

Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea

Bone marrow mononuclear cells as a treatment for neuronal sequels in dogs, caused by canine distemper virus

Harald Fernando Vicente de Brito – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – UNICAMP – Campinas-SP, Instituto Qualittas de Pós-Graduação - haraldvet@yahoo.com.br

Marcus Alexandre Finzi Corat – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – UNICAMP – Campinas-SP

Marcelo Ribeiro dos Santos – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – UNICAMP – Campinas-SP

Rovilson Gilioli – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – UNICAMP – Campinas-SP

Luiz Augusto Corrêa Passos – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – UNICAMP – Campinas-SP

Marcelo Lancellotti – Departamento de Bioquímica – IB/UNICAMP – Campinas-SP

Fabiano Ferreira – Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE – Recife-PE

Li Li Min – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP – Campinas-SP

Brito HFV, Corat MAF, Santos MR, Gilioli R, Passos LAC, Lancellotti M, Ferreira F, Min LL. Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação 2010; 8(24); 26-29.

Resumo

As seqüelas neurológicas da cinomose canina são consideradas irreversíveis e têm sido tratadas sintomaticamente, quando não há indicação de eutanásia, o que ocorre na maioria dos casos de seqüelas graves. Visando desenvolver uma nova abordagem terapêutica, testamos a injeção de células mononucleares de medula óssea alogeneicas extraídas de 5 cães doadores saudáveis, em 11 cães com seqüelas neurológicas com pré-diagnóstico de cinomose, sendo 7 com manifestações clínicas recentes e 4 com sinais clínicos crônicos. Dos 7 animais com seqüelas agudas ou recentes, 5 apresentaram remissão completa dos sinais clínicos e 2 melhora parcial e momentânea. Dos animais com sinais crônicos, 3 apresentaram melhora visível na primeira semana após o transplante, contudo, 2 deles, após curto período de estabilidade, apresentaram novamente os mesmos sinais clínicos vistos antes do transplante. Este protocolo mostrou-se bastante promissor para o tratamento de seqüelas neurológicas de cinomose canina.

Palavras-chave: Cinomose canina; células-tronco; desmielinização

Abstract

The neurologic sequels of canine distemper are currently considered irreversible, and are usually treated with palliative therapies when euthanasia is not recommended, what happens in the majority of severe cases. Aiming to develop a new therapeutic approach, we tested the systemic injection of allogeneic bone marrow mononuclear cells extracted from 5 healthy dogs, in 11 dogs with severe neurologic sequels with distemper previous diagnosis. 7 dogs had recent clinical manifestations and 4 had chronic signs. In the group of 7 animals with acute or recent sequels, 5 had complete remission of clinical signs and 2 had partial recovery. In the group with chronic sequels, 3 had visible recovery in the first week after transplantation, but 2 of them, after a short period of stability, presented again the same clinical signs seen before the transplantation. This protocol has demonstrated to be very promising for the treatment of neurologic sequels of canine distemper.

Keywords: Canine distemper; stem cell; demyelination

Introdução

A cinomose canina é uma doença infecto-contagiosa, causada por um *Morbilivirus* da Família *Paramyxoviridae*, semelhante ao vírus do sarampo (1; 2; 3; 4; 5) e da peste bovina (4; 5). A doença pode ter apresentações clínicas aguda, subaguda ou crônica, com manifestações cutâneas, gastroentéricas, oftálmicas, respiratórias e neurológicas (1; 5; 6).

Na maior parte das infecções o vírus da cinomose canina (VCC) atinge o encéfalo (3), podendo resultar em lesões degenerativas e/ou inflamatórias do Sistema Nervoso Central (SNC) (1). Os sinais clínicos de afecção do SNC pelo VCC são considerados de caráter permanente e incluem paraplegia, hiperestesia, tremores, deambulação em círculos, convulsões parciais e generalizadas e mioclonias (1), as quais, alguns autores consideram como patognomônicas de cinomose (6).

O prognóstico de cães infectados com o VCC depende das manifestações apresentadas, sendo extremamente reservado para casos agudos com sinais neurológicos (1; 5; 6). Até o presente momento, não existe tratamento consistente para este tipo de seqüela, podendo resultar, nos casos mais graves, em eutanásia (1). Contudo, Terapias com células-tronco adultas já foram testadas em diversos organismos vivos, alcançando-se bons resultados no tratamento de algumas doenças ou lesões, como diabetes insulino-dependente (7) e na reparação de processos inflamatórios crônicos (8) e de lesões musculares e neuronais (9; 10; 11; 12).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma alternativa ao tratamento de cães com cinomose, que apresentavam sinais clínicos de distúrbio neurológico, utilizando para isso, o transplante alógeno de células mononucleares da medula óssea de cães adultos sugerindo a hipótese da recuperação neurológica destes animais.

Materiais e métodos

Animais utilizados:

Foram utilizados como receptores 11 cães com seqüelas neurológicas com pré-diagnóstico de cinomose e 5 animais saudáveis como doadores da medula óssea.

Dos 11 cães tratados, 7 apresentavam manifestações clínicas agudas ou recentes da doença, dos quais 2 manifestavam paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, com diminuição ou ausência de resposta proprioceptiva (Figuras 1 e 2), 1, além destes sinais, pneumonia, conjuntivite e convulsões parciais, 1 gastroenterite, conjuntivite, pneumonia, convulsão e desidratação, 1, paraplegia e déficit de coordenação de membros pélvicos, com diminuição da resposta proprioceptiva e convulsões parciais com vocalização constante, 1, paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, sem nenhuma resposta proprioceptiva e convulsões parciais e 1, apenas mioclonias e anemia ferropriva. Quatro animais manifestavam sinais crônicos, há pelo menos 3 meses e por até 4 anos. Destes, 2 apresentavam paraplegia e incoordenação motora em membros pélvicos, 1 déficit de coordenação, ablespia e andar em círculos e 1 mioclonia.



Figura 1: Animal com seqüela recente de cinomose canina, apresentando paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, com visível atrofia muscular.



Figura 2: Animal com seqüela recente de cinomose canina, apresentando paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, com escoriações por decúbito.

Extração e purificação das células mononucleares:

As células mononucleares foram obtidas da medula óssea extraída por punção do escudo ilíaco dos cães doadores, após anestesia com a combinação do cloridrato de xilazina (Rompum - Bayer®) com a associação de cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoletil - Virbac®), sendo purificadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque 1119 and 1017, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) a 1000xG por 15 minutos. Após duas lavagens em meio RPMI (Sigma), as células foram re-suspendidas em salina, filtradas sobre lâ de nylon e contadas em câmara de Neubauer para ajustes de concentração.

Injeção das células mononucleares:

Doses entre $1,00 \times 10^8$ e $2,50 \times 10^8$ de células mononucleares de medula óssea foram injetadas, por via intravenosa, nos pacientes selecionados para o tratamento.

Resultados

Dos 7 animais com cinomose aguda ou recente, 5 apresentaram remissão completa dos sinais clínicos (Figuras 3, 4 e 5). Destes, apenas 2 não tiveram melhora completa, tendo seus responsáveis optado por eutanásia, um deles menos de 1 mês após o transplante e o outro, 2 semanas após um segundo transplante, sendo que este último apresentava ainda sinais associados a fase virêmica da doença, com pneumonia e conjuntivite severas. Dos animais com sinais crônicos, 3 apresentaram melhora visível na primeira semana após o transplante, contudo, 2 deles, após curto período de estabilidade, apresentaram novamente os mesmos sinais clínicos vistos antes do transplante. O animal que apresentava ablesia teve melhora dos outros sinais, mas não recuperou a visão.



Figura 3: Animal mostrado na figura 1, duas semanas após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, no entanto, o animal apresentava ainda déficit proprioceptivo.



Figura 4: Animal mostrado na figura 1, 42 dias após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, com recuperação completa da musculatura. O animal recuperou completamente a capacidade proprioceptiva.

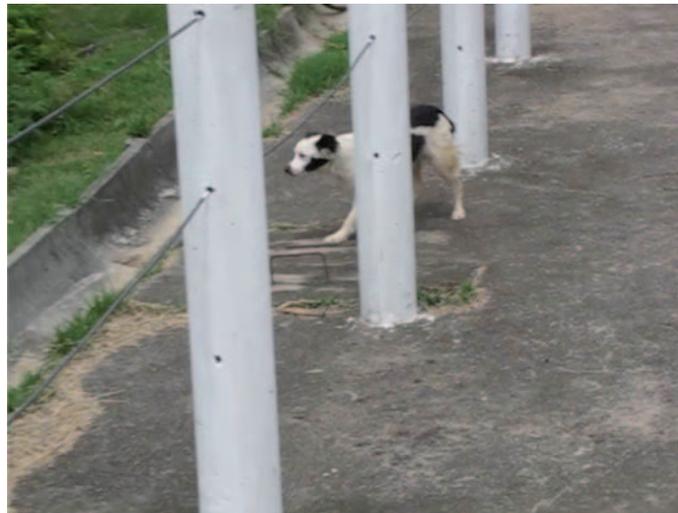


Figura 5: Animal mostrado na figura 2, 43 dias após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, com recuperação completa da musculatura. O animal recuperou completamente a capacidade proprioceptiva.

Discussão

A terapia com células-tronco em animais já se consagrou como opção de tratamento em lesões inflamatórias, sendo normalmente utilizada a injeção autóloga de células precursoras de tecido adiposo (13,14). Esta mesma abordagem foi utilizada no tratamento de esclerose múltipla humana, doença auto-imune neurodegenerativa com desmielinização dos neurônios análoga à que ocorre nas sequelas neuronais da cinomose canina (15). Entretanto, a injeção alogeneica de fração total de células mononucleares de medula óssea proporciona uma alternativa de baixo custo e alto rendimento de células por doador, fatores importantes no tratamento dos cães afetados, visto que estes são normalmente destinados à eutanásia.

O tratamento efetuado durante a fase virêmica da doença demonstrou ser ineficaz (dados não publicados), sendo este resultado condizente com o fato de que o vírus afeta negativamente as células precursoras circulantes (16).

A ausência de reação imune às células transplantadas em todos os cães tratados confirma a ação imunomoduladora das células precursoras hematopoiéticas, que são utilizadas para induzir tolerância imunológica em transplantes com probabilidade de rejeição (17). A opção terapêutica proporcionada pela injeção sistêmica de células mononucleares de medula óssea alogeneicas demonstrou ser, até o presente momento, uma opção segura e promissora para o tratamento das sequelas neurológicas de cinomose em cães. Mesmo no caso de injeções de doadores imunologicamente incompatíveis com os receptores, não houve casos de rejeição ao transplante ou de doenças auto-imunes, tais como a GVHD (18), ocasionadas pelo transplante alogeneico de medula óssea. Entretanto, na segunda etapa do experimento está sendo investigada a possível correlação entre compatibilidade imunológica de doador e receptor e os níveis de remissão dos sintomas apresentados após a injeção.

Diante dos resultados preliminares, este protocolo mostrou-se bastante promissor para o tratamento de sequelas neurológicas de cinomose canina.

Referências

1. SHERDING RG. Cinomose canina. In: BIRCHARD SJ, SHERDING RG (Eds.). Manual Saunders de clínica de pequenos animais. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 158-62.
2. QUINN PJ, DONNELLY WJC, CARTER ME, MARKEY BK. *Paramyxoviridae* In: Microbiologia Veterinária. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 372-9.
3. MORO L, ALVES CM, SANTOS FGA, MARTINS AS, VASCONCELOS AC. Apoptose na desmielinização da cinomose canina (Revisão de literatura). Biosci.J.; Uberlândia, 2004. 20(2): 171-8.
4. ZEE YC. Paramyxoviridae. In: HIRSH DC, ZEE YC. Microbiologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 374-8.
5. SWANGO LJ. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER SJ, FELDMAM EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstias do cão e do gato. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997, p.576-81.
6. HOSKINS JD. Doenças virais caninas. In: ETTINGER SJ, FELDMAM EC. (Eds) Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.440-6.
7. LOJUDICE FH, SOGAYAR MC. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. Ciênc saúde coletiva 2008; 13(1): 19.
8. SOARES MBP, LIMA RS, ROCHA LL, TAKYIA CM, CARVALHO LP, CARVALHO ACC, SANTOS RR. Transplanted bone marrow stem cell repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. Am J Path 2004; 164(2): 441-7.
9. STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, GATTERMANN N, HERNANDES A, SORG RV et al. Intracoronary human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. Dtsch Med Wochenschr 2001; 126: 932-8.
10. KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOFF D, WANG G et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med 2001; 7:430-6.
11. FUKADA S, MIYAGOE-SUZUKI Y, TSUKIHARA H, YUASA K, HIGUCHI S, ONO S, TSUJIKAWA K, TAKEDA S, YAMAMOTO H. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. Journal of Cell Science 2002; 115: 1285-93.
12. YAMAKAWA T, KAKINORI R, IKEGUCHI R, NAKAYAMA K, MORIMOTO Y, NAKAMURA T. Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. Cell Transplantation 2007; 16(8): 811-22
13. BLACK LL, GAYNOR J, GAHRING D, ADAMS C, ARON D, HARMAN S, GINGERICH DA, HARMAN R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. Vet Ther 2007;8:272-284.
14. BLACK LL, GAYNOR J, ADAMS C, DHUPA S, SAMS AE, TAYLOR R, HARMAN S, GINGERICH DA, HARMAN R. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. Vet Ther 2008, 9:192-200.
15. RIORDAN N H, ICHIM T E, MIN W P, WANG H, SOLANO F, LARA F, ALFARO M, RODRIGUEZ J P, HARMAN R J, PATEL A N, MURPHY M P, LEE R R, MINEV B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis Journal of Translational Medicine 2009, 7:29.
16. PILLET S, VON MESSLING V. Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. Journal of Virology, June 2009, p. 6279-6287.
17. PARKER M H, KUHR C, TAPSCOTT S J, STORB R. Hematopoietic cell transplantation provides an immune-tolerant platform for myoblast transplantation in dystrophic dogs. Mol Ther. 2008 July ; 16(7): 1340-1346.
18. ZORN J, HERBER M, SCHWAMBERGER S, PANZER W, ADLER H, KOLB HJ. Tolerance in DLA-haploidentical canine littermates following CD6-depleted marrow transplantation and donor lymphocyte transfusion. Exp Hematol. 2009 Aug; 37(8):998-1006.

Recebido para publicação em: 22/03/2010.

Enviado para análise em: 22/03/2010.

Aceito para publicação em: 30/03/2010.