratecais, a análise indica que está ocorrendo produção de imunoglobulinas contra os anticorpos encontrados e que são os causadores da encefalite recorrente (FENNER, 2004).

No diagnóstico *post mortem* de animais suspeitos a imunohistoquímica demonstra ser um método eficaz na detecção do vírus da cinomose canina, permitindo a visualização da marcação de antígenos virais e corpúsculos de inclusão em diversos tecidos como coxins digitais, estômago, pálpebras, orelhas, tonsilas, linfonodos, língua e cerebelo (SONNE et al., 2009)

4.1.5 Tratamento

O tratamento da cinomose canina se baseia em tratamento sintomático e de suporte de acordo com a apresentação clínica (McCANDLISH, 2001) O tratamento convencional para a cinomose não é muito eficaz, pois as sequelas são constantes, sendo em muitos casos indicada a eutanásia (UEDA et al., 2008). Os cuidados de suporte se baseiam na correção da desidratação, através de reidratação oral ou sistêmica; dieta leve e de alta qualidade e cuidados de manejo adequado (McCANDLISH, 2001).

As infecções secundárias ocorrem devido à imunossupressão, que podem levar à quadro de pneumonia bacteriana que requerem antibioticoterapia de amplo espectro. A vitamina B deve ser suplementada devido à perda pela diurese e anorexia (GREENE, 1990). Em caso de vômito e diarreia deve-se utilizar antieméticos e limitar a ingestão de alimento (SHERDING, 2008)

A terapia anticonvulsivante deve ser realizada em casos de manifestações neurológicas como mioclona e crises epilépticas. Os medicamentos de eleição são o fenobarbital e o brometo de potássio (TILLEY; SMITH Jr, 2008).

A acupuntura é um tratamento eficiente em animais na fase crônica e com alterações neurológicas. A associação entre o tratamento convencional e acupuntura é uma opção para evitarmos as sequelas e até o óbito (UEDA et al., 2008).

4.1.6 Prognóstico

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

4.1.7 Prevenção e Controle

A imunização de cães contra a cinomose deve considerar a idade na qual os cães se tornam susceptíveis à cinomose. A idade é proporcional ao título de anticóps maternos que variam de acordo com a transferência através do colostro materno. Devido idade variada em que os filhotes se tornam susceptíveis a cinomose, administra-se uma série de vacinações de acordo com programas de imunização que maximizem a probabilidade de induzir a imunidade (HOSKINS, 2004). A imunização por meio da vacinação é a única abordagem eficaz na prevenção da cinomose em cães (LECOTEUR; GRANDY, 2004).

4.2 Células-tronco e terapia celular

As células-tronco são células indiferenciadas que possuem como principais características a autorrenovação e a diferenciação em diversos tipos celulares de acordo com as condições do microambiente (BYDLOWSKI et al., 2009). Estas podem ser classificadas

em células-tronco embrionárias e adultas. As embrionárias são células pluripotentes isoladas da massa interna dos blastocistos ou a partir de células germinativas primordiais de um embrião no início de seu desenvolvimento (BYDLOWSKI et al., 2009). As células mesenquimais são consideradas células multipotentes que possuem potencial de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares. São consideradas relevantes no uso da terapia celular devido sua simplicidade de isolamento. Devem possuir padrão fenotípico mínimo para sua caracterização em células mesenquimais como: aderência ao plástico; marcadores de membrana positivos para CD105, CD73 e CD90 e marcadores negativos para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR; e devem diferenciar-se *in vitro* em linhagens de condrócitos, adipócitos e osteoblastos (DOMINICI et al., 2006; NERY et al., 2013). Possuem capacidade imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam as possibilidades terapêuticas. São capazes de secretar uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento, que podem proporcionar a modulação da resposta inflamatória, o restabelecimento da vascularização, a reparação tecidual e a indução de células presentes nos tecidos à secretarem substâncias que induzem células não diferenciadas a realizarem o processo de reparação tecidual (MONTEIRO, 2010).

A terapia celular busca restaurar a funcionalidade de tecidos ou órgãos através da proteção da reconstituição celular ou reposição de células lesionadas por células saudáveis. As células-tronco tecido-específicas tornaram-se importante fonte para reposição celular, podendo ser transplantadas no local da lesão ou recrutadas ao local por meio da estimulação da síntese de moléculas quimiotáticas (OKAMOTO; CAMPOS, 2004). É uma abordagem inovadora na medicina humana e veterinária, que será incluída inequivocadamente na área médica, como um grande avanço no restabelecimento de tecidos lesionados ou perdidos em consequência de doenças ósseas, cardíacas, imunomediadas e neurodegenerativas. Em contrapartida, após a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos, a terapia baseada em MSC enfrenta uma fase desafiadora. Ensaios clínicos têm relatado benefícios moderados não-duráveis com a terapia, que causaram inicialmente expectativas que não se consolidaram, necessitando com isso estudos de maior abrangência (PACINI, 2014). Portanto, é importante desenvolver padrões internacionais de produção MSCs com práticas otimizadas de qualidade e praticidade médica, que sejam fiscalizadas por uma agência reguladora que busque uma medicina baseada em evidências, tornando a terapia celular um tratamento amplamente adotado para diversas doenças (IKEBE; SUZUKI, 2014).

Em relação às doenças do sistema nervoso central, pouco é conhecido sobre os mecanismos responsáveis pela melhora funcional na terapia celular. No entanto, acredita-se

que alguns processos podem envolver a indução da neurogênese do local da lesão, a transdiferenciação celular, a fusão celular e o efeito parácrino (PAULA et al., 2005).

Mesmo diante ao fato de na atualidade vários ensaios clínicos estarem em andamento em diversas fases de experimentação, questões importantes continuam aguardando comprovações científicas (NERY et al., 2013). Quanto às vias a serem utilizadas na administração da terapia celular, podemos citar diversos trabalhos baseados em experimentos comparando a eficácia da terapia, relacionado com o tipo de via de administração com os sistemas orgânicos acometidos pelas patologias. De acordo com Fischer et al. (2009), classificam as vias locais e arterial como as mais efetivas na administração da terapia celular. Em seu experimento, foi realizado tratamento com células-tronco mesenquimais em ratos com lesão cerebral traumática moderado (LCT) utilizando dose única por via endovenosa de 4×10^6 , 24 horas pós-trauma, que não proporcionou por esta via, um enxerto substancial de células no cérebro ou melhoria da recuperação funcional. Este resultado ocorreu, devido ao efeito de primeira passagem pulmonar, em que a microvascularização pulmonar realiza efeito de filtragem evitando que as células atinjam a circulação arterial. Quanto à quantidade de células a serem utilizadas, ainda não estabeleceu-se o número mínimo de células necessárias para exercer um efeito terapêutico no interior da área da lesão do órgão alvo para diversas doenças.

4.2.1 Células-tronco derivadas de epitélio olfatório fetal canino

O epitélio olfatório é um órgão sensorial responsável pela sensibilidade olfativa, situado na região dorso-caudal da cavidade nasal, superior às fossas nasais, que revestem o etmoide e a concha dorsal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMUELSON, 2007). No epitélio olfatório a neurogênese é contínua, perpetuando-se por toda a vida. Este epitélio está em contato direto com o ambiente externo e suas células estão constantemente expostas a agentes e substâncias nocivas (HASSENKLOEVER et al., 2009). É um neuroepitélio compreendido por um epitélio colunar pseudo-estratificado espesso, formado por três tipos celulares: Células olfatórias, células de sustentação e células basais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMUELSON, 2007).

As células olfatórias são o componente principal do epitélio, sendo um neurônio bipolar que responde aos agentes químicos do ar e fornecem o sentido olfativo. As células de sustentação são compreendidas por corpos colunares que se projetam em direção às vias aéreas. Possuem a função de fornecer suporte físico para a porção neurosensorial, como também proteger as células olfatórias, facilitando sua nutrição. As células basais são consideradas as células-tronco do epitélio olfatório, devido sua habilidade pluripotencial que pode originar células de sustentação ou olfatórias. São células pequenas e arredondadas, que situam-se na região basal do epitélio, entre as células de sustentação e olfatórias (SAMUELSON, 2007).

Na medicina humana, as células-tronco de epitélio olfatório de pacientes com doenças neurodegenerativas e familiares já são utilizadas como modelo de estudo de doenças como a esquizofrenia, Doença de Parkinson e disautonomia familiar, mostrando alterações específicas da doença através da expressão gênica e funções celulares (MACKAY-SIM, 2012). De acordo com Murrel et al. (2005) resultados obtidos demonstraram a existência de uma haste-multipotentes como célula da mucosa olfativa útil para terapias de transplante autólogo de estudos celulares e de doença.

Segundo Alves (2009) foi comprovado a existência de células-tronco no epitélio olfatório fetal canino que foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais (MSCs). Em cultivo, apresentaram uma morfologia similar a dos fibroblastos e uma proliferação acelerada e indefinida sem alterações fenotípicas apreciáveis. Também foram acessíveis à criopreservação com alta viabilidade pós-congelamento similar a das células não congeladas, o que faculta a criação de banco de células para futuras pesquisas da sua viabilidade celular. A análise imunofenotípica revelou expressão inespecífica de marcadores HLA-DR, HLA-ABC, CD13, CD29, CD31, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), expressão positiva dos marcadores CD29 (integrina β 1) com uma leve tendência à expressão para o CD13 e CD34 e não expressão dos marcadores específicos de células hematopoiéticas CD44 e CD45. Sob condições específicas de cultivo, foram capazes de se diferenciarem em linhagens osteogênicas, adipogênicas e neurogênicas. Estes achados sugerem que as MSCs derivadas de epitélio olfatório fetal canino representam uma fonte potencial de células-tronco, bastante promissora na medicina regenerativa e terapia celular, principalmente no tratamento de doenças neurológicas, devido à sua capacidade de diferenciação em linhagens neurogênicas.

Quanto à diferenciação neurogênica, estas células-tronco foram cultivadas e avaliadas por imunofluorescência indireta, com observação de células com expressão positiva para marcadores de precursores neuronais, com marcação positiva pelo marcador GFAP e

marcação nuclear positiva de células com DAPI nuclear. Em adição, a imunohistoquímica evidenciou células fusiformes com expressão positiva de neurofilamentos, um componente do citoesqueleto neuronal (ALVES et al., 2010).

As células-tronco neuronais são excelentes candidatas para transplantes porque, conforme relatos de Walton e Wolfe (2008) têm demonstrado repor tecido nervoso, elaborar fatores tróficos para o resgate de disfunção de neurônios endógenos, inibir inflamações e veicular proteínas terapêuticas. Recentes descobertas da capacidade regenerativa no SNC com células-tronco neurais traz a possibilidade de reparação de danos teciduais resultantes da deterioração através de doenças neurodegenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, lesões de medula espinhal e cerebrais, acidente vascular cerebral (AVC) e traumas (NERY et al., 2013).

Há duas estratégias básicas para a terapia celular nas doenças neurodegenerativas. A primeira se baseia na cultura das células-tronco e indução no tipo celular neuronal desejado e o segundo na implantação direta de células-tronco. Neste caso fatores endógenos secretados pelo tecido danificado induzem a diferenciação e finalização dos mecanismos de reparação endógena (NERY et al., 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

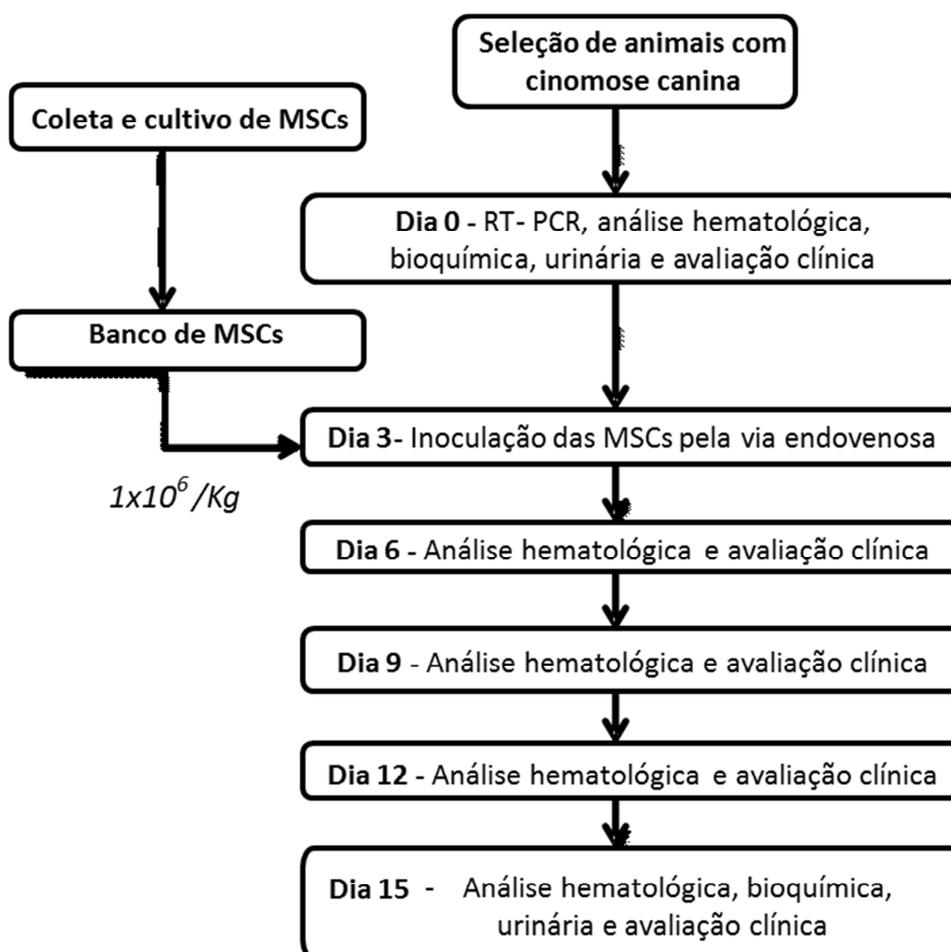
5 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, sob protocolo número 13.1.1757.74.6 emitido em 11/12/2013.

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado de acordo com a figura 1 abaixo:

Figura 1 - Desenho experimental do projeto



Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

5.2 LABORATÓRIOS

O presente estudo foi o realizado no Laboratório de Células-tronco e Terapia Gênica e na Unidade Didático Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Pirassununga.

5.3 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR

Foi estabelecido o cultivo celular de acordo com as seções abaixo:

5.3.1 Obtenção dos animais

Foram utilizados 20 fetos caninos de terço gestacional final (média de 60 dias), provenientes de úteros gravídicos sem raça definida (SRD) oriundas de programas de castrações nas clínicas das cidades e nos arredores de Pirassununga-SP credenciadas com o programa.

5.3.2 Coleta de amostras de epitélio olfatório fetal canino

Foram coletados fragmentos do epitélio olfatório dos fetos sob necropsia, em condições estéreis, 1 a 2 horas post mortem, localizado na porção superior da cavidade nasal abaixo da lamina crivosa do osso etmóide, anteriormente ao bulbo olfatório. O procedimento foi realizado através de corte sagital do crânio dos animais.

5.3.3 Isolamento e cultivo de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino

Os fragmentos do epitélio olfatório coletados foram depositados em placas de Petri e lavados com solução tampão PBS 5% adicionados de 5 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). O material devidamente higienizado foi colocado em uma nova placa de Petri para realização de dissociação química com 1mL de Tryple Express 0,25% (Invitrogen, Cat. No 12604) e incubada em estufa a 38,5° C com umidade relativa de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ durante 30 minutos. Para otimizar o processo de liberação das células olfatórias foi realizado simultaneamente a dissociação mecânica. Subsequentemente a amostra foi inativada com 1 mL de meio de cultura DMEM/ F12 e centrifugadas por 5 minutos em 303 g. Logo após, o meio foi descartado e o pellet ressuspenso e plaqueado em placas de petri de 35 mm acrescido de 2 mL de meio de cultivo composto por: 82% de DMEM/F-12 (Invitrogen, cat. N° 10565-018) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen. cat. N° 12657-029), 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma. cat. N° M-7145), 1% de L-glutamina (Life. cat. N° 25030), 1% penicilina/estreptomicina (Life. cat N° 15140-122) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo

Componente	Código	Porcentagem	50 mL
DMEM/F12 (Invitrogen)	10565-018	82%	41 mL
SFB (Sigma)	12657-029	15%	7,5 mL
Aminoácidos não essenciais (Sigma)	M-7145	1%	500 µL
L-glutamina (Life)	25030-081	1%	500 µL
Penicilina e Estreptomicina (Life)	15140-122	1%	500µL

Fonte: (ALVES, F., 2010).

5.3.4 Criopreservação

As células destinadas ao processo de criopreservação, foram distribuídas em criotubos com capacidade de 2 mL de meio de congelamento composto por: 45% de DMEM/F-12

(Invitrogen, cat. N° 10565--018) , 45% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen. cat. N° 12657-029) e 10% Dimetil-Sulfóxido (DMSO) (Tabela 2). Primeiramente, foi adicionada as células com o meio DMEM/F12 suplementado com o SFB com posterior adição do DMSO.

Os tubos foram identificados conforme tipo celular, nome, data e passagem e alocados em dispositivo próprio de congelamento “Misterfrost” para resfriamento lento das células. Este dispositivo permite o congelamento de -1°C por minuto, após serem colocados à temperatura de -80°C . Após 24hs os tubos foram transferidos para o tanque com nitrogênio líquido (-196°C) no qual permaneceram armazenados e criopreservados por tempo indeterminado para posterior utilização.

Tabela 2 – Composição do meio de criopreservação

Componente	Código	Porcentagem	Para 2 mL
DMEM/F12 (Invitrogen)	10565-018	45%	900 μL
SFB (Sigma)	12657-029	45%	900 μL
Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	D2650	10%	200 μL

Fonte: (ALVES, F., 2010)

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO FETAL CANINO

As células-tronco foram testadas com a aplicação de diversos testes de caracterização celular.

5.4.1 Curva de crescimento das células de epitélio olfatório fetal canino

Para avaliar a capacidade de propagação em cultivo e o perfil de replicação celular, foram plaqueadas células em primeira passagem numa densidade de 3×10^4 por placa de petri (35mm) num total de 03 placas para aumentar a acurácia dos resultados. Após o período de 96 horas, as células foram tripsinizadas e o número total determinado pela contagem celular.

Para a contagem celular, o meio foi retirado e 2 mL de tripsina foi adicionado, aguardando 15 minutos em estufa a 38,5° (para que as células aderidas fossem removidas do fundo). Logo após, as soluções foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL e então adicionados 2 mL de meio de cultura para inativação da tripsina. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 303 g, com posterior descarte do sobrenadante e suspensão do pellet celular em um 1 mL de meio de cultura.

Com o auxílio de uma pipeta, o pellet foi homogeneizado e 10 µL da solução foi colocado na Câmara de Neubauer para contagem celular. Foi realizada a contagem dos quatro quadrantes grandes das extremidades, sendo o total de células vivas multiplicado por 1 (diluição) e por 10⁴ (profundidade da câmara e correção por mL) dividindo-se este valor pelo número de quadrantes contados, conforme descrito abaixo. Após a contagem, as quantidades foram anotadas para posterior análise gráfica.

$$\frac{\text{Número total de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Em cada repique, foi replaqueado novamente igual número de células no valor 3x10⁴ em 03 placas de petri de 35 mm. Este processo foi realizado até a oitava passagem, onde o número total de células contadas após o repique celular, eram menor que o número de células plaqueadas.

De acordo com os dados obtidos durante várias passagens, foi estabelecido o padrão da curva de crescimento desta linhagem celular bem como o tempo de geração (*Doubling time*) com base na seguinte fórmula (CONSIGLIO et al., 2011).

$$DT = \frac{Ct}{Cd}$$

Onde: Dt – tempo de geração/duplicação, Ct – tempo de cultivo, Cd – células duplicadas, sendo que:

$$Cd = \frac{\ln(nf/ni)}{\ln 2}$$

5.4.2 Avaliação da capacidade de formação de colônias

Para avaliar a capacidade de formação de colônias das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino, 1×10^3 células em primeira passagem foram plaqueadas em três placas de cultivo de 100 mm de diâmetro, respectivamente. As células foram mantidas por onze dias em cultivo e o meio foi trocado a cada três dias. Após este período as culturas foram lavadas duas vezes por cinco minutos com tampão PBS, fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas novamente três vezes por cinco minutos com tampão PBS e coradas com Giemsa 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem das células com PBS para retirada do excesso do corante, foi possível a visualização e contagem das colônias em coloração roxa. As colônias com mais de 200 células foram contadas e fotomicrografadas.

5.4.3 Viabilidade celular

Para a realização do teste de viabilidade celular, 1×10^5 células em primeira passagem foram dispostas em três tubos criogênicos, respectivamente. Após uma semana, as células foram descongeladas em temperatura ambiente e transferidas para tubos cônicos de 15 mL com adição de meio de cultura, para inativar a toxicidade do criopreservador DMSO. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 303 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. As células foram homogeneizadas e 10 μ L de cada amostra foi aliquoteado e adicionou-se 10 μ L de Azul de Tripán. A solução foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer. O corante Azul de Tripán possui a capacidade de penetrar nas células mortas através da membrana plasmática das células rompidas. Com isso, foi possível calcular as porcentagens de células vivas e mortas por meio da visualização das células tingidas.

5.4.4 Diferenciação In vitro

As células de epitélio olfatório fetal canino em terceira passagem, foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas com a utilização de kits de diferenciação StemX Vivo™ da R&D Systems diferenciação e em células neurogênicas com o diferenciador monoetilglicerol (3 – mercapto-1, 2-propanediol, M-6145, Sigma). Foram rigorosamente seguidos os protocolos de acordo com orientações do fabricante. Como controles negativos, as células foram plaqueadas com protocolos iguais empregados na diferenciação, porém em meio de cultura DMEN F-12.

5.4.4.1 Diferenciação Adipogênica

Para diferenciação adipogênica, 1×10^5 células-tronco isoladas de epitélio olfatório fetal canino foram cultivadas em meio de cultura Básico: StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic (CCM007) com 1% de penicilina/estreptomicina e trocado a cada 3 dias. Ao atingir 100% de confluência, o meio básico foi suplementado com meio de diferenciação StemXVivo Adipogenic Supplement (CCM011), e trocado a cada 4 dias no total de 21 dias. Após este período ocorreu a diferenciação pela identificação de células com vacúolos lipídicos em seu citoplasma.

As células diferenciadas foram fixadas por 30 minutos a temperatura ambiente com paraformaldeído a 4% e lavadas 3 vezes com solução tampão PBS. Para coloração, elas foram incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos com Sudan Black e o excesso do corante foi retirado com algumas lavagens com solução tampão.

5.4.4.2 Diferenciação Osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células previamente cultivadas foram plaqueadas em 03 placas de 35 mm em uma densidade inicial de 1×10^5 em 2mL meio base *StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Media* (R&D Systems, Catalog. # CCM007) com 1% de penicilina/estreptomicina e trocado a cada dois dias. Ao atingir 70% de confluência, o meio básico foi substituído pelo meio de diferenciação *StemXVivo™ Osteogenic Supplement Media Supplement for Human MSC Osteogenesis* (Catalog # CCM008) com 1% penicilina/estreptomicina e trocado a cada 04 dias.

Após 21 dias de cultivo, as placas de diferenciação osteogênicas foram lavadas com solução tampão PBS e fixadas durante 30 minutos com paraformol a 4%. Após a fixação, as placas foram lavadas novamente com tampão PBS e água destilada e corada com Alizarim Red por 15 minutos.

5.4.4.3 Diferenciação Condrogênica

Para diferenciação condrogênica $2,5 \times 10^5$ células derivadas de epitélio olfatório fetal canino foram ressuspendidas em 5mL de meio básico *StemXVivo™ Human/Mouse Chondrogenic* (R&D Systems, n° cat. CCM005) adicionado com 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As células foram centrifugadas a 303 g por 5 minutos. O meio básico foi descartado e o pellet ressuspendido com 2mL de meio de diferenciação (meio básico suplementado com *StemXVivo™ Human/Mouse Chondrogenic Supplement, Media Supplement for Human and Mouse MSC Chondrogenesis* (R&D Systems, N° cat. CCM006), Os pellets foram mantidos em tubos cônicos de 15 mL adicionados de 0,5 mL de meio com diferenciador, trocado a cada três dias até ocorrer a diferenciação (21 dias). Após este período, as células foram fixadas por 30 minutos a temperatura ambiente com paraformaldeído 4%, com posterior processo de desidratação e imersão em parafina. Os blocos foram cortados em seções de 5 μ m com posterior processo de coloração com os corantes Alcian Blue e Tricomo de Masson.

5.4.4.4 Diferenciação Neurogênica

Para este procedimento, foi utilizado 3×10^5 células proveniente do cultivo celular que foram plaqueadas em placas de seis poços, com a presença de uma lamínula de microscopia no fundo. Após a identificação de 80% de confluência celular, foi adicionado 0,5 μ L monoetilglicerol (3 – mercapto-1, 2-propanediol, M-6145, Sigma) em cada poço. Após 24hs realizou-se a fixação da cultura em paraformoldeído a 4%, procedendo-se o protocolo para imunocitoquímica conforme item 5.3.5.1 para os seguintes marcadores de expressão neuronal como proteína glial fibrilar ácida GFAP[GF5], Nestin [SP103] e Neuron specific beta III Tubulin.

5.4.5 Métodos celulares

5.4.5.1 Caracterização imunofenotípica por Imunocitoquímica

Para realização do teste para imunocitoquímica, as células foram cultivadas em lamínulas de microscopia em placas de cultivo celular de 6 poços numa densidade de 3×10^5 células por poço. Após atingirem 80% de confluência, foram efetuadas as lavagem do cultivo com tampão PBS 3 vezes e a fixação com paraformol (4%) por 30 minutos. Logo em seguida foi realizado a lavagem com 2 mL de TBS 0,1% três vezes por 5 minutos. Foi realizada a permeabilização com Triton 0,1% por 20 minutos. O bloqueio foi efetuado com BSA 0,4% por 30 minutos a temperatura ambiente para posterior incubação overnight a 4°C com anticorpo primário diluído a 0,2% de tampão BSA. As etapas subsequentes foram realizadas na ausência da luz. Após este período foi realizada a lavagem com TBS 0,1% três vezes por 5 minutos. As células foram em seguida incubadas com anticorpo secundário conjugado a uma substância fluorescente, diluído em tampão BSA 0,2%, durante 2 hora a temperatura ambiente. Lavou-se três vezes com TBS 0,1% por 5 minutos. Por fim foi efetuada a marcação específica do núcleo com Hoechst (33342) na diluição de 1:1000 por oito minutos com

posterior lavagem com TBS 0,1% por um minuto. Logo após, foi realizada a montagem das lamínulas em lâminas microscopia para posterior visualização em microscópio de fluorescência (Zeiss AXIO Imager. A1, Carl Zeiss, Germany; e Nikon Eclipse Ti-S, Nikon, Japão). Nesta etapa foi testado o grau de expressão de marcadores mesenquimais, hematopoiéticos e neuronais com os anticorpos descritos na tabela 3 abaixo:

Tabela 3 – Especificação dos anticorpos primários específicos utilizados para a caracterização de marcadores mesenquimais e marcadores neuronais de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino

Anticorpo	Antígeno	Empresa	Código	Espécie	Mono/poli	Especificidade
<i>Endoglin (CD105)</i>	IgG2a	Santa Cruz	sc-71042	Rat	Mono	Mouse
<i>CD34</i>	IgG	Santa Cruz	sc-7045	Goat	Poli	Human/mouse/rat
<i>Thy-1 (CD90)</i>	IgG	Santa Cruz	sc-6071	Goat	Poli	Human/mouse
<i>CD45</i>	IgG2a	Santa Cruz	sc-101839	Mouse	Poli	Cow
<i>CD73</i>	IgG	Santa Cruz	sc-14682	Goat	Poli	Human/mouse
<i>CD79A</i>	IgG1	Santa Cruz	sc-20064	Mouse	Poli	Human
<i>GFAP[GF5]</i>	IgG2b	Abcam	Ab10062	Mouse	Mono	Mouse, rat, human
<i>Nestin[SP103]</i>	IgG	Abcam	Ab105389	Rabbit	Mono	Human
<i>Neuron specific beta III Tubulin</i>	IgG	Abcam	Ab18207	Rabbit	Poli	Mouse, Rat, Human, Marmoset (common), Dogfish/Catshark

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

Tabela 4 – Especificação dos anticorpos secundários utilizados na caracterização de marcadores mesenquimais, hematopoiéticos e neuronais de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino

Anticorpo	Antígeno	Empresa	Código	Espécie	Mono/poli	Especificidade
<i>Goat anti-rabbit IgG (FICT)</i> <i>Diluição 1:200</i>	IgG	Abcam	ab6717	Goat	Poli	Rabbit
<i>Goat anti-Mouse IgG2b (FICT)</i> <i>Diluição 1:200</i>	IgG2b	Abcam	ab97249	Goat	Poli	Mouse
<i>Alexa Fluor 488 (FICT)</i> <i>Diluição 1:200</i>	IgG	Invitrogen	A21210	Rabbit	Poli	Rat
<i>Alexa Fluor 488 (FICT)</i> <i>Diluição 1:200</i>	IgG	Invitrogen	A11078	Rabbit	Poli	Goat

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

5.4.5.2 Caracterização imunofenotípica por Citometria de fluxo

Foi testado o padrão de expressão dos marcadores característicos de células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas. As células em terceira passagem (P3) foram distribuídas em tubos eppendorf com a dição de 1 mL de tampão BSA 0,1% por 40 minutos. Após o período, as células foram centrifugadas com BSA 0,1% com posterior descarte do sobrenadante. Foram ressuspendidas com 50 µL e adicionou-se o anticorpo primário na concentração de (1:100) por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 1 mL de BSA 0,1% e centrifugado a 600 g por 8 minutos com descarte do sobrenadante. Após este período foi adicionado o anticorpo secundário com concentração de (1:300) por 1 hora em temperatura ambiente. Transcorrido o período, as células foram novamente centrifugadas a 600g por 8min com 1 mL de BSA 0,1% e retirado o sobrenadante. Nas amostras de controle negativo foi adicionada apenas uma solução de BSA (0,1%) ao invés do anticorpo. Após este período, as células foram lavadas com BSA 0,1% e centrifugadas novamente para a lavagem e remoção do excesso do anticorpo. O conteúdo foi distribuído em tubos tipo Falcon específicos

para citometria de fluxo para posterior análise com 300 μ L de paraformol 2%. A descrição dos anticorpos estão relacionados nas tabelas 3 e 4.

5.4.6 Avaliação do potencial carcinogênico das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em camundongos imunossuprimidos – Balb/c Nude

Para análise do potencial carcinogênico das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino, foram inoculados aproximadamente 3×10^5 células na terceira passagem por cada via de inoculação, diluídos em 0,2 mL de solução fisiológica com o uso de uma seringa e agulha de insulina. Foram utilizados dois camundongos (Balb/c Nude) para inoculação de células e um camundongo (Balb/c Nude) como controle negativo com aplicação de 0,2 mL de solução fisiológica. As regiões inoculadas foram: região cervical dorsal, intraperitoneal e intramuscular do membro pélvico esquerdo. Semanalmente, os animais foram observados e após 60 dias foram submetidos à eutanásia em câmara de gás seguindo as normas estipuladas pelo Comitê de Bioética Animal. Foram coletados para análise histopatológica fragmentos de: pele, músculo do membro pélvico esquerdo, encéfalo, pulmão, coração, fígado, intestino grosso e delgado, baço e rins.

Todo material coletado foi fixado em paraformol a 4% tamponado, e após 24 horas processados em álcool 70 % e xilol, incluídos em blocos de Leukart com a parafina (Paraplast®), cortados com 5 mm de espessura em micrótomo LEICA®, modelo 2165 e corados por métodos de rotina (hematoxilina e eosina), para posterior descrição e documentação.

5.5 TESTE PRÉ-CLÍNICO

Após processo de a caracterização celular em MSCs foi realizado o teste pré-clínico com cães com cinmose canina na fase neurológica.

5.5.1 Animais e critérios de inclusão

Este experimento foi realizado com teste duplo-cego pré-clínico, que utilizou 10 animais da espécie canina, sem critérios de distinção de sexo e raça, com protocolos de imunização inadequados ou não-imunizados, subdivididos em dois grupos formados por no mínimo três animais.

5.5.2 Grupos experimentais

Os grupos foram subdivididos em: Grupo Suporte (GS) e Grupo Suporte + Terapia Celular (GSTC) que foram atendidos no Hospital da Unidade Didático Clínico Hospitalar FZEA/USP, Campus Pirassununga, SP e clínicas particulares que são conveniadas com o projeto. Estes animais foram provenientes de proprietários domiciliados, canis ou responsáveis por animais errantes da região, que foram incluídos no experimento através de autorização expedida pelo proprietário através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e com autorização do Comitê de Bioética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ USP -Campus Pirassununga,SP.

5.5.3 Acondicionamento dos animais

Os animais participantes do experimento foram acompanhados em domicílio de acordo com a apresentação clínica. Nos dias de coleta das amostras para realização de exames complementares foi realizado exame físico e neurológico nos paciente.

5.5.4 Avaliação Clínico/Laboratorial

No dia do atendimento (dia 0), foram coletadas amostras urinárias e sanguíneas dos animais para realização do teste de RT-PCR para confirmar o diagnóstico clínico dos animais dos grupos GS e GSTC. As amostras urinárias foram colhidas através de sondagem uretrovesical ou cistocentese com a utilização de agulhas e seringas estéreis e descartáveis, no volume aproximado de cinco mL que foram acondicionados em frascos estéreis e descartáveis. As amostras sanguíneas foram colhidas através de venopunção de veia cefálica ou jugular, com acondicionamento em tubos com EDTA a 7,5%.

5.5.5 Realização de RT-PCR

As amostras de sangue e de urina foram coletadas e armazenadas a -80°C até o momento do processamento. Alíquotas de $300\mu\text{L}$ de urina ou sangue foram submetidas a extração de RNA pelo método do TRIZOL® (Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado como controle positivo, a vacina Nobivac® Puppy DP (MSD Saúde Animal, Nova Iorque, EUA) que contém vírus vivo atenuado da cepa Onderstepoort e como controle negativo, água livre de nucleases.

Os primers foram selecionados para a amplificação do gene N de CDV por reação de RT-PCR hemi-nested, de acordo com as recomendações de Di Francesco et al., (2012) e estão descritos na tabela 1. A confirmação da suspeita clínica foi realizada pela amplificação de fragmento de 180pb do gene N da cepa Onderstepoort por uma reação de RT-PCR hemi-nested.

Tabela 5 - Primers utilizados nas reações de RT-PCR para o Vírus da cinomose canina

Nome	Orientação	Sequência (5'-3')	Gene	Produto
C2 ^a	Senso	AAGATCTGCCGGCAAAGTAAGCTCTG	N	350pb
REV1441 ^a	antissenso	CGGTCATCGTCGTTCCATC		
FW1261 ^a	Senso	CACTCAGAAAGATCCGAAGTCA	N	180pb

Fonte: (DI FRANCESCO et al., 2012)

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Em linhas gerais, em um microtubo livre de nucleases, 4µL de cada amostra de RNA extraído e 1µL de primer senso específico para as reações de RT-PCR (C2) a 10mM foram aquecidos a 70°C, por 5 min, e em seguida resfriados em gelo, por 5 min. Em seqüência, foram adicionados, em ordem, 3,2µL de água livre de nucleases, 4µL do tampão ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, 4,8µL de MgCl₂, 1µL de dNTP Mix, 1µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor e 1µL de enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase. A mistura, totalizando 20µL, foi homogeneizada e colocada em termociclador, seguindo um protocolo consistindo de 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15min. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

Para as reações de PCR, foi utilizado o kit Go Taq® Colorless Master Mix (Promega, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Em síntese, 1µL do produto da transcrição reversa (cDNA) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X, 1,0µL do primer senso específico (C2) ou para a reação hemi-nested (FW1261) a 10µM, 1,0µL do primer antissenso específico (REV1441) a 10µM e 9,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases. O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) para a primeira amplificação se baseou em 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 48°C por 45s, extensão a 72°C por 45s e 5 minutos finais de extensão a 72°C. Para a reação hemi-nested, o protocolo de termociclagem compreendeu: desnaturação inicial a 94°C por 2min, seguido de 25 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 48°C por 45s, extensão a 72°C por 45s e uma extensão final a 72°C, conforme recomendado por DI FRANCESCO et al. (2012). Os amplicons obtidos foram, na seqüência, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), num volume de 8µL por amostra, adicionado de um volume de 2µL de tampão de carregamento (Blue/Orange Loading Dye 6x, Promega, EUA). Na seqüência, o gel foi submetido à coloração em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA). Em seguida, o gel foi observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-PixImage (Loccus Biotecnologia, Brasil). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação do padrão de migração eletroforética de um marcador de peso molecular de 100pb (Promega, EUA).

5.5.6 Avaliação Hematológica

Para realização do hemograma foram colhidas amostras sanguíneas após jejum de 8 hs nos dias 0, 06, 09, 12 e 15 (intervalo de 03 dias) com seringas e agulhas estéreis descartáveis, no volume de aproximadamente três mL através de venopunção de veia cefálica ou jugular, com acondicionamento em tubos com EDTA a 7,5%. A contagem total das hemácias, leucócitos, plaquetas, taxa de hemoglobina e o hematócrito foram efetuadas utilizando um aparelho hematológico automático (BC 2800 Vet, Mindray, China) no Laboratório Clínico Veterinário da Unidade Didático Hospitalar FZEA/USP Pirassununga, SP. As contagens diferenciais de leucócitos e a avaliação morfológica dos elementos figurados do sangue foram feitas em esfregaços sanguíneos corados com coloração de Rosenfeld (BIRGEL, 1982). Para avaliar o estado anêmico em detrimento da injúria viral, foi efetuada a contagem dos reticulócitos mediante a incubação durante 6min em temperatura ambiente de uma mistura de iguais quantidades de sangue e do corante azul de cresil brilhante (Laborclin, Brasil). Em seguida foram preparados três esfregaços e os reticulócitos foram contados em 1000 hemácias e expressos em valores absolutos (reticulócitos por μL) (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000).

5.5.7 Avaliação Bioquímica

Para realização de bioquímica sérica renal (uréia e creatinina) e bioquímica sérica hepatobiliar (Alanintransferase - ALT, Fosfatase alcalina – FA, gama-glutamyltransferase - GGT, proteínas totais, albumina, globulinas) foram colhidas amostras sanguíneas nos dias 0 e 15 com seringas e agulhas estéreis descartáveis, no volume de aproximadamente cinco mL através de venopunção de veia cefálica ou jugular, com acondicionamento em tubos com ativador de coágulo para a obtenção do soro e as dosagens foram realizadas em analisador bioquímico automatizado (BS 120, Mindray, China) usando kits comerciais (Labtest, Brasil).

5.5.8 Avaliação Urinária

Para realização de urinálise tipo I foram colhidas amostras urinárias nos dias 0 e 15 através de sondagem uretrovesical ou cistocentese guiada por ultrassom através de seringas e agulhas estéreis descartáveis, no volume de aproximadamente 10 mL, com acondicionamento em frascos estéreis e descartáveis. A análise da urina compreendeu o exame físico, químico e sedimento urinário. O exame físico foi baseado na análise da cor, odor, aspecto e densidade urinária (método da refratometria). O exame químico foi composto por determinações semi-quantitativas de urobilinogênio, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, proteína, pH e sangue oculto, realizadas com tiras reativas colorimétricas (Labtest, Brasil).

Para a análise do sedimento urinário foi realizado uma centrifugação de um volume padrão de urina (5mL) em tubo cônico graduado por 5 minutos a 100g, o sobrenadante foi descartado deixando-se cerca de 0,5mL de sedimento que foi homogeneizado. Uma gota do sedimento foi colocada numa lâmina e coberto por uma lamínula para a realização da avaliação microscópica (presença ou não de células, microrganismos, cilindros, cristais, gordura, dentre outros elementos) (ZINKL, 2009).

5.5.9 Tratamento

O GS foi formado por cinco animais com sinais clínicos agudos, multissistêmicos e com alterações neurológicas recentes (até 10 dias), que receberam tratamento de suporte e sintomático de acordo com a apresentação clínica e resultados dos exames complementares. As medicações propostas incluíram a administração de antieméticos em caso de pacientes com êmese (Cloridrato de metoclopramida na dose de 0,5 mg/kg/q8h/SC; Ondansetrona 0,22 mg/kg/q8-12h/EV), protetores de mucosa gástrica (Ranitidina dose de 2mg/kg/q12h/SC; Cimetidina dose 5 mg/kg/q6-8h/SC; Omeprazol 1,5 mg/kg/q24h/VO/EV), antipiréticos (Dipirona sódica dose 25 mg/kg/q8-12h/SC), complexos vitamínicos (Vitaminas A dose 400UI/kg/q24h/VO; Complexo B dose 50-500 mcg/kg/IM; Vitamina C dose 100-500 mg/animal/q8h/VO e Vitamina E dose 5-10 mg/kg/q24h/VO), anticonvulsivantes (Fenobarbital 2-4 mg/kg/q12h/VO/EV), fluidoterapia endovenosa conforme desbalanço hidroeletrólítico, uso de antimicrobianos sistêmicos contra infecções secundárias conforme

apresentação clínica e exames complementares (VIANA, 2007). O GSTC foi formado por três animais com sinais clínicos agudos, multissistêmicos e com alterações neurológicas recentes (até 10 dias) que receberam tratamento suporte e sintomático descrito no GS que foram administrados de acordo com a apresentação clínica e resultados de exames complementares. Foi realizada aplicação endovenosa de 1.0×10^6 / kg de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em dose única dois dias após o início do tratamento sintomático.

5.5.10 Acompanhamento clínico e laboratorial

Nos animais que participaram do experimento, foi realizado nos dias de colheita de amostras, exame físico e neurológico para monitoração da evolução clínica do paciente (CHRISMAN, 1985). As amostras sanguíneas para hemograma, bioquímica sérica e urinálise foram colhidas com intervalos médio de três à cinco dias.

5.5.11 Análise Estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2011), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [Log (X+1)]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionada o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS). As análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os resultados foram baseados em testes de caracterização celular e teste clínico realizado em cães com cinomose canina.

6.1 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR

O cultivo celular foi estabelecido de acordo com a coleta e isolamento de células de epitélio olfatório fetal canino.

6.1.1 Coleta, isolamento e cultivo de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino

As coletas de epitélio olfatório fetal canino foram realizadas através de 20 fetos de úteros gravídicos de terço final gestacional de animais procedentes de campanhas de castração. Após a coleta, os envoltórios fetais foram cuidadosamente removidos (Figura 2A), Foi realizado corte longitudinal mediano do crânio dos fetos com posterior coleta do epitélio olfatório na porção superior da cavidade nasal, abaixo da lamina crivosa do osso etmóide, anteriormente ao bulbo olfatório (Figura 2C). Após maceração e digestão enzimática (Figura 2D) as amostras foram centrifugadas para separação e formação de um pellet, com posterior ressuspensão e emplacamento das células (Figura 1G). As amostras foram acondicionadas e cultivadas em condições controladas (38,5°C e 5% CO₂) (Figura 2H e I) com presença de aderência 24 hs após cultivo. As células se apresentaram aderidas no fundo da placa com morfologia fibroblastóide e foram mantidas em cultura até atingirem a confluência de 80% com posterior criopreservação nas passagens 0, 1 e 2 para realização de testes de caracterização e aplicação de terapia celular nos pacientes com cinomose canina (Figura 3A-3D).

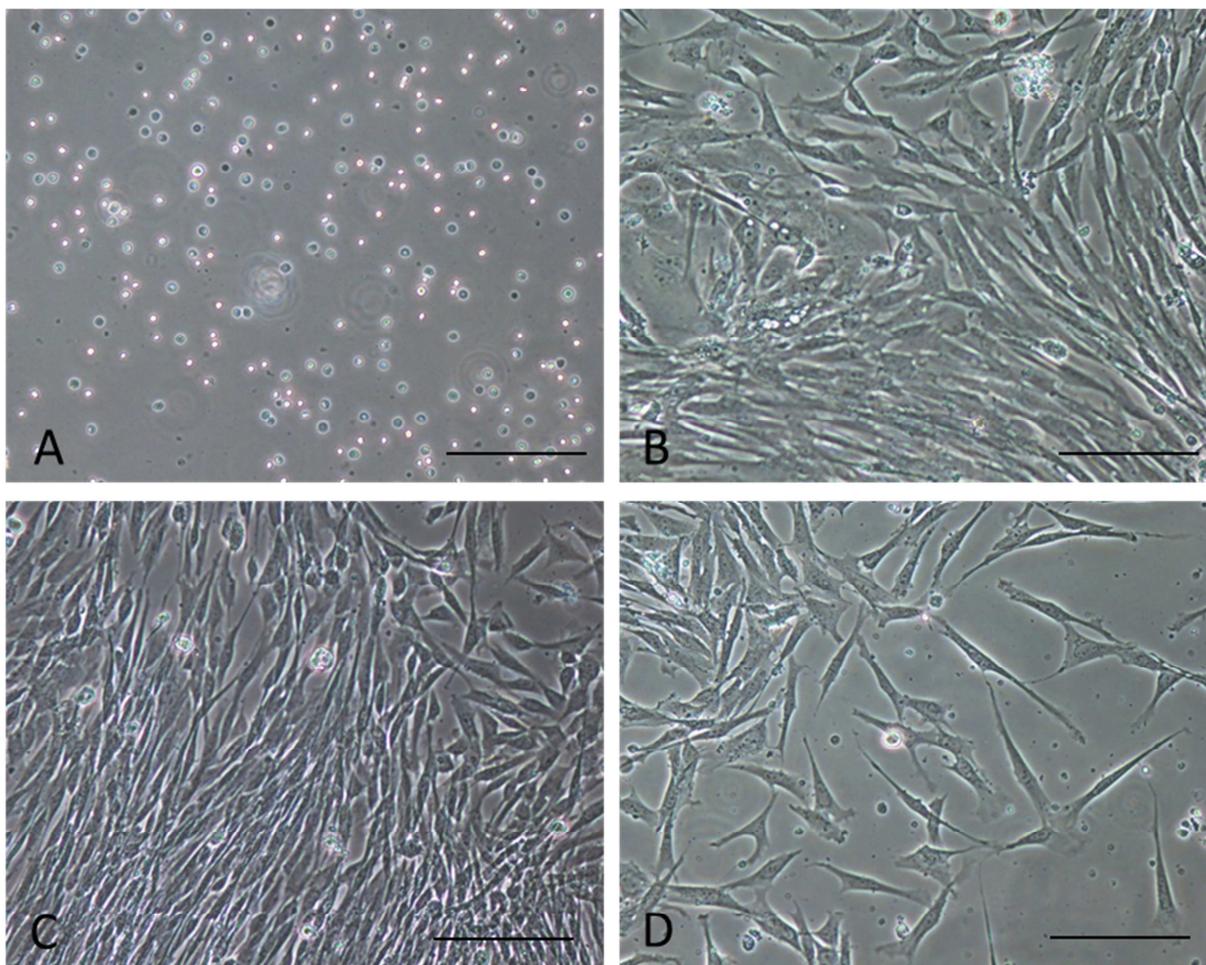
Figura 2 – Coleta e processamento de amostras de epitélio olfatório fetal canino



Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2013)

Legenda: A) Feto canino de idade gestacional aproximada de 60 dias; B) Crânio; C) Incisão em plano sagital mediano do crânio canino para coleta de epitélio olfatório fetal canino; D) Maceração mecânica da amostra com posterior dissociação enzimática; E) Centrifugação das amostras; F) Formação de pellet após a centrifugação; G) Ressuspensão do pellet em meio de cultivo com posterior deposição em placa de petri. H e I) A Deposição das placas de cultura em incubadora

Figura 3 – Células-tronco mesenquimais em cultivo em diferentes passagens



Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2013)

Legenda: Fotomicrografia das placas com células-tronco mesenquimais em cultivo: A) Passagem P0 24 horas após cultivo 20x (Barra: 100 μ m); B) Passagem P0 5 dias após cultivo 20x (Barra: 100 μ m); C) Passagem P0 7 dias após cultivo 20x (Barra: 100 μ m); D) Passagem P2 24 horas após cultivo 20x (Barra 100 μ m)

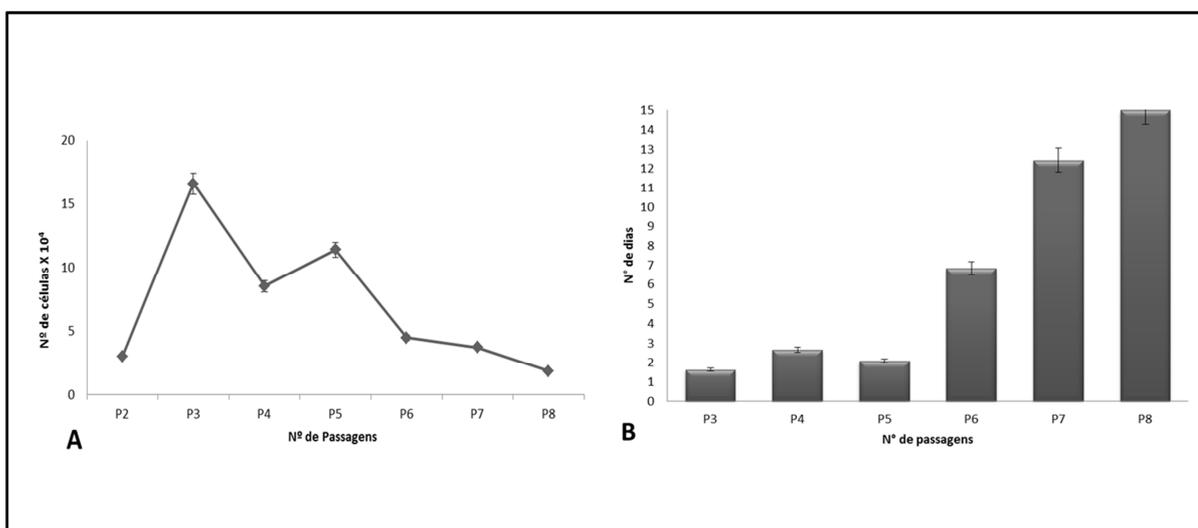
6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO FETAL CANINO

As células de epitélio olfatório fetal canino foram caracterizadas de acordo com os seguintes testes:

6.2.1 Curva de crescimento das células de epitélio olfatório fetal canino

Para a avaliação da curva de crescimento celular, 3×10^4 células foram plaqueadas em triplicatas em placas de 35 mm e monitoradas a cada 96 horas (média de horas para obtenção de confluência de 80%) durante várias passagens. Em cada passagem celular, foi realizada a tripsinização e contagem celular em câmara de Neubauer. Após sucessivas passagens, foi possível estabelecer um padrão de curva de crescimento que demonstrou um crescimento acelerado no início do cultivo celular (com predomínio de proliferação em terceira passagem) e redução gradativa dos índices de proliferação até oitava passagem (Gráfico 1A). O *Doubling time* foi calculado conforme Gráfico 1B, observando-se aumento considerável no número de dias necessários para a duplicação celular (terceira passagem média de 1,621 dias para duplicação comparado a oitava passagem com média de 15 dias). Verifica-se com isto, o declínio gradativo da taxa de proliferação celular de acordo com as sucessivas passagens.

Gráfico 1 - Representação gráfica do perfil de crescimento das células-tronco mesenquimais de epitélio olfatório fetal canino



Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2013)

Legenda: A) As células demonstraram um crescimento bastante acelerado durante as primeiras duas passagens e uma posterior queda com uma tendência estacionária. B) Gráfico *Doubling time* demonstrando o número de dias necessários para a duplicação do número de células emplacadas inicialmente. O número de dias tende a aumentar à medida que o número de passagens também aumenta, alcançando o seu pico em oitava passagem.

6.2.2 Avaliação da capacidade de formação de colônias

Foi utilizado 1×10^3 células em três placas de petri para contagem das Unidades Formadoras de Colônias fibroblastóides (CFU-F). Estas células foram mantidas pelo período de 11 dias até a visualização da formação de colônias. Após este período foram fixadas com paraformaldeído 4% com posterior coloração com Giemsa.

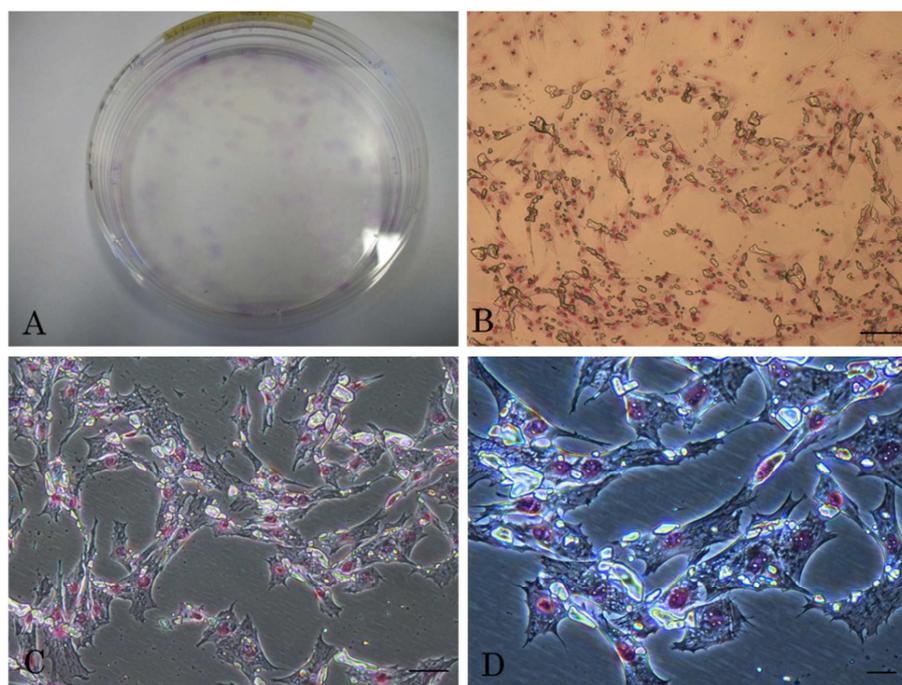
Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6 abaixo e as fotografias macro e microscópicas na figura 4.

Tabela 6 – Contagem do número de colônias com sua respectiva média

Placa	Número de colônias
1	121
2	125
3	109
Média	118,33

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2013).

Figura 4 – Visualização das placas com formação de colônias



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda - A) Fotomicrografia da placa com CFU-C obtidas após plaqueamento das células mesenquimais de epitélio olfatório fetal canino com coloração de Giemsa: B) 10x (Barra: **100µm**); C) 20x (Barra: **50µm**); D) 40x (Barra: **20µm**).

6.2.3 Viabilidade celular

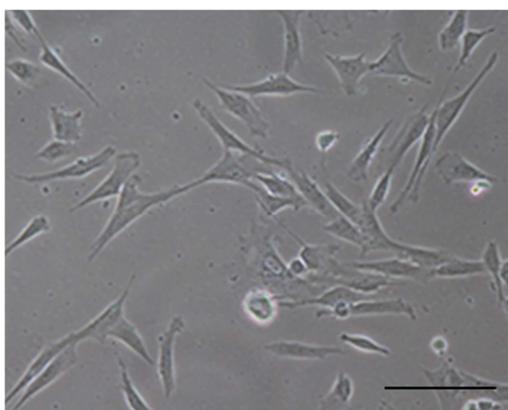
As amostras de células em triplicatas utilizadas para o teste de viabilidade celular, foram descongeladas após uma semana de criopreservação, coradas com azul de tripan e contadas com auxílio da câmara de Neubauer, obtendo-se os seguintes valores demonstrados na tabela 7. Após contagem celular, as células foram plaqueadas e observadas durante sucessivas passagens, para avaliar o potencial de proliferação celular após o processo de criopreservação. As amostras foram mantidas até a 12^a passagem, com observação de células proliferativas aderentes (Figura 5).

Tabela 7 – Relação dos valores de células criopreservadas antes e após o descongelamento

Placa	Número de células	Total de células	% mortas	% Vivas
1	1×10^5	8×10^4	20%	80%
2	1×10^5	$7,5 \times 10^4$	25%	75%
3	1×10^5	$4,5 \times 10^4$	55%	45%
Média		$6,6 \times 10^4$	33%	67%

Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Figura 5 – Células em 12^a passagem após processo de criopreservação celular



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Células em 12^a passagem após processo de criopreservação celular. Observa-se células aderentes 20x (Barra 100 μm)

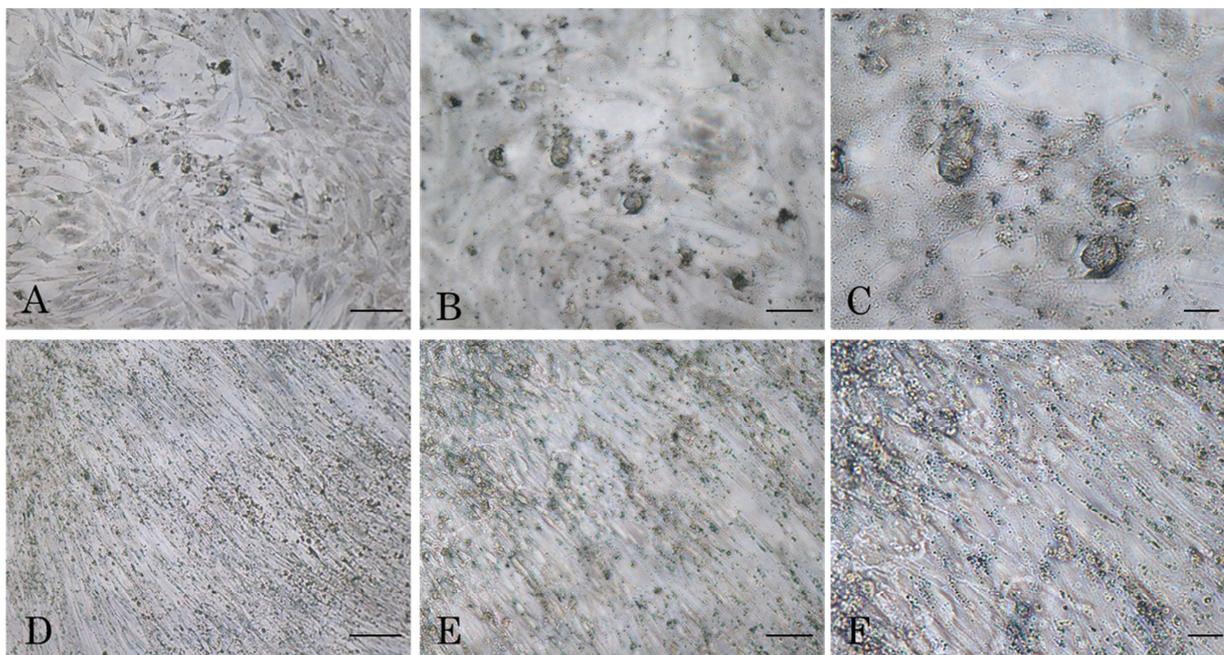
6.2.4 Diferenciação In vitro

As culturas foram testadas quanto a diferenciação em células adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas e neurogênicas.

6.2.4.1 Diferenciação Adipogênica

As células em cultivo demonstraram gradativas alterações morfológicas que foram visualizadas durante o processo de diferenciação. A coloração foi realizada com Sudan Black aos 21 dias de cultivo celular. Na figura 6 observa-se a presença de vacúolos intracitoplasmáticos corados em negro e no controle não houve a visualização de formação de vacúolos.

Figura 6 – Diferenciação adipogênica



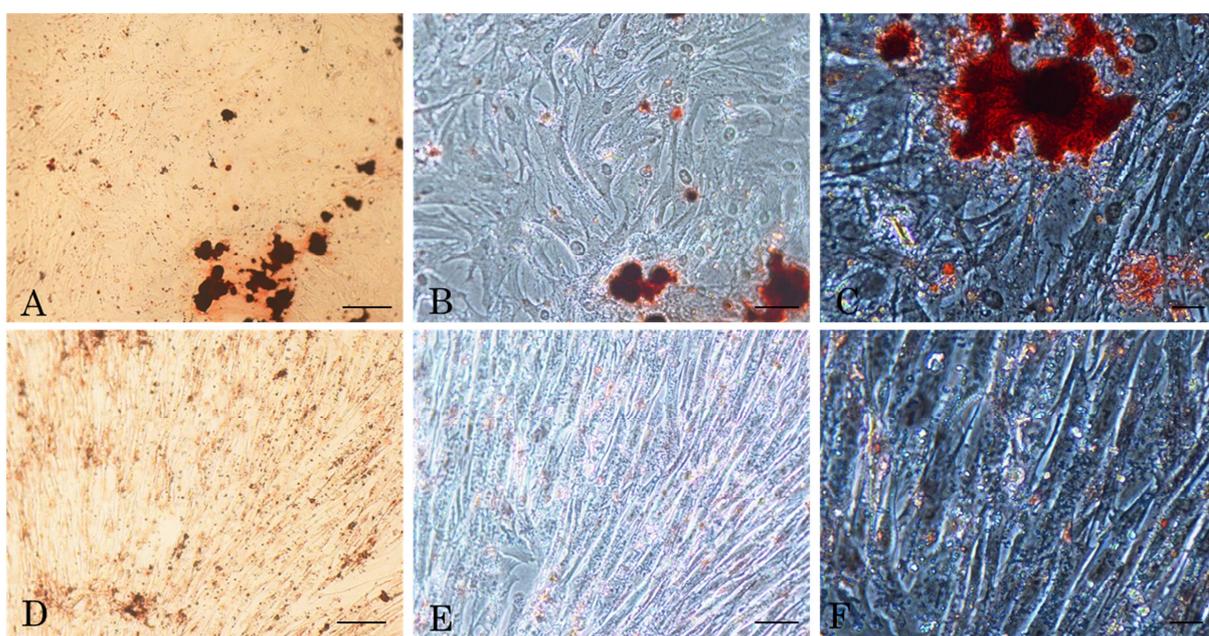
Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda - Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação adipogênica corada com Sudan Black (acima) e controle (abaixo). A) 10x (Barra: **100µm**); B) 20x (Barra: **50µm**); C) 40x (Barra: **20µm**); D) 10x (Barra: **100µm**); E) 20x (Barra: **50µm**); F) 40x (Barra: **20µm**)

6.2.4.2 Diferenciação Osteogênica

As células em cultivo demonstraram gradativas alterações morfológicas que foram visualizadas durante o processo de diferenciação. A coloração foi realizada com Alizarin red aos 21 dias de cultivo celular. Na figura 7 observa-se a presença de deposição mineral extracelular corado em vermelho, no controle não houve a visualização de formação mineral.

Figura 7 – Diferenciação osteogênica



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

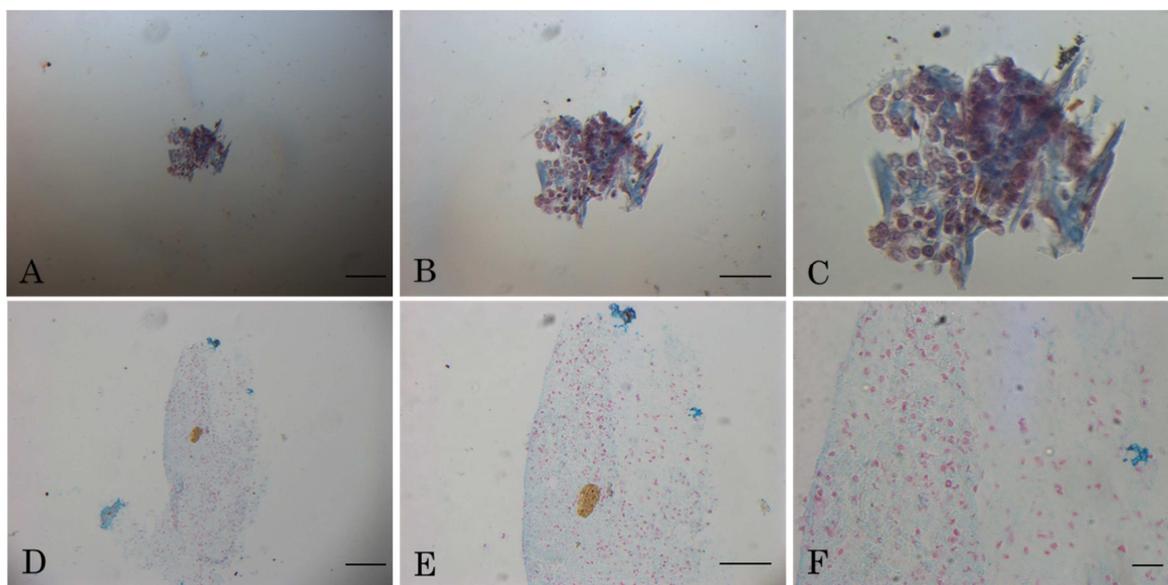
Legenda: Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação osteogênica corada com Alizarin Red (acima) e controle (abaixo). A) 10x (Barra: **100µm**); B) 20x (Barra: **50µm**); C) 40x (Barra: **20µm**); D) 10x (Barra: **100µm**); E) 20x (Barra: **50µm**); F) 40x (Barra: **20µm**).

6.2.4.3 Diferenciação Condrogênica

As células centrifugadas formaram um pellet no fundo do tubo falcon visualizado durante o processo de diferenciação. Não houve a formação do pellet controle durante o processo. A coloração das fibras colágenas foi realizada com Tricoma de Masson e Alcian

Blue aos 21 dias de cultivo celular. Na figura 8 observa-se a presença de fibras de colágeno coradas em azul.

Figura 8 - Diferenciação condrogênica



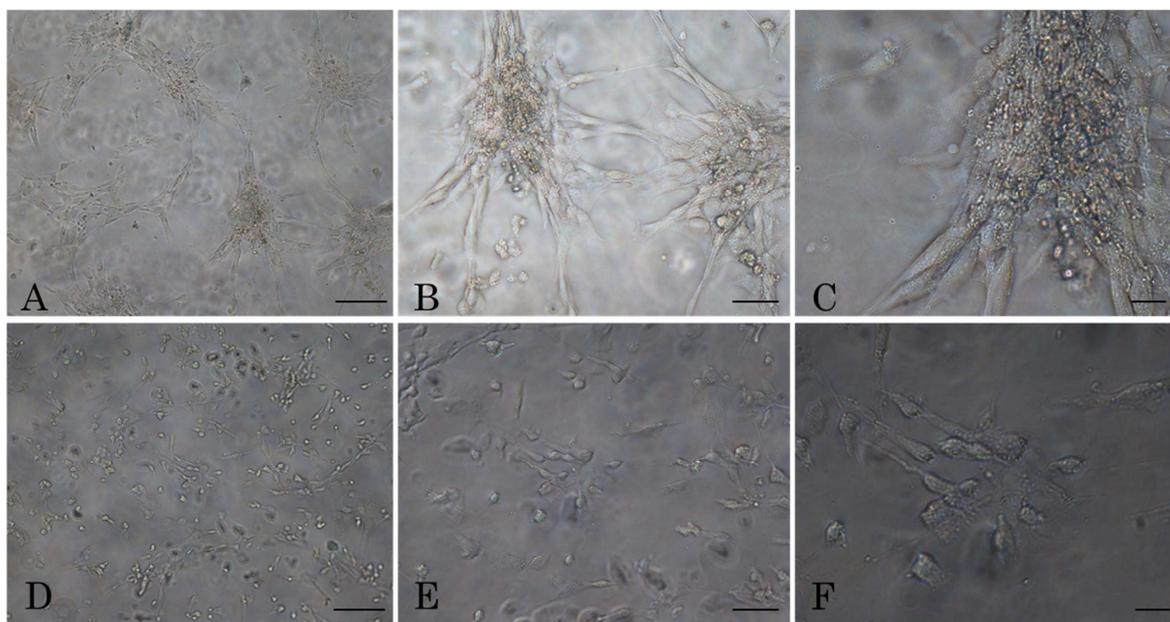
Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação condrogênica coradas com. a) Fibras de colágenos coradas com Tricomo de Massom expressas na coloração azul 10x (Barra: **100µm**); b) 20x (Barra: **50µm**); c) 40x (Barra: **20µm**) d) Fibras de colágeno coradas com Alcian Blue expressas na coloração azul 10x (Barra: **100µm**); e) 20x (Barra: **50µm**); f) 40x (Barra: **20µm**).

6.2.4.4 Diferenciação Neurogênica

As células em terceira passagem sofreram processo de diferenciação após a adição de 0,5 µL monoetilglicerol (3 – mercapto-1, 2-propanediol, M-6145, Sigma). Após 24 horas as células demonstraram morfologia alterada com agrupamento de células que formaram neuroesferas figura 9A-C. As células controle não apresentaram alterações morfológicas conforme figura 9D-F.

Figura 9 – Diferenciação neurogênica em terceira passagem



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação neurogênica. a) Presença de agrupamentos celulares com formação de neuroesferas após diferenciação neurogênica 10x (Barra: **100µm**); b) 20x (Barra: **50µm**); c) 40x (Barra: **20µm**); d) Amostras controle 10x (Barra: **100µm**); e) 20x (Barra: **50µm**); f) 40x (Barra: **20µm**)

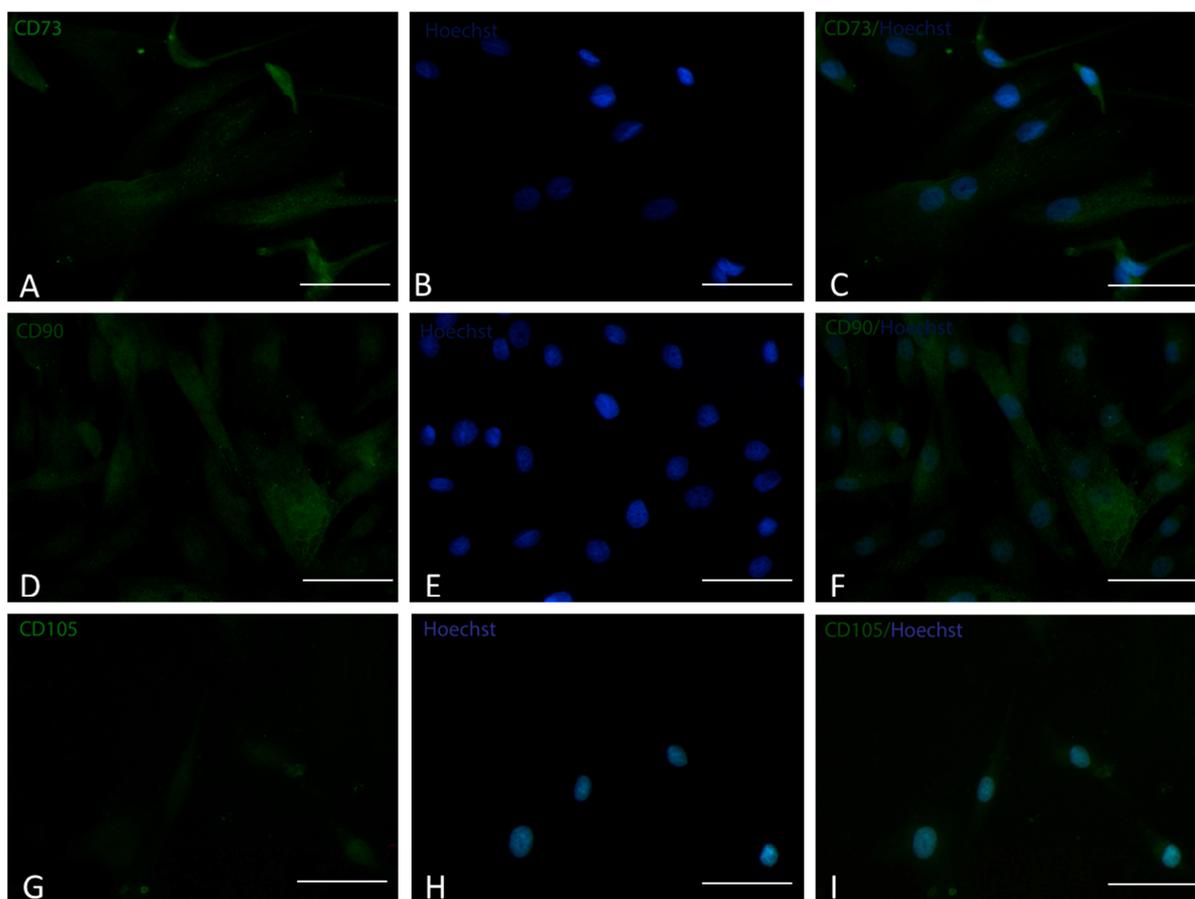
6.2.5 Métodos celulares

Foram realizados imunofenotipagem celular que consistiu em testes de por imunocitoquímica e citometria de fluxo.

6.2.5.1 Caracterização imunofenotípica por Imunocitoquímica

A análise foi realizada com amostras em triplicata para avaliar a expressão imunofenotípica de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos. Esta linhagem de células revelou expressão positiva de marcadores mesenquimais como CD73, CD90 e CD105 (Figura 10) e ausência de marcadores específicos para células hematopoéticas CD34, CD45 e CD79 (Figura 11). As análises dos resultados imunocitoquímicos foram realizadas por meio de microscópio de fluorescência (Zeiss AXIO Imager. A1, Carl Zeiss, Germany; e Nikon Eclipse Ti-S, Nikon, Japão).

Figura 10 – Expressão positiva de marcadores mesenquimais de células em terceira passagem

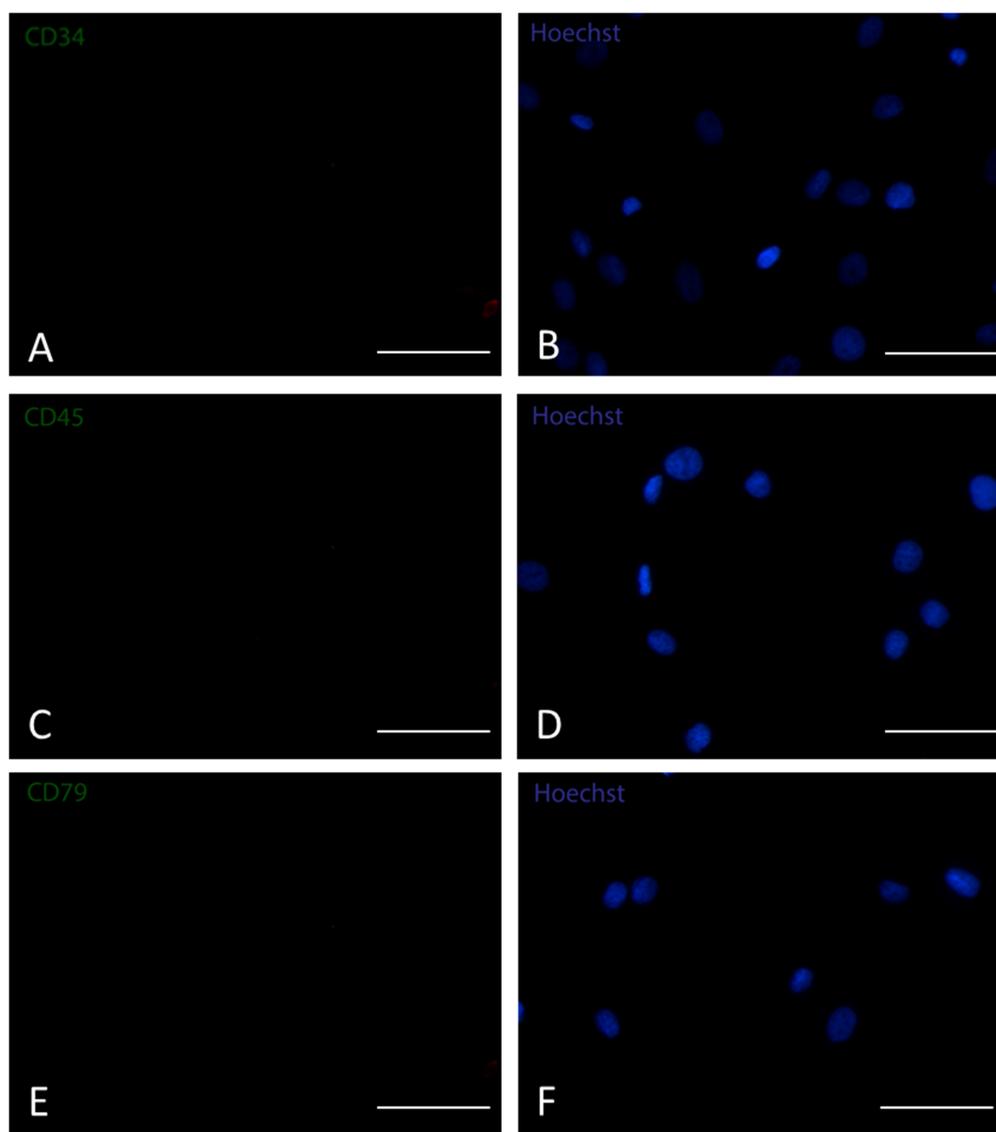


Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias das células submetidas à análise imunocitoquímica para marcadores mesenquimais.

A) Marcação positiva para CD73 40x (Barra: **50µm**); B) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50µm**); C) Merge das imagens com expressão positiva para marcador CD73; D) Marcação positiva para CD90 40x (Barra: **50µm**); E) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50µm**); F) Merge das imagens com expressão positiva para CD90 40x (Barra: **50µm**); G) Marcação positiva para CD105 40x (Barra: **50µm**); H) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50µm**); I) Merge das imagens com expressão positiva para CD105 40x (Barra: **50µm**)

Figura 11 – Expressão negativa de marcadores hematopoiéticos de células em terceira passagem



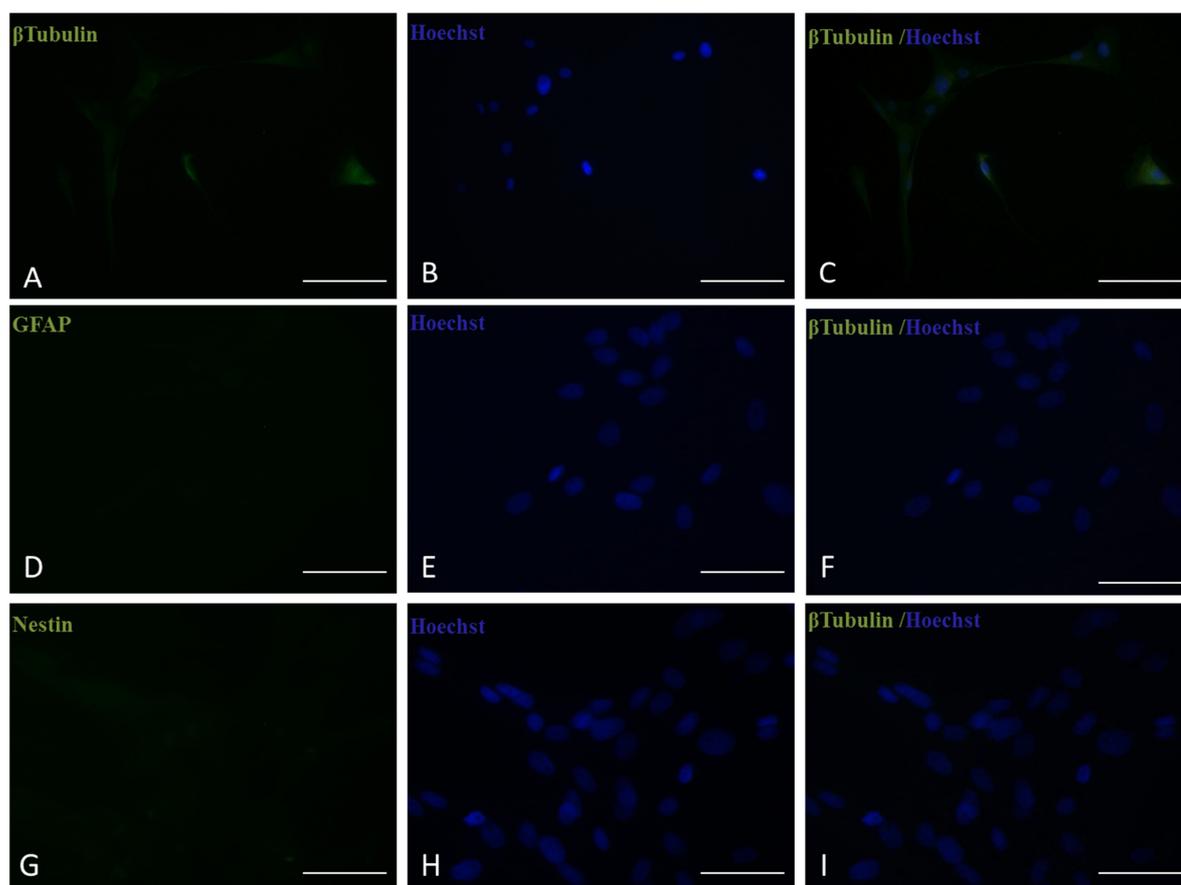
Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias das células submetidas à análise imunocitoquímica. A) Expressão negativa do marcador CD34 40x (Barra: **50µm**); B) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50µm**); C) Marcação negativa para marcador CD45 40x (Barra: **50µm**); D) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50µm**); E) Marcação negativa para marcador CD79 40x (Barra: **50µm**); F) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50µm**)

6.2.5.2 Imunocitoquímica de marcadores neuronais

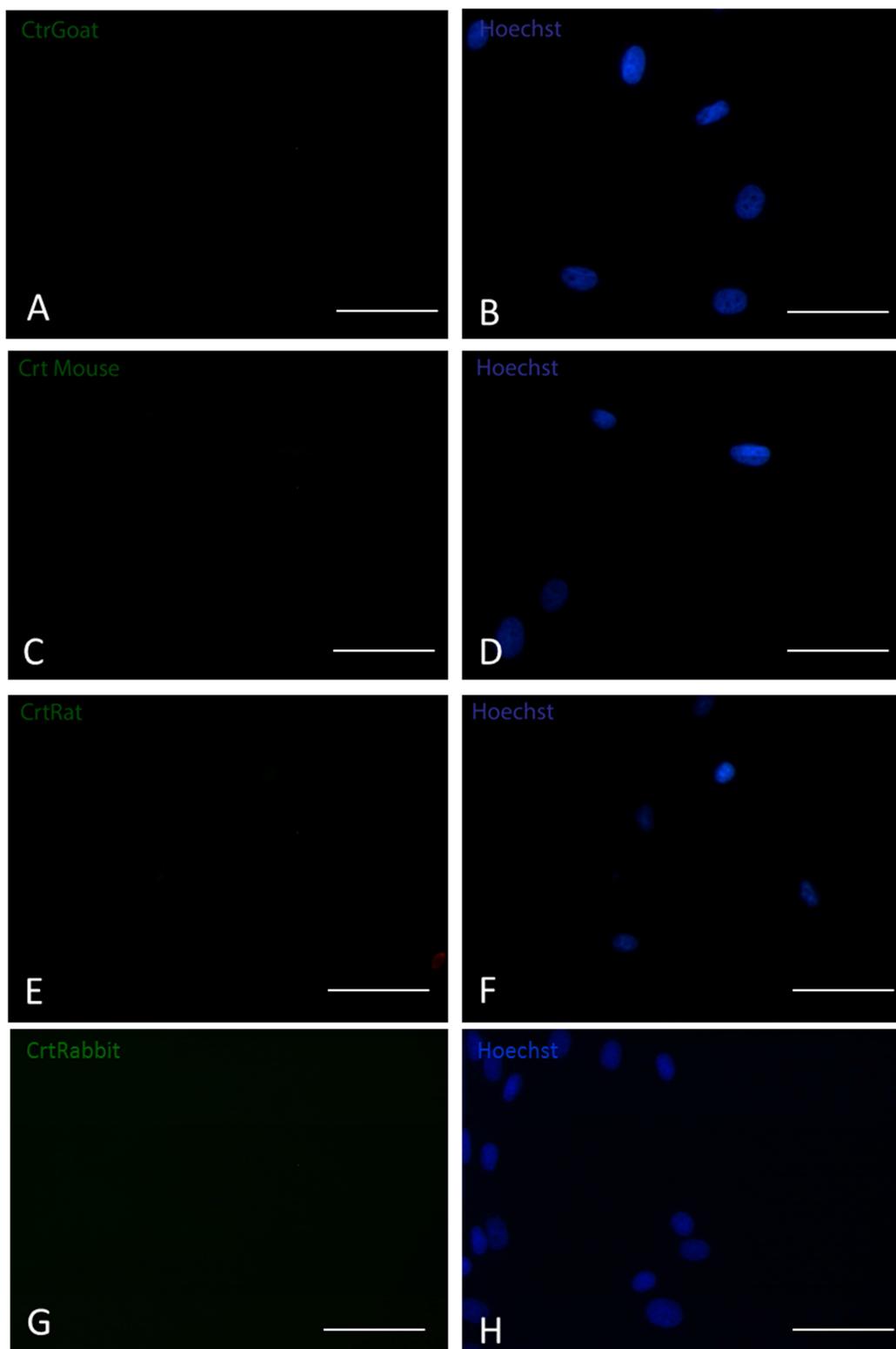
Foi realizada a técnica de imunocitoquímica para marcadores GFAP, nestin e β tubulin. Foi identificada marcação positiva para β tubulin e marcação negativa para marcadores nestin e β tubulin conforme figuras 12 e 13 abaixo:

Figura 12 – Expressão de marcadores neuronais



Legenda: Fotomicrografias das células submetidas à análise imunocitoquímica. A) Marcação positiva para β Tubulin 40x (Barra: **50 μ m**); B) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50 μ m**); C) Merge das imagens com expressão positiva marcador β Tubulin ; D) Marcação negativa para GFAP 40x (Barra: **50 μ m**); E) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50 μ m**); F) Merge das imagens com expressão negativa para GFAP 40x (Barra: **50 μ m**); G) Marcação negativa para Nestin 40x (Barra: **50 μ m**); H) Marcação dos núcleos celulares pelo Hoechst 40x (Barra: **50 μ m**); I) Merge das imagens com expressão negativa para Nestin 40x (Barra: **50 μ m**)

Figura 13 – Controle negativo das amostras de marcadores mesenquimais, hematopoiéticos e neuronais



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias dos controles negativos dos marcadores mesenquimais, hematopoiéticos e neuronais das células submetidas à análise imunocitoquímica. A) Controle Goat 40x (Barra: **50µm**); B) Marcação positiva dos núcleos celulares com Hoechst 40x (Barra: **50µm**); C) Controle Mouse 40x (Barra: **50µm**); D) Marcação positiva dos núcleos celulares com Hoechst 40x (Barra: **50µm**); E) Controle 40x (Barra: **50µm**); F) Marcação positiva dos núcleos celulares com Hoechst 40x (Barra: **50µm**); G) Controle Rabbit 40x (Barra: **50µm**); H) Marcação positiva dos núcleos celulares com Hoechst 40x (Barra: **50µm**)

6.2.4.3 Caracterização imunofenotípica por Citometria de fluxo

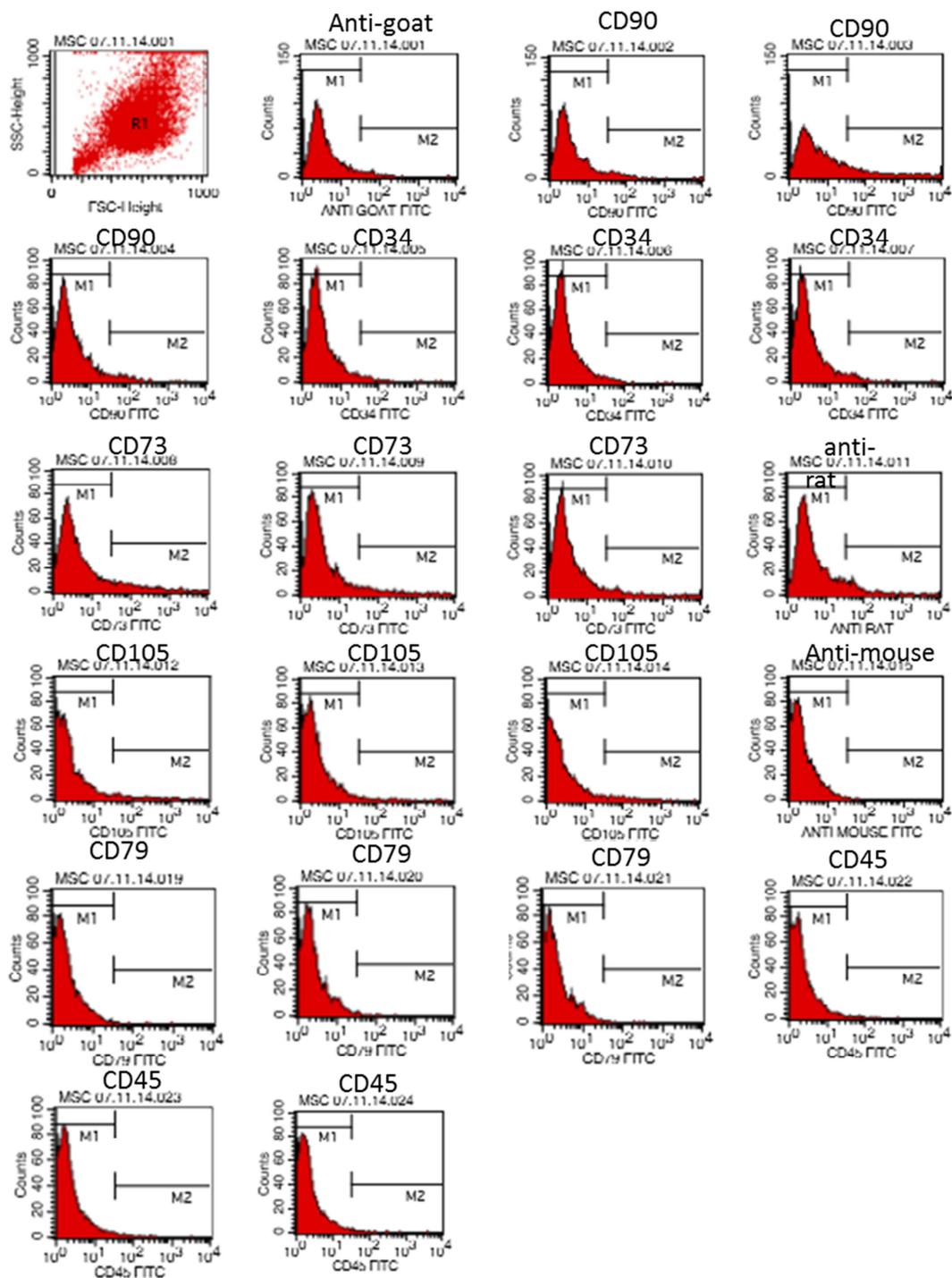
A análise imunofenotípica por citometria de fluxo foi realizada com aparelho FACSCalibur™, revelando marcação inespecífica para marcadores mesenquimais e negativa para marcadores hematopoiéticos conforme tabela 8 e figura 14 abaixo.

Tabela 8 - Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores mesenquimais e hematopoiéticos de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino

Marcador	Especificidade de espécie	Porcentagem média de células positivas
CD73	Human/mouse	3,08%
CD90	Human/mouse	3,34%
CD105	Mouse	1,35%
CD34	Human/mouse/rat	1,90%
CD45	Cow	0,47%
CD79	Human	0,14%

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014).

Figura 14 - Histogramas de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos



Fonte: Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014).

Legenda: Histogramas da análise em citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície. Esta linhagem respondeu com baixa expressão aos marcadores específicos das MSCs (CD73, CD90 e CD105) e marcadores hematopoiéticos (CD34, CD45, CD79). Os histogramas representam o número relativo de células em relação à intensidade de fluorescência

6.2.6 Avaliação do potencial carcinogênico das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em camundongos imunossuprimidos – Balb/c Nude.

O teste de potencial carcinogênico foi realizado em 3 camundongos imunossuprimidos (Balb/c - Nude). Foi realizada a inoculação de solução fisiológica em um camundongo controle e inoculação de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em dois camundongos, pelas vias intramuscular (musculatura da coxa do membro pélvico esquerdo), região subcutânea cervical e região intraperitoneal, respectivamente (Figura 15A-15F). Os animais foram acompanhados semanalmente para observação de possível formação de teratomas, mantendo-se hígidos durante todo o processo de experimentação. Após oito semanas não houve a formação de teratomas e os animais foram eutanasiados em câmaras de gás e os pontos de inoculação foram expostos e visualizados para averiguar a possível formação de teratomas (Figuras 16A-16F). Macroscopicamente, não foram visualizadas formações teratogênicas em pontos de inoculação e órgão internos. A análise histopatológica dos fragmentos do músculo, encéfalo, pulmão, coração, fígado, rim, baço e intestino, não revelaram quaisquer alterações morfológicas (Figuras 17 à 19).

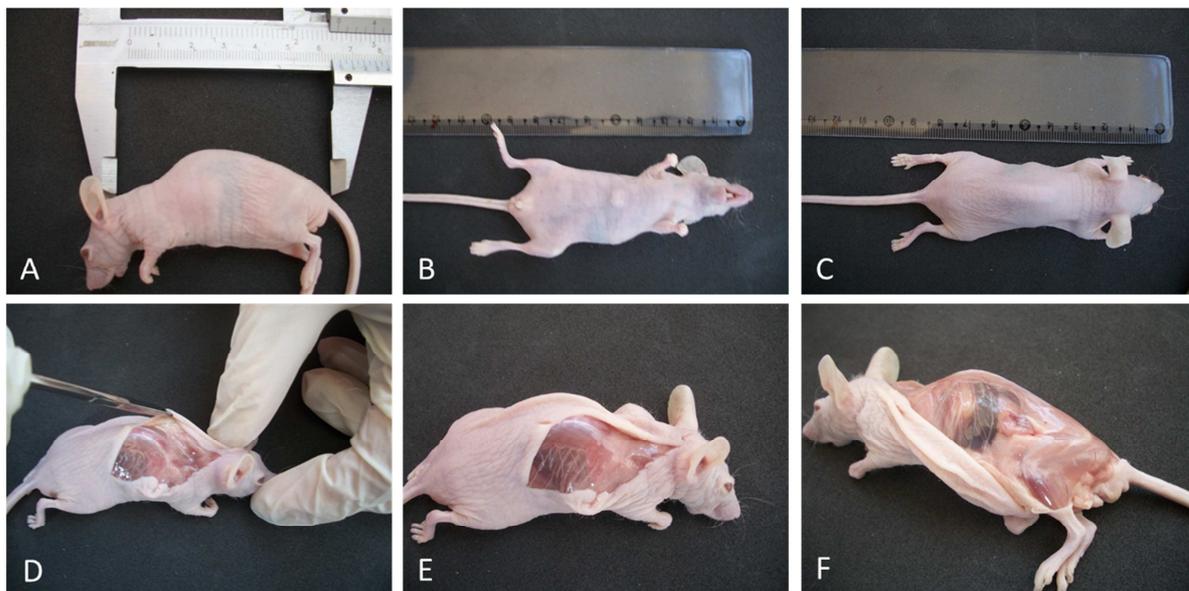
Figura 15 – Inoculação em camundongos Balb/c Nude



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias das aplicações nos animais controle e inoculados com células-tronco. A) Visão externa da caixa de condicionamento dos camundongos Balb/c Nude; B) Visão interna da caixa de condicionamento; C) Seringa para inoculação em camundongos controle e inoculados; D) Inoculação pela via subcutânea em região cervical; E) Inoculação por via intermuscular em membro pélvico esquerdo; F) Inoculação em região intraperitoneal

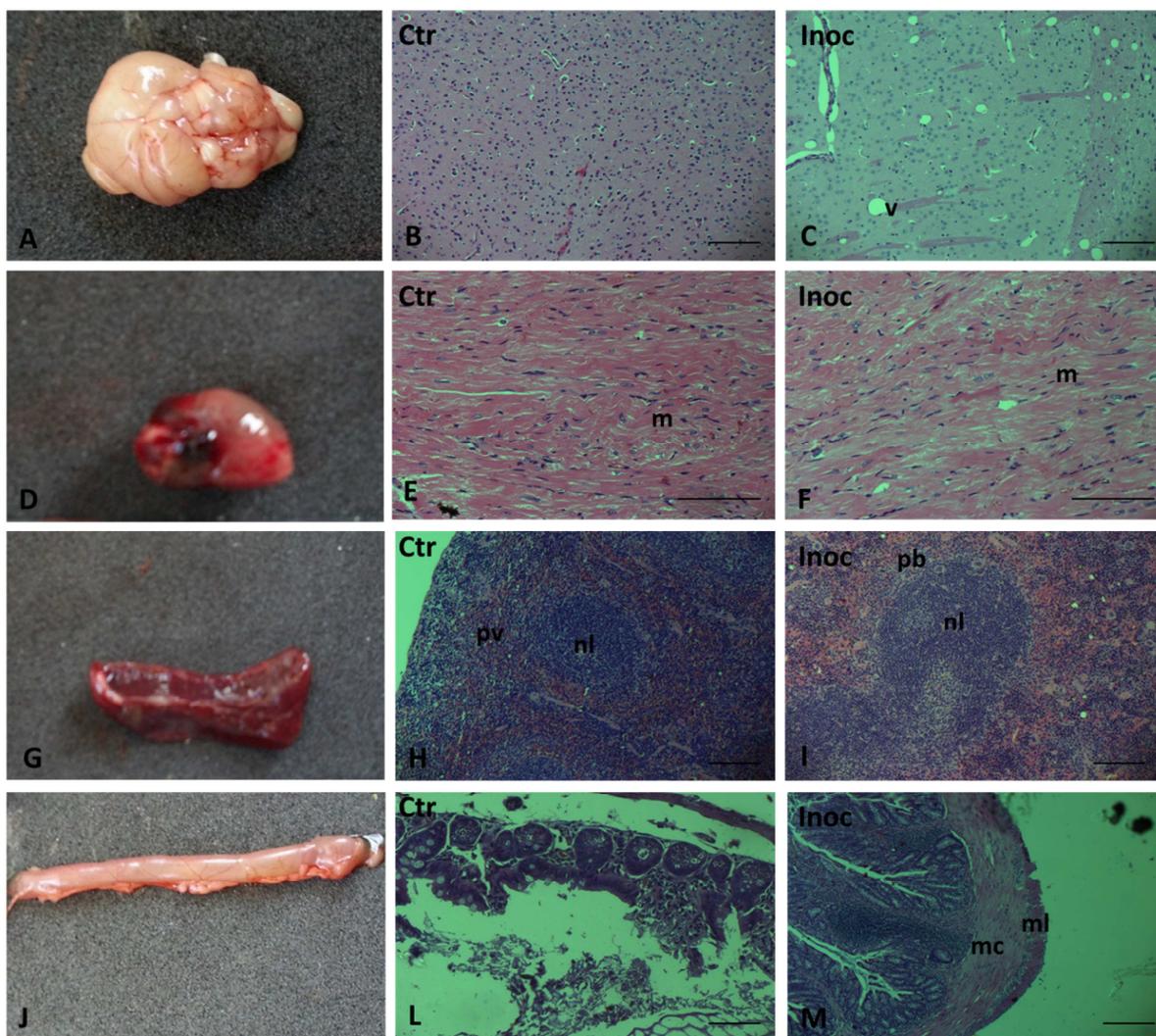
Figura 16 – Eutanásia dos camundongos Balb/c Nude com coleta de amostras de tecidos



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Aplicação de MSCs em camundongo Balb/c Nude; A,B,C,D) Visualização do camundongo Nude; E,F) Visualização da região subcutânea dorsal

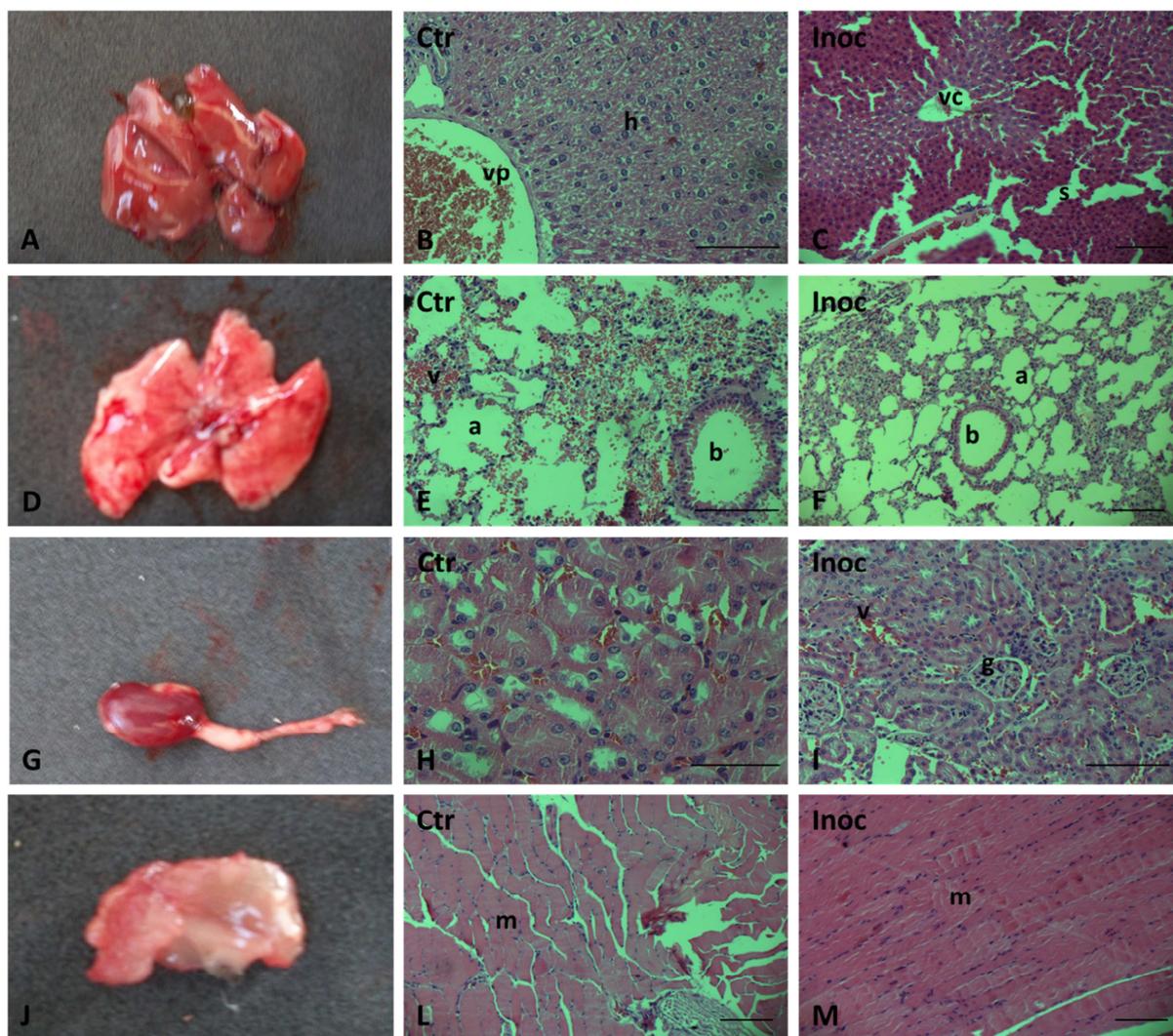
Figura 17 – Análise histológica das amostras



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias de diferentes órgãos (Ctr: não tratado, Inoc: inoculado com células-tronco. A) Visualização macroscópica do cérebro; B,C) Visualização microscópica do cérebro; D) Visualização macroscópica do coração; E,F) Visualização de cortes longitudinais da musculatura cardíaca com núcleos centralizados (m) miocárdio; G) Visualização macroscópica do baço; H,I) Parênquima do baço demonstrando áreas de nódulos linfáticos (nl) com visualização da polpa vermelha (pv) e polpa branca (pb); J) Visualização macroscópica do intestino; L,M) Visualização microscópica dos cortes histológica do intestino; B: 5x (Barra: 100 μm); C, H, L e M: 10x (Barra: 100 μm); E e F: 20x (Barra: 100 μm)

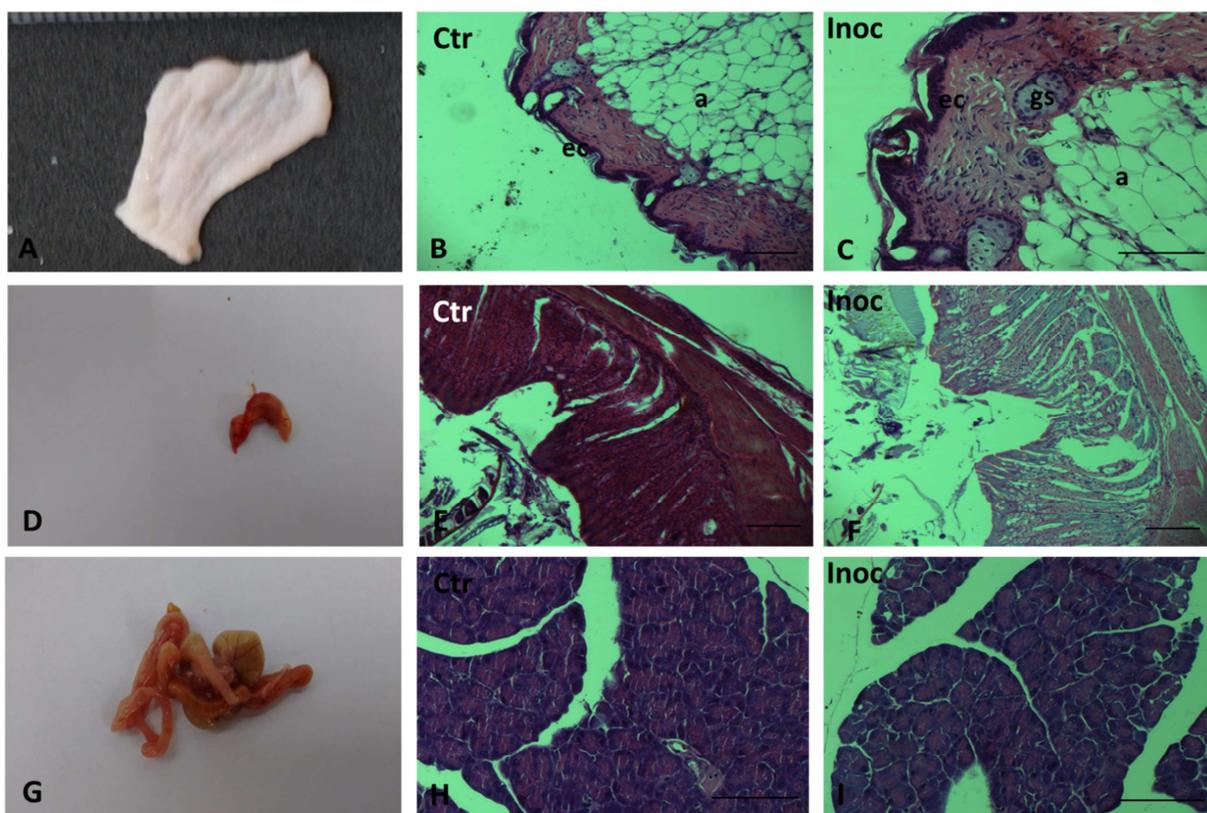
Figura 18 - Análise histológica das amostras



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias de diferentes órgãos (Ctr: não tratado, Inoc: inoculado com células-tronco). A) Visualização macroscópica do fígado; B) Visualização microscópica do fígado com observação do lúmen da veia porta (vp) e hepatócitos pelo parênquima hepático (h); C) Visualização microscópica do fígado do animal inoculado com observação da veia central (vc) e sinusóides (s); D) Visualização macroscópica do pulmão; E) Observação microscópica do pulmão do animal controle com a presença de estruturas como alvéolos (a), vasos sanguíneos (v) e bronquíolos (b); F) Visualização de corte histológico de pulmão com a visualização de estruturas como bronquíolo (b) e alvéolos (a); G) Visualização macroscópica do rim; H, I) Parênquima do rim demonstrando áreas com a presença de glomérulos (g), veias renais (v) e túbulos renais (tr); J) Visualização macroscópica da musculatura do membro pélvico esquerdo; L, M) Visualização microscópica dos cortes histológicos longitudinais da musculatura esquelética, com observação de distribuição celular uniforme das fibras musculares (m); B, E e I: 20x (Barra: 100 μm); C, F, L e M: 10x (Barra: 100 μm); H: 40X (Barra: 50 μm)

Figura 19 - Análise histológica das amostras



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotomicrografias de diferentes órgãos (Ctr: não tratado, Inoc: inoculado com células-tronco). A) Visualização macroscópica da pele da região cervical que foi utilizada como local de inoculação subcutânea; B, C) Visualização microscópica da pele e seus anexos com observação de extrato córneo (ec), tecido adiposo (a) e glândulas sebáceas (gs) com características típicas; D) Visualização macroscópica do estômago E,F) Observação microscópica dos corte histológicos do estômago; G) Visualização macroscópica do estômago, intestino delgado, pâncreas e intestino grosso; H,I) Visualização microscópica do pâncreas; B, E e F: 10x (Barra: **100 µm**); C, H e I: 20x (Barra: **100 µm**)

6.3 TESTE PRÉ-CLÍNICO

Foram selecionados para este experimento 10 animais que apresentavam sinais clínicos sistêmicos e neurológicos com evolução de até 10 dias compatíveis com a cinomose canina, com idade variando entre dois meses a oito anos e histórico de vacinação incompleta ou ausente. Destes animais apenas oito animais participaram do experimento, devido ao óbito natural de um animal após o atendimento e um consentimento negado por parte do proprietário após o atendimento e seleção realizada. Estes animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com teste duplo-cego, compreendido por GS que contou com a participação de quatro animais machos e um animal fêmea, com idades variando entre três meses e oito anos e com resultado de RT-PCR positivo para quatro animais. O GSTC incluiu a participação de dois animais fêmeas e um animal macho, entre as idades de dois meses a dois anos de idade e com resultado de RT-PCR positivo para um animal. Ambos os animais não participantes do experimento tiveram resultado de RT-PCR positivo. Os animais que apresentaram resultado negativo para o RT-PCR também foram incluídos no experimento de acordo com a observação de sinais clínicos característicos da doença. Foram incluídos no experimento animais que apresentavam esquema vacinal ausente, incompleto ou desatualizado. Na tabela 9 segue relação dos animais que compreenderam o experimento com os referidos resultados de RT-PCR:

Tabela 09 – Relação dos animais que compreenderam os grupos experimentais de acordo com a idade, sexo, raça, esquema vacinal e resultado do PCR

Grupo	Animal	Idade	Sexo	Raça*	Vacinação	PCR	Amostra
GS	Costelina	3 meses	M	SRD	Incompleta	Positivo	Urina
GS	Cisquinho	2 anos	M	Fox Paulistinha	Ausente	Positivo	Sangue
GS	Lobinho	2 anos	M	Blue Heeler	Desconhecido	Positivo	Urina
GS	Bily	4 anos	M	Pincher	Não ética	Negativo	Sangue
GS	Rayla	8 anos	F	SRD	Ausente	Positivo	Urina
GSTC	Princesa	2 anos	F	SRD	Ausente	Negativo	Urina
GSTC	Leleca	2 meses	F	SRD	Ausente	Negativo	Sangue
GSTC	Tomy	2 anos	M	SRD	Ausente	Positivo	Urina

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

*SRD: sem raça definida

**PCR: Proteína C reativa

+: Amostra positiva

-: Amostra negativa

M: macho

F: fêmea

6.3.1 Realização de RT-PCR

No dia do atendimento (dia 0) foi coletada amostra urinária e sanguínea dos animais para realização do teste de RT - PCR para confirmar o diagnóstico clínico dos animais dos grupos GS e GSTC, que obteve os seguintes resultados demonstrados na tabela 10:

Tabela 10 – Relação dos resultados de PCR das amostras dos animais dos GC e GSTC

GRUPO	Positivo	Negativo
GS	04	01
GSTC	01	02

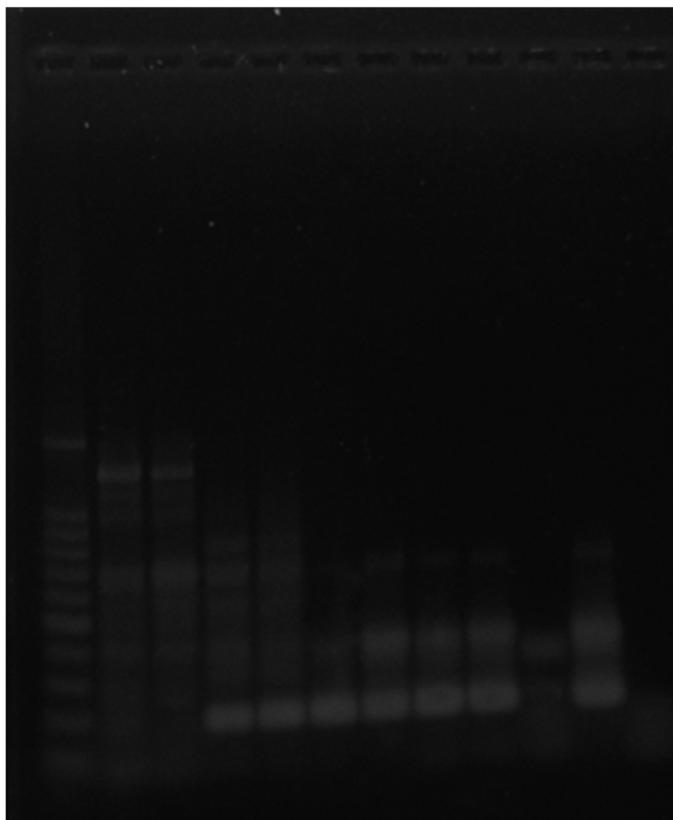
Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

GS: Grupo suporte

GSTC: Grupo suporte + terapia celular

#: porcentagem

Figura 20 - Teste de RT- PCR das amostras



Fonte: (Alencar, A. L. F., 2014)

Legenda: Fotografia da análise das amostras pelo método de RT-PCR

6.3.2 Evolução da doença de acordo com os sinais clínicos sistêmicos e neurológicos

Para seleção dos animais neste experimento, foram estabelecidos critérios de seleção baseados no histórico vacinal, sinais clínicos sistêmicos e neurológicos de até dez dias de

evolução. No GS foram incluídos animais escolhidos aleatoriamente, que apresentavam sinais clínicos sistêmicos e neurológicos. Entre os sinais sistêmicos, cansaço fácil, hiporexia e secreção ocular (60%) foram as alterações observadas com maior prevalência, seguidos de alterações como secreção nasal e tosse (40%), diarreia, dispnéia, hipodipsia, pústula abdominais, hiperqueratose de coxim digital e pele escamosa (20%). Dentre os pacientes que participaram do GSTC, os sinais clínicos com maior prevalência foram êmese (100%), hiporexia, secreção nasal e ocular (33,3%). Devido a não observação de todos os sinais clínicos em domicílio, por parte dos proprietários, não podemos excluir a possibilidade de índices de prevalência maiores em relação a sintomatologia. As principais alterações observadas estão relacionadas na tabela 11 abaixo:

Tabela 11 – Relação dos sinais clínicos sistêmicos observados no primeiro atendimento

Sinais clínicos sistêmicos	GS	GSTC
Cansaço fácil	3 (60%)	
Êmese		3(100%)
Diarreia	1 (20%)	
Dispneia	1 (20%)	
Hipodipsia	1 (20%)	
Hiporexia	3 (60%)	1 (33,3%)
Secreção nasal	2 (40%)	1 (33,3%)
Secreção ocular	3 (60%)	1 (33,3%)
Tosse	2 (40%)	
Pústulas abdominais	1 (20%)	
Hiperqueratose de coxim digital	1 (20%)	
Pele escamosa	1 (20%)	

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014).

GS: Grupo suporte

GSTC: Grupo suporte + terapia celular

%: porcentagem

Dentre as alterações neurológicas observadas com maior prevalência no GS, podemos citar a ataxia (100%), seguido de déficit de locomoção (80%), alterações em nervos cranianos, apatia, mioclonia e tremores (40%), andar em círculos, atrofia muscular, balançar de cabeça, choro noturno, desvio de cabeça, hipermetria, hiperexcitabilidade, nistagmo, paresia e diminuição de propriocepção (20%). No GSTC observou-se alterações neurológicas de déficit de locomoção (100%), ataxia, atrofia muscular, mioclonia, paresia, alterações em nervos cranianos (66,6%), choro noturno, decúbito permanente, espasticidade de membros, trismo, incontinência urinária e sialorréia (33,3%). As principais alterações neurológicas observadas estão relacionadas na tabela 12 abaixo:

Tabela 12 – Relação dos sinais neurológicos observados no primeiro atendimento

Sinais clínicos sistêmicos	GS	GSTC
Ataxia	5 (100%)	2 (66,6%)
Alterações em nervos cranianos	2 (40%)	2 (66,6%)
Andar em círculos	1 (20%)	
Apatia	2 (40%)	
Atrofia muscular	1 (20%)	2 (66,6%)
Balançar de cabeça	1 (20%)	
Choro noturno	1 (20%)	1 (33,3%)
Decúbito permanente		1 (33,3%)
Déficits de locomoção	4 (80%)	3 (100%)
Desvio de cabeça	1 (20%)	
Espasticidade de membros		1 (33,3%)
Trismo		1 (33,3%)
Hipermetria	1 (20%)	
Hiperexcitabilidade	1 (20%)	
Incontinência urinária		1 (33,3%)
Mioclonia	2 (40%)	2 (66,6%)
Nistagmo	1 (20%)	
Sialorréia		1 (33,3%)
Paresia	1 (20%)	2 (66,6%)
Tremores	2 (40%)	
Diminuição da Propriocepção	1 (20%)	

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014).

GS: Grupo suporte

GSTC: Grupo suporte + terapia celular

%: porcentagem

De acordo com os sinais neurológicos observados, podemos identificar a localização das lesões no sistema nervoso central. No GS encontramos lesões em cerebelo e encéfalo (100%), nervo periférico (40%), medula espinhal, nervos cranianos, sistema vestibular e tronco encefálico (20%). Nos animais do GSTC observamos lesões em encéfalo e nervos periféricos (100%), cerebelo, medula espinhal (66,6%), nervos cranianos e tronco encefálico (33,3%). A localização das lesões estão relacionadas na tabela 13 abaixo:

Tabela 13 - Localização das lesões neurológicas no SNC

Localização das lesões	GS	GSTC
Cerebelo	5 (100%)	2 (66,6%)
Encéfalo	5 (100%)	3 (100%)
Medula Espinhal	1 (20%)	2 (66,6%)
Nervo periférico	2 (40%)	3 (100%)
II Par NC	1 (20%)	1 (20%)
III Par NC	1 (20%)	1 (33,3%)
VIII Par NC	1 (20%)	
Sistema vestibular	1 (20%)	
Tronco encefálico	1 (20%)	1 (33,3%)

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014).

GS: Grupo suporte

GSTC: Grupo suporte + terapia celular

#: porcentagem

NC: nervos cranianos

Figura 21 – Principais sinais clínicos identificados nos exames clínicos



Fonte: (Pinheiro, A.O., 2014)

Legenda: Fotografia dos principais sinais clínicos observados nos exames físico: A) Animal apresentando alterações neurológicas como ataxia, trismo, mioclonia e sinais sistêmicos como ejeção de vasos episclerais; B) Secreção ocular mucopurulenta bilateral; C) Secreção ocular mucopurulenta unilateral com presença de anisocoria; D) Hiperqueratose coxins podais; E) Presença de pústulas em região abdominal; F) Secreção ocular mucopurulenta unilateral e anisocoria

6.3.3 Avaliação Hematológica

Os exames hematológicos foram analisados através do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2011), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE).

Os hemogramas foram colhidos nos dias 0, 6, 9, 12 e 15 de tratamento nos GS e GSTC. Na análise em relação aos grupos foi registrada uma variância significativa nos valores de plaquetas, eosinófilos e linfócitos. Contudo esses parâmetros não obtiveram variação significativa nas análises em relação ao tempo. Na análise em relação ao tempo foi registrada uma variância significativa nos valores do hematócrito e hemoglobina.

Embora não exista uma diferença estatística, no grupo controle identificou-se no dia 0 anemia normocítica normocrômica nos integrantes do GS. Em contrapartida no dia 15 observou-se aumento no número total de hemácias por microlitro com valores de referência normais. Este fato pode estar relacionado à suplementação vitamínica utilizada no tratamento que propiciou aumento da hematopoiese. Nos cães do GSTC não foi identificada alteração

significativa nestes índices. Quanto ao número total de leucócitos por microlitro no GSTC observou-se diminuição na taxa de linfócitos. Os animais iniciaram o tratamento com a taxa de linfócitos dentro da normalidade e durante o tratamento desenvolveram um quadro de linfopenia progressiva. Os dados referentes aos valores hemayológicos se encontram expressos na tabela 14 e 15 abaixo:

Tabela 14 - Diferença estatística em relação aos grupos na avaliação hematológica

	GS		GSTC	
	Média	DP	Média	DP
Hemácias (x10⁶ µL)	4,86	0,99	5,45	0,55
Hemoglobina (g/dL)	12,99	3,01	14,35	1,02
Hematócrito (%)	35,48	8,21	38,56	2,77
Reticulócitos %	0,24	0,78	0,00	0,00
VCM (fL)	72,91	5,56	72,54	6,54
HCM (fL)	26,62	2,39	26,46	2,71
CHCM (%)	36,61	1,60	36,55	1,37
Eritroblastos	1,18	2,36	0,14	0,36
Plaquetas (10³/ µL)	301636,36*	206040,91	587928,57*	376874,69
Leucócitos (x10³ µL)	14815,38	10968,96	12280,00	4495,74
Bastonetes	31,77	114,55	543,33	705,93
Segmentados	11767,69*	8960,37	10203,60*	3798,11
Eosinófilos	69,69*	102,15	224,60*	232,69
Linfócitos	1497,23	1156,55	780,73	1183,28
Basófilos	5,85	21,08	7,47	28,92
Monócitos	1443,15	1762,19	964,93	432,48

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

Estatística : teste de Tuken .

*Valores menores de (p>0,05) indicam diferença significante entre grupos

GS: Grupo Suporte

GSTC: Grupos suporte + Terapia celular

DP: Desvio padrão

g/dL: gramas por decilitro

%: porcentagem

fL: fentolitros

µL: microlitros

Tabela 15 - Diferença estatística em relação ao tempo na avaliação hematológica

Dias	0		6		9		12		15	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Hemácias (x10 ⁶ µL)	4,37	1,04	4,91	0,58	5,51	0,41	5,79	0,47	5,58	0,81
Hemoglobina (g/dL)	11,04 ^c	2,93	13,25 ^{bc}	0,54	14,43 ^{ab}	1,44	15,28 ^a	1,43	15,35 ^a	0,90
Hematócrito (%)	31,20 ^c	6,96	35,80 ^{bc}	2,35	39,38 ^{ab}	4,58	42,65 ^a	3,86	39,95 ^{ab}	2,37
Reticulócitos %	0,43	1,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VCM (fL)	70,22	4,07	73,52	6,19	71,75	6,92	74,08	7,76	74,63	6,49
HCM (fL)	25,12	1,46	27,18	2,44	26,25	2,55	26,50	3,51	27,78	2,95
CHCM (%)	35,84	1,31	37,17	1,22	36,68	1,30	35,75	1,46	37,28	1,93
Eritroblastos	0,20	0,45	1,50	3,21	0,33	0,52	0,50	1,00	0,25	0,50
Plaquetas (10 ³ µL)	344200,00	292961,94	414000,00	339865,27	458833,33	274705,96	525000,00	358902,96	622750,00	544293,04
Leucócitos (x10 ³ µL)	14712,50	11628,71	12016,67	6772,12	15433,33	8627,55	12175,00	4320,78	11425,00	5653,54
Bastonetes	82,60	184,70	40,00	80,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!	490,00	753,79
Segmentados	11580,13	8632,94	9906,83	5847,65	12919,67	8027,12	10460,25	3966,62	8648,25	4665,03
Eosinófilos	85,38	159,34	112,83	115,28	267,17	325,74	241,50	137,97	86,50	122,57
Linfócitos	1590,50	1736,92	976,67	1040,27	818,33	693,08	573,25	688,56	1347,00	1295,44
Bastonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	12,67	31,03	0,00	0,00	28,00	56,00
Monócitos	1423,63	1992,36	1020,33	1108,10	1388,83	960,59	900,00	689,65	947,75	174,30

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

Estatística: Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha significa diferença estatística entre os dias, independente do grupo analisado. Valores menores de ($p > 0,05$) indicam diferença significativa. Teste de médias de Tukey

DP: Desvio padrão

g/dL: gramas por decilitro

%: porcentagem

fL: femtolitros

µL: microlitros

6.3.4 Avaliação Bioquímica

As amostras sanguíneas para avaliação bioquímica foram colhidas nos dias 0 e 15 de tratamento e foi utilizado o mesmo método de avaliação na análise hematológica. Os resultados não apontaram diferenças estatísticas entre grupo, dia da coleta ou interação entre dia e grupo. No GS foi encontrado alteração nos níveis de ALT sanguínea que pode ser justificada pelas lesões causada por necrose de hepatócitos. No GSTC foram identificadas alterações nos índices de ALT devido à alterações hepáticas causadas por necrose de

hepatócitos e nos índices de FA e GGT que pode ser causada por obstrução de ductos biliares.

6.3.5 Avaliação Urinária

As amostras de urina foram colhidas em dois momentos durante o tratamento dos animais do GS e GSTC respectivamente nos dias 0 e 15. Quando analisada a cor da urina não foram observadas alterações significativas, mas em dois animais do GS e dois animais do GSTC foi identificada alteração na cor (amarelo ouro) que sugere a presença de bilirrubina urinária, que foi confirmada através do exame químico urinário. Diante uma possível lesão hepática, foram analisados os resultados bioquímicos no soro sanguíneo que confirmaram a lesão.

Quanto ao odor, todas as amostras possuíam características *sui generis*. Quando analisado o aspecto da urina, não foi encontrado resultado significativo entre as amostras, porém observamos que na primeira coleta realizada, dois animais do GSTC apresentavam a urina turva com presença de bactérias e leucócitos, demonstrando que os animais apresentavam cistite bacteriana.

Os resultados da densidade urinária não apresentaram alterações laboratoriais e clínicas, considerando os valores de referência para cães. Da mesma forma, os valores de pH urinário também não apresentaram alterações significativas entre os grupos. Quanto à análise dos resultados do exame químico urinário, não houve alteração nas concentrações de urobilinogênio, glicose e corpos cetônicos em ambos os grupos, com alterações nas concentrações de bilirrubina em dois animais do GS e um animal do GSTC que indica lesão hepática, que pode ser confirmada através da análise bioquímica hepática do soro sanguíneo. Na avaliação das concentrações de proteína, observamos alterações nos animais diagnosticados com cistite, que justifica a presença de proteínas devido à degradação celular e bacteriana.

Na análise de sangue oculto, observamos a presença em quatro animais do GS e dois animais do GSTC que pode ser causada pela presença de hemoglobina ou hemácias.

Na análise dos sedimentos urinários não foi encontrada alteração significativa. Foi identificada a presença de células descamativas, transição e renais dentro dos padrões de

normalidade. Quanto à presença de cilindros, foi identificado a presença de cilindro granuloso em um animal do GS no primeiro dia de colheita que não pode ser observado na segunda colheita devido ao óbito do animal durante o tratamento. O cilindro granuloso é identificado em casos de lesões renais em estágio mais avançado.

A presença de cristais está associada principalmente ao pH urinário. Em um animal foi observado à presença de fosfato triplo em outros dois animais de oxalato de cálcio. A presença de fosfato triplo é identificada principalmente em amostras com pH alcalino, podendo ser encontrada também em amostras com pH neutro ou levemente ácido. Os cristais de oxalato de cálcio estão relacionados a um pH urinário ácido, assim como foi identificado em ambos os casos. Devido ao óbito dos animais durante o tratamento não foi possível observar a formação de cristais na segunda coleta que seria realizada no dia 15.

Quanto à presença de hemácias na urina apenas um animal obteve resultado positivo na análise de sedimento urinário, sendo o animal que foi diagnosticado inicialmente na primeira coleta com cistite bacteriana. Este achado pode estar relacionado à alteração do epitélio vascular e tecidual que pode originar quadros de hemorragia intra-vesical.

A presença de leucócitos foi verificada em um animal do GSTC no segundo dia da coleta, com presença de bactérias e turbidez alterada, condizentes com cistite bacteriana.

No GSTC foi identificada a presença de bactérias na urina de todos os animais, que pode ser justificada pelo método de coleta utilizado que foi cateterismo ou micção natural.

6.3.6 Tratamento e acompanhamento clínico laboratorial

Os animais participantes do experimento foram acompanhados por 15 dias e receberam tratamento sintomático de acordo com apresentação clínica sistêmica e neurologia, com acompanhamento domiciliar e ambulatorial realizado com intervalo de três dias. No dia dos atendimentos, foram realizadas as avaliações clínicas dos pacientes através de exame físico e neurológico e coleta de amostras para realização de exames complementares. Os animais que compreenderam o GS receberam tratamento sintomático que consistiu na administração de antipiréticos (Dipirona sódica dose 25 mg/kg/q8-12h/SC) (60%), complexos vitamínicos (Vitaminas A dose 400UI/kg/q24h/VO; Complexo B dose 50-500 mcg/kg/IM, Vitamina C dose 100-500 mg/animal/q8h/VO e Vitamina E dose 5-10 mg/kg/q24h/VO)

(100%) e antibiótico (sulfametoxazol + trimetoprima dose 20 mg/kg/VO) (100%), ácido fólico (1 mL/10 kg/q12h/VO) (40%) dos casos e fluidoterapia endovenosa conforme desbalanço hidroeletrólítico.

Os animais participantes do GSTC receberam a administração de tratamento sintomático de acordo com a apresentação clínica com o uso de complexos vitamínicos (Vitaminas A dose 400UI/kg/q24h/VO; Complexo B dose 50-500 mcg/kg/IM, Vitamina C dose 100-500 mg/animal/q8h/VO e Vitamina E dose 5-10 mg/kg/q24h/VO) (100%), antibiótico (sulfametoxazol + trimetoprima dose 20 mg/kg/VO) (100%), ácido fólico (1 mL/10 kg/q12h/VO) (66,6%) dos casos e fluidoterapia endovenosa conforme desbalanço hidroeletrólítico. No terceiro dia de tratamento, foi realizada a inoculação endovenosa pela veia cefálica de 1.0×10^6 / kg de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em dose única. Após a aplicação, os animais foram acompanhados por uma hora para serem liberados. Os resultados estão expressos na tabela 16 abaixo.

Tabela 16– Relação do tratamento proposto nos grupos GS e GSTC

	GS	GSTC
Dipirona sódica	3 (60%)	
Vitamina A	5 (100%)	3 (100%)
Vitamina B	5 (100%)	3 (100%)
Vitamina E	5 (100%)	3 (100%)
Vitamina C	5 (100%)	3 (100%)
Sulfametoxazol + trimetoprima	5 (100%)	3 (100%)
Ácido fólico	2 (40%)	2 (66,6%)
Fluidoterapia	2 (40%)	

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014).

GS: Grupo suporte

GSTC: Grupo suporte + terapia celular

%; porcentagem

Após o tratamento e acompanhamento dos animais, obteve-se uma alta taxa de mortalidade prevalente no GS e GSTC. No GS foram selecionados cinco animais, com índice de mortalidade durante o tratamento de (80%) e índice de sobrevivência de 20% com recuperação completa do paciente. No GSTC obteve-se um índice de mortalidade de (66,6%) com índice de sobrevivência de (33,3%) sem melhora clínica considerável (Tabela 17).

Tabela 17 – Relação da evolução clínica de acordo com o tratamento proposto

GRUPO	Sobrevivência	Óbito
GS	01	04
GSTC	01	02

Fonte: (PINHEIRO, A. O., 2014)

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Nos estudos realizados por Alves et al., 2007 o epitélio olfatório canino apresenta uma linhagem de células responsáveis pela renovação celular, sugerindo que esta linhagem possa ser responsável pela reposição de células sustentaculares e neurônios olfatórios localizados nesta região. Baseados nestes resultados, buscamos com este experimento caracterizar e utilizar esta linhagem celular no tratamento de cães com cinomose canina com comprometimento neurológico devido sua possível capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens celulares.

Neste trabalho estabelecemos com sucesso a linhagem de MSCs do epitélio olfatório canino baseado na metodologia descrito por Alves et al. (2009). Estas células apresentaram morfologia fibroblástica com aderência das células à superfície plástica, que constitui uma das características de células-tronco mesenquimais descritas por Bydlowski et al. (2009).

Na análise da curva de crescimento o pico de maior crescimento celular foi registrado na terceira passagem, com sucessivo declínio da taxa de proliferação após esta passagem, portanto, sendo o momento ideal para utilização em teste pré-clínico. Esses resultados condizem com LOCKHART et al. (1971) e VIDANE et al. (2014) que citam que na análise de curva de crescimento celular deve ser observado uma significativa elevação do número de células durante as primeiras passagens, indicando uma elevada taxa de proliferação celular, com posterior declínio nas sucessivas passagens. O *double time* desta análise demonstrou um crescente aumento no número de dias para duplicação celular, fenômeno este observado em MSCs que sofrem desgaste e quiescência à medida que aumentam o número de passagens (VIDANE et al., 2014).

As células foram avaliadas quanto à sua capacidade de formar colônias, observando-se a formação de inúmeras colônias celulares. Este evento é considerado um meio de quantificar o número de células-tronco mesenquimais que podem ser encontradas em diversos tecidos quando inoculadas (BEYER; MEIRELLES, 2006).

Através deste experimento, obtivemos resultados que sustentam a hipótese de que as células-tronco de epitélio olfatório podem ser criopreservadas por longo período sem perder sua capacidade de alta proliferação celular após seu descongelamento, podendo ser formado um banco de células-tronco para aplicação em futuros estudos pré-clínicos. Estes resultados podem ser confirmados por Edamura et al. (2014) onde pode-se comprovar a elevada capacidade proliferativa por várias passagens após processo de descongelamento.

Para realização da imunofenotipagem de marcadores mesenquimais e neuronais, foi realizada a imunofenotipagem através da técnica de imunocitoquímica e citometria de fluxo. Na análise imunocitoquímica para marcadores mesenquimais, foi observada marcação positiva para marcadores CD105, CD73 e CD90 e negativos para marcadores CD34, CD45 e CD79. Na análise por citometria de fluxo foi observada marcação inespecífica para marcadores mesenquimais CD90, CD105 e CD73 e marcação negativa para marcadores hematopoiéticos CD34, CD45 e CD79A conforme relatado por Alves (2009). Este resultados contradizem os resultados reportados por Dominicini et al. (2006) e Bydlowski et al. (2009) que relatam a expressão positiva para marcadores CD105, CD73 e CD90 e expressão negativa para marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79, ou CD19 e HIA-DR em células-tronco mesenquimais. Este fato pode ser justificado pelo uso de anticorpos inespecíficos para MSCs na espécie canina. Na imunocitoquímica de marcadores neuronais foi utilizado a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) que é o principal componente estrutural dos astrócitos de indivíduos adultos (ORSINI et al., 2007), Nestin e β tubulin. Foi identificada nesta técnica marcação positiva para marcador β tubulin e inespecífica para GFAP e Nestin. Nos trabalhos de Alves (2009), foi identificada marcação positiva para todos os marcadores neuronais.

As células em terceira passagem foram submetidas a um meio de diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica. Após 21 dias de observação diária, foi possível realizar coloração específica e identificar alterações morfológicas típicas de células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas condizentes com as características observadas nas células-tronco mesenquimais (DOMINICINI et al., 2006; ALVES, 2009; BYDLOWSKI et al., 2009; WENCESLAU et al., 2011; TAGHI et al., 2012; Vidane et al., 2014).

Para teste de potencial carcinogênico, foram injetadas células pelas vias subcutânea, intramuscular e intraperitoneal para observar a formação de possíveis teratomas no local da inoculação. Utilizamos camundongos imunossuprimidos (Balb/c - Nude) devido à ausência de um sistema imune capaz de destruir as células inoculadas, podendo sobreviver no animal e formar tumores benignos contendo todos os tipos celulares derivados das três camadas germinativas do embrião. Como esperado para as células de epitélio olfatório não houve a formação de teratomas com também descrito por Wenceslau et al. (2011) e Vidane et al. (2014) e em outras linhagens de células mesenquimais.

Após a realização de testes de caracterização celular e comprovada a segurança das células-tronco de epitélio olfatório fetal canino, iniciamos o teste pré-clínico com cães infectados pelo vírus da cinomose canina na fase aguda com sinais neurológicos. Para

Cyranoshi (2013) houve um grande aumento no uso de células-tronco na medicina veterinária, embora a eficácia desses testes seja questionada constantemente pela falta de comprovação, devido à ausência de grupos controle e avaliação duplo-cega. Apesar das regras de uso das células estarem pendentes devido à ausência de comprovações, não há uma legislação que impeça seu uso.

Para a realização do experimento, os animais foram selecionados de acordo com os sinais clínicos e resultado positivo para cinomose canina através de Rt-PCR. Para o diagnóstico laboratorial, diferentes tipos de testes podem ser utilizados ante morte, entretanto o diagnóstico definitivo permanece incerto em alguns casos (CURTI et al., 2012). As inclusões citoplasmáticas denominadas Corpúsculos de Lentz são visualizadas em eritrócitos e leucócitos na fase de viremia da doença e, quando identificadas, são seguramente patognômico da cinomose canina, mesmo sem alterações clínicas identificáveis (ALMEIDA et al., 2009). Na avaliação dos esfregaços das amostras sanguíneas, não foi observado a presença de corpúsculo de Lentz em hemácias e leucócitos, dificultando nosso diagnóstico.

De acordo com Curti et al. (2012) o kit de imunoenensaio cromatográfico para detecção de antígeno (Ag) da cinomose em cães, não foi eficaz para o diagnóstico da cinomose na forma neurológica quando comparado à técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). Diante estes resultados utilizamos a técnica de RT-PCR para a detecção do vírus da cinomose devido à presença de alterações neurológicas em todos os animais do experimento. Os testes RT-PCR dos participantes do GS e GSTC realizados em nosso experimento expressaram índice de positividade 62,5%. Comparando o tipo de amostra analisada verificamos índice de positividade de 80% nas amostras urinárias e 20% das amostras sanguíneas analisadas. Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Negrão et al. (2007) que relatou índice de positividade de 90,4% das amostras analisadas e de 70,4% das amostras sanguíneas. Esses dados confirmam a maior sensibilidade da amostra urinária como material biológico em relação à amostra sanguínea (GEBARA et al., 2004; NEGRÃO et al., 2007; ALCALDE et al., 2013). De acordo com McCandlish (2001), os sinais clínicos são variáveis e podem ser influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos tais como idade, condição física, estado imune e cepa viral envolvida. A sintomatologia se desenvolve poucos dias após a infecção e acomete principalmente o sistema respiratório, gastrointestinal e neurológico (DIAS et al., 2012). Os principais sinais clínicos identificados são: febre, linfadenopatia, secreção oculonasal, vômito, diarreia, conjuntivite, pneumonia, tosse produtiva, hiperqueratose, pele escamosa e flocosa, pústula abdominais, desidratação,

anorexia, hipoplasia de esmalte dentário (BEER, 1988; McCANDLISH, 2001; HOSKINS, 2004; SHERDING, 2008; MARTINS et al., 2009; NELSON; COUTO, 2010). As descrições desses autores corroboram com os resultados obtidos em nosso experimento, onde identificamos como principais sinais o cansaço fácil, hiporexia e secreção ocular (60%) dos casos, seguidos de alterações como secreção nasal e tosse (40%), diarreia, dispneia, hipodipasia, pústula abdominais, hiperqueratose de coxim digital e pele escamosa (20%). Dentre os pacientes que participaram do GSTC, os sinais clínicos com maior prevalência foram êmese (100%), hiporexia, secreção nasal e ocular (33,3%). Devido a não observação de todos os sinais clínicos, à nível domiciliar, por parte dos proprietários, não podemos excluir a possibilidade de índices de prevalência maiores em relação a sintomatologia.

De acordo com estudo realizado por Tudury et al. (1997) em 81 cães com sinais clínicos, lesões histológicas e corpúsculos de inclusão no sistema nervoso central foi identificado como os principais sinais clínicos: alterações das reações posturais (83,95%), presença de mioclonias (75,30%), paresias (69,12%) e conjuntivite (56,79%). Os dados deste estudo corroboram com os resultados encontrados em nosso experimento, com alterações na locomoção (80% no GS e 100% GSTC), mioclonias (40% no GS e 66,6% no GSTC), secreções oculares (60% GS e 33,3% GSTC). A paresia foi o sinal clínico menos evidente no GS (20%) em contrapartida os índices do GSTC (66,6%) se comparam ao resultado de Tudury et al. (1997).

A incidência da ocorrência de lesões neurológicas identificadas no sistema nervoso central como encéfalo e cerebelo (100%) através da avaliação dos sinais clínicos, corroboram com os resultados obtidos por Silva et al. (2009), que relacionou como as regiões do sistema nervoso central mais afetadas pelo vírus da cinomose canina. Em contrapartida, nossos resultados associam lesões na medula espinhal com maior incidência no seguimento espinhal L4-S3, contrapondo os resultados obtidos por Silva et al. (2009) que estabelece o seguimento C1-C5 mais prevalente. Baseados em nossos resultados que foram baseados em atendimentos com baixa casuística, não podemos descartar a possibilidade de lesões em medula espinhal mais prevalente em segmento C1-C5 conforme descrito pelo autor.

No GS encontramos lesões em cerebelo e encéfalo (100%), nervo periférico (40%), medula espinhal, nervos cranianos, sistema vestibular e tronco encefálico (20%). Nos animais do GSTC observamos lesões em encéfalo e nervos periféricos (100%), cerebelo, medula espinhal e nervos cranianos (66,6%) e tronco encefálico (33,3%).

Com relação aos parâmetros sanguíneos, a literatura relata quadros de anemia normocítica normocrômica (MENDONÇA et al., 2000), leucocitose ou leucopenia e

linfopenia (SILVA et al., 2005). Estes dados corroboram com os resultados encontrados em nosso experimento, com quadros de anemia normocítica normocrômica, neutrofilia nos estágios iniciais do tratamento e linfopenia. A linfopenia Segundo Moro e Vasconcellos (1998) é causada por uma destruição de linfócitos devido à replicação viral nos tecidos linfóides, causando uma depleção linfóide sistêmica.

Os resultados de bioquímicas sanguíneas são inespecíficos em cães com cinomose canina de acordo com McCandlish (2001). Em nossos resultados verificamos alterações hepáticas através do aumento de enzimas hepáticas e hepatobiliares que pode ser justificada pelo uso de antimicrobianos de metabolização hepática como a sulfametoxazol + trimetoprima em ambos os grupos.

As alterações urinárias identificadas na cinomose canina são inespecíficas de acordo com McCandlish (2001) não possuindo valor diagnóstico. Na análise dos resultados encontrados na avaliação urinária, a principal alteração identificada foi cistite bacteriana que pode ser justificada devido aos quadros paresia e retenção urinária identificado nos pacientes.

Quanto ao tratamento, os animais do GS e GSTC receberam tratamento baseado na sintomatologia clínica e alterações laboratoriais, que consistiu na administração de antipiréticos, complexos vitamínicos, antibiótico e fluidoterapia endovenosa conforme desbalanço hidroeletrólítico. Essas mediações são indicadas no tratamento da cinomose canina para controle dos sinais clínicos até a estabilização do paciente (SHERDING, 2008; NELSON; COUTO, 2010; CURTI et al., 2012). Outra abordagem proposta no tratamento da cinomose é o uso de antivirais como a ribavirina associada ao DMSO. Em estudo realizado por Mangia (2008), o DMSO demonstrou ser potencializador da ribavirina em sua ação antiviral, demonstrando possuir atividade efetiva contra o vírus da cinomose em animais na fase neurológica com melhora sensível do quadro clínico. O GSTC recebeu associado ao tratamento sintomático, aplicação endovenosa pela veia cefálica de 1.0×10^6 / kg de células-tronco de epitélio olfatório fetal canino em dose única. O uso de células-tronco pela via endovenosa possui a desvantagem da perda do volume celular devido ao efeito de primeira passagem pulmonar, em que a microvascularização pulmonar realiza efeito de filtragem evitando que as células atinjam em grande volume a circulação arterial, como também o risco de tromboembolismo pulmonar devido ao grande volume celular inoculado (FISCHER et al., 2009). Porém, neste estudo não foi registrado nenhum efeito adverso do procedimento, pois os animais foram monitorados e não foi registrada nenhuma intercorrência durante a inoculação. Em contrapartida a via endovenosa é um via de aplicação que possui a vantagem de ativar mecanismo parácrino, anti-inflamatórios, imunomoduladores e anti-fibrótica dos

tecidos lesionados importantes na terapia baseada em células tronco (DEAK et al., 2009; QUIMBY et al., 2013). Estudos estão sendo realizados no intuito de quantificar o número de células necessárias para exercer um efeito terapêutico no interior da área do órgão alvo para diversas doenças. Em nosso experimento utilizamos o valor de $1 \times 10^6/\text{Kg}$. Comparando os tratamentos propostos nos GS e GSTC, identificamos um alto índice de mortalidade dos pacientes durante o experimento. Esta alta taxa de letalidade pode estar relacionada ao estágio agudo da sintomatologia clínica e neurológica e a gravidade da doença, que é considerada reservada nas formas iniciais, mas na fase avançada e neurológica podendo deixar sequelas irreversíveis ou levar o animal ao óbito (CORREA; CORREA, 1979; BEER, 1988). Baseado nestes dados Brito et al. (2009) relatou que o tratamento realizado com cães na fase virêmica da doença demonstrou ser ineficaz, sendo este resultado condizente com nosso experimento.

De acordo com Martins et al. (2009), a vigilância epidemiológica é indispensável na identificação de variantes genéticas virais e controle da eficácia de vacinas desenvolvidas na atualidade, estando estes fatores diretamente relacionados à diminuição da taxa de prevalência dos casos da cinomose canina. Segundo os estudos de ESPINAL et al. (2014) sugerem que uma variante genética nova diferente das cepas encontradas nas vacinas, foi identificada na Bolívia e pode estar presente em outros países da América do Sul. Com isso conclui-se que existem pelo menos três tipos de cepas virais causadoras da cinomose canina em carnívoros domésticos e selvagens da América do Sul. Embora as vacinas serem utilizadas como o principal meio de controlar a doença, constantemente relatam-se casos de cinomose em cães em animais vacinados (WEIKE et al., 2014). Mesmo diante este fato, a cinomose canina, tanto em animais domésticos, silvestres e animais de valor econômico, está diretamente relacionada à falha de esquemas vacinais. De acordo com nossos resultados obtidos, que nos demonstraram que (100%) dos animais participantes deste experimento não eram imunizados ativamente, possuindo esquemas vacinais ausentes ou incompletos, reforçamos a importância de esquemas vacinais completos e eficientes, mesmo com a identificação de novas cepas virais, pois a diminuição dos índices de prevalência e mortalidade estão relacionados à programas epidemiológicos abrangentes.

8 CONCLUSÃO

- As células-tronco de epitélio olfatório fetal canino são células de difícil obtenção devido à dificuldade na aquisição do material e método de coleta. Apesar destas desvantagens, são células que possuem alta taxa de crescimento, viabilidade comprovada após criopreservação e características que as descrevem como células-tronco mesenquimais, tornando-se ideais para a formação de um banco de células para testes clínicos.
- No estudo pré-clínico, devido à gravidade da apresentação clínica sistêmica e neurológica dos pacientes com cinomose canina na fase aguda, não foi possível acompanhar todos os pacientes até o término do projeto devido aos óbitos, demonstrando um resultado negativo a relação entre o grupo suporte e grupo suporte + terapia celular.
- Os animais que receberam tratamento sintomático e tratamento sintomático associado à terapia celular, não apresentaram melhora clínica e laboratorial significantes.
- Devido à grande prevalência e infecciosidade da cinomose canina, baseando-se nos resultados obtidos dos tratamentos empregados na atualidade, conclui-se que a vacinação é a melhor forma de prevenção e diminuição significativa dos índices de mortalidade.
- Baseado neste trabalho, concluímos que há necessidade de estudos posteriores com maior número de casos para obtenção de dados relevantes e confirmação dos resultados obtidos neste experimento, além de testes clínicos em pacientes crônicos com sequelas neurológicas que sobrevivem a fase aguda da doença.
- O protocolo com células-tronco neuronal não é eficiente para cães com cinomose canina.

REFERENCIAS

- ALCALDE, R.; KOGIKA, M. M.; FORTUNATO, V. A. B.; COELHO, B. M. P.; LOPES, L. R.; PAIVA, P. B.; DURIGON, E. L. Canine distemper vírus: detection of viral RNA by Nested RT-PCR in dogs with clinical diagnosis. **Brazilian Journal Veterinary Resorch Animal**. v. 50, n. 1, p. 74-76, 2013.
- ALMEIDA, M. S.; TEIXEIRA, M. N.; REGO, E. W.; ALMEIDA, T. L. C.; VAZ, S. G.; SANTOS, B. M.; FAGUNDES, A. K. F.; SILVA, G. R. Visualização de inclusão viral em hemácias – relato de caso. In: **Eventos Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 2009, Pernambuco. Anais SUFRPE, Pernambuco, 2009.
- ALVES, F. R.; SANTOS, T. C.; FREIBERGER, S.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Dinâmica dos precursores celulares do epitélio olfatório de cães sem raça definida: um estudo imunohistoquímico e ultra-estrutural. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n. 9. p. 388-392, 2007.
- ALVES, F. R. Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*canis familiares* Linnaeus, 1758). 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALVES, F. R. Establishment of a protocol for obtention of neuronal stem cells lineages from the dog olfactory epithelium. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 4. p. 363-372, 2010.
- AMARAL, H. A.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FUNADA, M. R.; SOARES, R. M.; DURIGON, E. L.; LARSSON, M. A. M. H. PCR detection of canine distemper virus in biological fluids. **Online Journal of Veterinary Research**. v. 12, n. 2, p. 70-75, 2008.
- BACHA, W.J.; JR, L. M.B. **Histologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Editora Roca, 2003.
- BARBOSA, J. M.; PASSO, F. R. B. Análise dos casos de cinomose no H.V. São Francisco de Assis da Faculdade Latino Americana-Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência: C Biológicas, Agrárias e da Saúde**. vol. 12, n. 1, p. 139-150, 2008.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos-doenças causadas por vírus, infecções por clamídeas, richettiase, Micoplasmose**. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1988. v. 1.

BEYER, N. N.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: **Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, 1982, São Paulo: Anais da Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 50.

BOON, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. JANSEN, C. L.; WERTHEIM, P. M. E.; NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification os nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, n. 3, p. 495-503, 1989.

BRITO, H. F. V.; SANTOS, M. R.; GILLIOLI, R.; LI, L. M.; PASSOS, L. A. C.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, F.; CORAT, M. A. F. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais**. v. 8, n. 24, p. 26-29.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31, p. 25-35, 2009. Suplemento 1.

CHRISMAN, C. L. **Neurologia dos pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca, 1985. p. 432.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M.; **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: J. M. Varela Livros, 1979.

COTTRELL, W. O.; KEEL, M. K.; BROOKS, J. W.; MEAD, D. G.; PHILLIPS, J. E. First Report of Clinical Disease Associated with Canine Distemper Virus Infection in a Wild Black Bear (*Ursus americana*). **Journal of Wildlife Diseases**. v. 49, ed. 4, p. 1024-1027, 2013

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

CYRANOSHI, D. Stem cells boom in vet clinics. **Nature**, v. 496, ed. 7444, p. 148-149, 2013.

DEAK, E.; RUSTER, B.; KELLER, L.; ECKER, T. K.; FICHTENER, I.; SEIFRIED, E.; HENSCHLER, R. Suspension médium influences interaction of mesenchymal stromal cells with endothelium and pulmonary toxicity after transplantation in mice. **Cytotherapy**, v. 12, p.260-264, 2010.

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

DI FRANCESCO, C. E.; DI FRANCESCO, D.; DI MARTINO, B.; SPERANZA, R.; SANTORI, D.; BOARI, A.; MARSILIO, F.; Detection by hemi-nested reverse transcription polymerase chain reaction and genetic characterization of wild type strains of Canine distemper virus in suspected infected dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n.1, p.107-115, 2012.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy positions statement. **Cytotherapy**. v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EDAMURA, K.; NAKANO, R.; FUJIMOTO, K.; TESHINA, K.; KAZUSHI, A.; TANAKA, S. Effects of Cryopreservation on the Cell Viability, Proliferative Capacity and Neuronal Differentiation Potential of Canine Bone Marrow Stromal Cells. **Journal Veterinary Medicine Science**. v. 76, n. 4, p. 573-577, 2014.

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

FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 110-116.

FENNER, F.; BACHMAN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary virology**. 1 ed. Orlando: Editora Academic Press, 1987.

FENNER, W. R. Doenças do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 2004. v. 1, p. 586-638.

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

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

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de urinálise veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

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

GRANDER, N.; BLAMIRE, H.; FRANKLIN, R. J. M.; JEFFERY, N. D. Autologous olfactory mucosal cell transplants in clinical spinal cord injury: a randomized double-blinded trial in a canine translational model. **Brain**, v. 135, p. 3227-3237, 2012.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Moquillo canino. In: GREENE, C. E. **Enfermidades infecciosas – Perros y gatos**. Atlampa: Editora Interamerica McGraw – Hill, 1990. p. 236-252.

GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2012. p. 25-42.

HASSENKLOEVER, T.; SCHWARTZ, P.; DETLEV, S. Purinergic Signaling Regulates Cell Proliferation of Olfactory Epithelium Progenitors. **Stem Cells**. v. 27, ed. 8, p. 2022-2031, 2009.

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

IKEBE, C.; SUZUKI, K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014, p. 1-11.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2004.

LI, W. K.; LI, T. S.; LIU, Y. X.; GAO, Y. W.; YANG, S. T.; FENG, M.; SUN, H. T.; WANG, S. L.; WANG, L.; BU, Z. G. Genetic characterization of an isolate of canine distemper virus from a Tibetan Mastiff in China. **Virus Genes**. v. 49, ed. 1, p. 45-57, 2014. DOI: 10.1007/s11262-014-1062-z

LITFALLA, F.; HAMZÉ, A. L.; PACHECO, A. M.; SOUA, C. C.; RODRIGUES, C. A. L. S.; FILADELPHO, A. L.; BARIANI, M. H. Cinomose e o processo de desmielinização. **Rev Ciência Eletrônica de Medicina Veterinária**. ano 6, n. 1, p. 1-7, 2008.

LECOTEUR, R. A.; GRANDY, J. L. Doenças da medula espinhal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 2004. v. 1, p. 644-694.

LOCKHART, J. A. An interpretation of cell growth curves. **Plant Physiol**, v. 48, n. 3, p. 245-248, 1971.

LORENS, M. D.; KORNEGAY, J. N. **Neurologia veterinária**. 4 ed. Barueri: Editora Manole, 2006.

MANGIA, S. H; PAES, A. S. Neuropatologia da cinomose. **Veterinária e Zootecnia**. vol. 15, n. 3, p. 416-427, 2008.

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

MACKAY-SIM, A. Concise review: Patient-derived olfactory stem cells: New models for brain diseases. **Stem Cells**, v. 30, p. 2361-2365, 2012.

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

MEGID, J.; SOUZA, V. A. F.; TEIXEIRA, C. R.; CORTEZ, A.; AMORIN, R. L.; HEINEMMAN, M. B.; CAGNINI, D. Q.; RICHTZENHAIN, J. Canine distemper vírus in a Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogenetic analyses. **Journal of Wildlife diseases**, v. 45, n. 2, p.527-530, 2009.

MENDONÇA, R. B.; PAGANI, F. F.; MOREIRA DE SOUZA, A. Respostas hematológicas em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose: estudo retrospectivo de casos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p. 114, 2000. Suplemento.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**. v. 40, n. 1, p. 1-8, 2010.

MURREL, W.; FERON, F.; WETZIG, A.; CAMERON, N.; SPLATT, K.; BELLETTE, B.; BIANCO, J.; PERRY, C.; LEE, G.;MACKAY-SIM, A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. **Developmental Dynamics**, v. 233, p. 496-415, 2005.

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

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Fundamentos de Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1994.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. p. 1468.

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

NOGUEIRA, D. J.; MELO, T. C.; TONET, A. B.; SILVA, A. L. S.; BERNARDELLI, G. Aspecto clínicos e tratamentos da cinomose canina no Hospital Veterinário das Fio. In: VIII Congresso de Iniciação Científica das Faculdades Integradas de Ourinho, 2009. Ourinhos, **Anais 2009**, p. 01-08.

NOLETO, P. G.; MENDONÇA, C. S.; FERNANDES, C. C.; MANTOVANI, M. M.; TSURUTA, S. A.; SOLA, M. C.; MUNDIM, A. V. Corpúsculo de lantz em um cão com 10 dias de idade. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p.1-8, 2011.

OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. **Einsten**, v. 2, n.4, p. 355-358, 2004.

ORSINI, H.; BONDAN, E. F.; SANCHEZ, M.; LALLO, M. A.; MAIORKA, P. C.; DAGLI, M. L. Z.; GRAÇA, D. L. Marcação imunohistoquímica da expressão astrocitária de proteínas glial fibrilar ácida e vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. **Arquivo Neuropsiquiatria**, v. 65, n. 4, p. 1070-1077, 2007.

PAULA, S.; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. L. B.; FRIEDRICH, M. A. G. COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269, 2005.

PACINI, S. Deterministic and stochastic approaches in the clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs). **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 2, n. 50, p. 1-13, 2014

PINOTTI, M.; GOLLAN, A.; DELGADO, A.; PASSEGGI, C.; OCCHI, H.; BLAINQ, L.; CANAVESIO, M. Distemper canino. **Revista FAVE**, v. 8, n. 2, p. 33-45, 2009.

QUI, WEI.; ZHENG, YING.; ZHANG, SHOUTFENG.; FAN, QUANSHUI.; LIU, HUA.; ZHANG, FUQIANG.; WANG, W.; LIAO, G.; HU, R. Canine distemper outbreak in Rhesus nonkeys, China. **Emerging Inf. Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1541-1543, 2011.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; HABENICHT, L. M.; DOW, S. W. Safety and efficacy of intravenous infusin of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot sutendis. **Stem cell research and Therapy**, v. 4, n. 2, p.48, 2013.

REZENDE, R. S.; COELHO, H. E.; KAMIMURA, R.; SEVERINO, R. S.; OLIVEIRA, P. C. L.; MEDEIROS, A. A.; MAGALHÃES, A. O. C. Análise microscópica do miocárdio ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 29, n. 2, p. 117-119, 2009.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SCHIMIDIT, U.; Ortomixovirus y paramixovirus. In: BEER, J. **Enfermedades infecciosas de los animales domestico**. Zaragoza: Editora Acribia, 1987. p. 134-180.

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

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

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; MAZZANTI, A.; BRUM, J. S.; PIEREZAN, F.; BARROS, C. S. L. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 29, n. 8, p. 643-652, 2009.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E. C.; PESCADOR, C. A.; SANTOS, A. S.; PAVARINI, S. P.; CARISSIMI, A. S. DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 145-149, 2009.

TAGHI, G. M.; MARIAM, H. G. K.; TAGHI, L.; LEILI, H.; LEYLA, M. Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. **Cell Biology International**, v. 36, p. 1239-1249, 2012.

TILLEY, L. P.; SMITH JR, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos** – espécies canina e felina. 3 ed. Barueri: Editora Manole, 2008.

TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B.; BRACARENSE, A. P. F. L.; MEGID, J.; DIAS JUNIOR, R. F. D. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 229-235, 1997.

UEDA, F. S.; PENHA, G. A.; SUZUKI, E. Y.; FILADELPHO, A. L. Acupuntura e cinomose: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n. 10, p. 1-6, 2008.

VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. 2. ed. Lagoa Santa: Editora Cem, 2007. p. 462.

VIDANE, A. S.; SOUZA, A. F.; SAMPAIO, R. V.; BRESSAN, F. F.; PIERI, N. C.; MARTINS, D. S.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v.7, 71–78, 2014.

ZACHARY, J. F. Sistema nervoso. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 833-972.

WALTON, R. M.; WOLFE, J. H. In vitro growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. **Journal of Neuroscience Methods**, v.169, p.158-167, 2008.

WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n. 2, p.72-82, 2002.

WEISTINS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. p. 657-688.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBROSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Engineering, Part A**, v. 17, n. 17-18, p. 2165-2176, 2011.

WILKES, R. P.; TSAI, Y. L.; LEE, F. Y.; CHANG, H. F. G.; WANG, H. T. Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by one-tube reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction. **BMC Veterinary Research**, v 10, n. 213, p. 2-8, 2014. doi:10.1186/s12917-014-0213-8