



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ALEXANDRE LUIZ PEREIRA

USO SUBCONJUNTIVAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS  
EM PACIENTES CANINOS PORTADORES DE CERATITE SUPERFICIAL  
CRÔNICA: ESTUDO PILOTO.

CAMPINAS

2018

ALEXANDRE LUIZ PEREIRA

USO SUBCONJUNTIVAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS  
EM PACIENTES CANINOS PORTADORES DE CERATITE SUPERFICIAL  
CRÔNICA: ESTUDO PILOTO.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências Médicas, Área de Concentração  
Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO  
ALUNO ALEXANDRE LUIZ PEREIRA,  
E ORIENTADO PELO  
PROF. DR. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.  
**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5057-036>

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414u Pereira, Alexandre Luiz, 1972-  
    Uso subconjuntival de células-tronco mesenquimais alógenas em pacientes portadores de ceratite superficial crônica : estudo piloto / Alexandre Luiz Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

    Orientador: José Paulo Cabral de Vasconcellos.  
    Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

    1. Ceratite. 2. Medicina regenerativa. 3. Doenças autoimunes. 4. Células mesenquimais estromais. 5. Córnea. 6. Cães. I. Vasconcellos, José Paulo Cabral de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Subconjuntival use of allogeneic mesenchymal stem cells in canine patients with chronic superficial keratitis : a pilot study

**Palavras-chave em inglês:**

Keratitis

Regenerative medicine

Autoimmune diseases

Mesenchymal stromal cells  
Cornea

Dogs

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

José Paulo Cabral de Vasconcellos [Orientador]

João Marcello Fortes Furtado

Carla Fernanda Franco Penteadó

**Data de defesa:** 27-08-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**ALEXANDRE LUIZ PEREIRA**

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS**

---

## **MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS**
- 2. PROF. DR. JOÃO MARCELLO FORTES FURTADO**
- 3. PROF. DR<sup>a</sup>. CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO**

---

Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS MÉDICAS da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 27/08/2018**

---

## **DEDICATÓRIA**

**À MINHA FAMÍLIA,  
SEM O APOIO DE CADA UM,  
ESSA ETAPA NÃO SE REALIZARIA.**

## **AGRADECIMENTO**

**A DEUS,  
sustentador da vida,  
que nos permite aprender mais dEle próprio estudando e  
conhecendo as minúcias da criação.**

**À minha família,  
Priscila, esposa companheira e motivadora dos meus sonhos,  
filhos Lucas e Rafael,  
parceiros para todas as coisas da vida  
e que me perderam por algum tempo de suas vidas  
com minha ausência enquanto eu estudava,**

**Aos meus Pais João e Luce Léa,  
que sempre me apóiam e se realizam nas minhas realizações,**

**Ao meu irmão Dr. Marcus,  
parceiro para tudo que se pode precisar de um irmão e incentivador das  
minhas realizações,**

**Ao meu orientador  
Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos  
A mente mais entusiasta, avivada e motivadora que tive ao meu redor  
ensinando-me em todos esse anos.  
e que permitiu a união entre as profissões,**

**À colega Dr<sup>a</sup> Maura Bittencourt, sem a qual eu jamais alcançaria  
esta oportunidade na UNICAMP,**

**À Dr<sup>a</sup> Michele e Dr. João,  
proprietários do Laboratório Regenera Stem Cells, que também me  
apoiaram e patrocinaram esse projeto científico.**

**À Dra Bruna,  
do Laboratório Regenera Stem Cells, ajuda inestimável  
na revisão de literatura de células-tronco,**

**Ao colega Dr. Rodolfo Malago,  
me ajudando a entender os detalhes do ambiente científico,**

**Aos colegas Dr. Ricardo Pecora e Dr. Alexandre Taxa,  
que participaram como examinadores da pesquisa**

**Ao colega Dr. Edmur Bozzo,  
anestesista nos momentos de trabalho com os participantes,**

**À Marcinha, secretária da pós-graduação,  
sem sua orientação e ajuda eu não teria  
cumprido adequadamente todos os requisitos do programa,**

**Aos proprietários e seus animais que participaram  
entusiasmadamente da pesquisa,**

**À você, leitor,  
que é o alvo final deste material,  
minha maior alegria é transmitir o conhecimento adquirido.**

**“Não digas, pois, no teu coração:**

**A minha força e o poder do meu braço me adquiriram estas riquezas.**

**Antes te lembrarás do SENHOR teu Deus, porque é Ele que te dá força para  
adquirires riquezas...”**

**Dt.8:17-18a**



## RESUMO

**Objetivo:** A ceratite superficial crônica (CSK) é uma afecção ocular em cães que manifesta-se com perda de transparência corneana e conseqüentemente redução da acuidade visual. O seu controle demanda um tratamento por meio de medicação tópica administrado diariamente. A Medicina Regenerativa têm apresentado resultados promissores em diversos campos da medicina. De forma que neste estudo objetiva-se avaliar o efeito clínico de células-tronco mesenquimais (CTM) alogênicas de tecido adiposo aplicadas via subconjuntival em cães portadores de ceratite superficial crônica (CSK).

**Métodos:** Este é um estudo piloto do tipo caso controle envolvendo 8 cães diagnosticados com CSK. Os participantes foram divididos em 2 grupos, o grupo tratamento convencional (controle - 4 animais) recebeu Prednisona 1% na forma de colírio tópico três vezes por dia e o grupo experimental recebeu transplante de células-tronco mesenquimais alogênicas. Os cães não tinham sido previamente tratados para a CSK. Realizou-se exame sistêmico e oftalmológico para excluir outras doenças oculares ou sistêmicas. As células-tronco na ordem de  $1 \times 10^6$  foram injetadas via subconjuntival na região perilimbal nos tempos 0 e 30 dias. Os animais foram seguidos durante 110 dias para monitorar a progressão clínica da doença. Foram realizados sequencialmente imagens das anormalidades da córnea. As imagens foram analisadas no software ImageJ e a análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 7.0. Os dados pareados em cada grupo foram submetidos ao teste Wilcoxon e as comparações entre os grupos submetidas ao teste Mann-Whitney.

**Resultados:** A comparação das imagens iniciais e finais revelou que as áreas com neovascularização e infiltrado inflamatório regrediram na maioria dos olhos tanto no grupo controle como no grupo experimental ao final dos 110 dias,  $p = 0,0391$  e  $p = 0,0078$  respectivamente. O grupo experimental respondeu positivamente, porém, com menor manifestação de melhora clínica que o grupo controle ( $p = 0,0263$ ). As áreas com pigmentação aumentaram em ambos os grupos sem diferença estatisticamente significativa entre ambos ( $p > 0,99$ ). Algumas áreas de opacidade da córnea tornaram-se transparentes após o transplante de CTM. Não foram observados efeitos colaterais locais ou sistêmicos.

Conclusão: as células-tronco produziram melhora clínica em pacientes com CSK após 110 dias, aquém do tratamento convencional com corticoterapia tópica.

**Palavras-chave:** Medicina regenerativa, células-tronco mesenquimais, ceratite superficial crônica, doença auto-imune, cães, córnea.

## ABSTRACT

Objective Chronic superficial keratitis (CSK) is an ocular condition in dogs that manifests with corneal opacification. The control of this condition requires use of topical medication daily.. Regenerative Medicine has presented promising results in several fields of medicine. The aim of this study was to evaluate the clinical effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MTC) of adipose tissue applied via subconjunctival in dogs with chronic superficial keratitis (CSK).

Methods: A series of cases of 8 dogs diagnosed with CSK being seven females and one male. Divided into 2 groups, the conventional treatment group (4 animals) received Prednisone 1% as topical eye drops three times a day and the experimental group received allogeneic mesenchymal stem cell transplantation. The dogs had not previously been treated for CSK. Systemic and ophthalmologic examinations were performed to exclude other abnormalities. Stem cells on the order of  $1 \times 10^6$  were injected via subconjunctival in the peri-limbal region at 0 and 30 days. The animals were followed for 110 days to monitor the clinical progression of the disease. Images of the corneal abnormalities were sequentially performed. The images were analyzed in the ImageJ software and the statistical analysis was performed in the GrandPrism 7.0 software. The paired data in each group were submitted to the Wilcoxon test and the comparisons between the groups submitted to the Mann-Whitney test.

Results: Comparison of initial and final images revealed that areas with neovascularization and inflammatory infiltrate regressed in most eyes in both the conventional and experimental groups at the end of the 110 days,  $p = 0.0391$  and  $p = 0.0078$  respectively. The experimental group responded positively, however, with less manifestation of clinical improvement than the conventional group ( $p = 0.0263$ ). Areas with pigmentation increased in both groups with no statistically significant difference between the two groups ( $p > 0.99$ ). Some areas of opacity of the cornea became transparent after transplantation of CTM. No local or systemic side effects were observed.

Conclusion: stem cells produced clinical improvement in patients with CSK after 110 days, short of conventional treatment with topical corticosteroids..

**Keywords:** Regenerative medicine, mesenchymal stem cells, chronic superficial keratitis, autoimmune disease, dogs, cornea.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Descrição oficial da raça Pastor Alemão. _____	21
Figura 2. Pastor Alemão 5 anos. Olho direito clinicamente saudável _____	23
Figura 3. Pastor Alemão 4 anos. Olho direito afetado com CSK ativa. _____	26
Figura 4. <i>Pellet</i> de CTM formado no fundo tubo após centrifugação _____	56
Figura 5. Figura 5. <b>A</b> - Local e forma de aplicação subconjuntival da CTM. <i>seta</i> = posição da agulha; <b>B</b> Aparência após aplicação _____	56
Figura 6. Imagem de citologia esfoliativa demonstrando células estratificado queratinizado. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento 100x _____	58
Figura 7. Grupo experimental. Participante #1. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. _____	69
Figura 8. Figura 7. Grupo experimental. Participante #2. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. Imagem G: linha amarela = córnea total (100%), linha azul = córnea afetada e linha verde = área pigmentada. _	70
Figura 9. Grupo experimental. Participante #3. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. _____	71
Figura 10. Grupo experimental. Participante #4. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. _____	72

- Figura 11. Grupo tratamento convencional. Participante A. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. Proprietário não compareceu no retorno planejado aos 30 dias e C e D aos 110 dias de seguimento. \_\_\_\_\_ 73
- Figura 12. Grupo tratamento convencional. Participante B. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. \_\_\_\_\_ 74
- Figura 13. Grupo tratamento convencional. Participante C. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. \_\_\_\_\_ 75
- Figura 14. Grupo tratamento convencional. Participante D. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. \_\_\_\_\_ 76

## LISTA DE TABELAS e GRÁFICOS

- Gráfico 1. As avaliações por grupo dos 3 examinadores, sem diferença estatística entre seus valores ( $p = 0,5474$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_63
- Gráfico 2. Comparação entre os grupos no dia 0, sem diferença estatística entre seus valores ( $p = 0,2786$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_63
- Gráfico 3. Grupo experimental: áreas lesadas. Comparação entre os dias de seguimento. Sem diferença estatística entre dia 0 e dia 30 ( $p=0,25$ ) e com diferença estatística (\*) entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,0078$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_64
- Gráfico 4. Grupo experimental: áreas pigmentadas. Comparação entre os dias de seguimento. Sem diferença estatística entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,25$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_64
- Gráfico. 5. Grupo Tratamento convencional: áreas lesadas. Comparação entre os dias de seguimento. Com diferença estatística (\*) entre dia 0 e dia 30 ( $p=0,0313$ ) e com diferença estatística (\*\*) entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,0391$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_65
- Gráfico. 6. Grupo Tratamento convencional: áreas pigmentadas. Comparação entre os dias de seguimento. Sem diferença estatística entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,3828$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_65
- Gráfico. 7. Comparação entre os grupos no dia 30, com diferença estatística (\*) entre seus valores ( $p = 0,0426$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ . \_\_\_\_\_66

Gráfico 8. Comparação entre os grupos no dia 110, com diferença estatística (\*) áreas afetadas e pigmentadas e qualitativas de densidade e área \_\_\_\_\_66

.

Tabela.1. Grupo experimental. Medidas quantitativas das áreas afetadas e pigmentadas e qualitativas de densidade e área. \_\_\_\_\_68

Tabela.2. Grupo tratamento convencional. Medidas quantitativas das grupos experimental e convencional respectivamente. \_\_\_\_\_69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -HSD1=	11 $\beta$ -hidroesteroide-desidrogenase 1
Anexina A1	(proteína de ligação a fosfolípídeo – cálcio dependente)
AP-1	ativador proteico tipo 1
ATP=	Adenosina tri-fosfato
CD=	Do inglês “cluster of differentiation” proteína marcadora de membrana celular
CsA=	Ciclosporina A
CSK=	Do inglês <i>Chronic Superficial Keratitis</i> , ou Ceratite superficial crônica
CTM=	Células-tronco mesenquimais
DC=	células dendríticas
DMSO=	Dimetil-sulfóxido
DNA=	Ácido desoxi-ribonucleico
GILZ=	Proteína induzida por glicocorticóide – zíper de leucina
GM-CSF=	Fator de estímulo ao crescimento de monócitos e granulócitos
GR=	Receptor de glicocorticóide
IL-=	Interleucina tipo-
INF- $\gamma$ =	Interferon-gama
ISCT=	International Society for Cellular Therapy
MHC II=	Complexos de Histocompatibilidade Classe II
min=	minutos
ml=	mililitros
mm=	milímetros
MMP-=	Metaloproteinase tipo-
NF-AT=	fator nuclear de células T ativadas

NF- $\kappa$ B=	fator nuclear kappa-B
PBS=	Solução salina balanceada
STT=	teste de lacrimal de Schirmer
Th=	Linfócito T help tipo-
T <sub>regs</sub>	células T reguladoras
UNICAMP=	Universidade Estadual de Campinas
UV=	Ultra violeta

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
	REVISÃO DA LITERATURA	22
	JUSTIFICATIVA	48
	OBJETIVOS	49
2.	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.	RESULTADOS	57
4.	DISCUSSÃO	77
5.	CONCLUSÃO	81
6.	REFERÊNCIAS	82
7.	APÊNDICES	93
8.	ANEXO	95

## 1. INTRODUÇÃO

A presente investigação se fez no âmbito da Medicina veterinária, com ênfase na área da oftalmologia de cães (*Canis lupus familiaris*) e atentando-se para a raça Pastor Alemão, conforme descrição oficial internacional. (Figura 1).

**CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA**  
Fédération Cynologique Internationale

 **GRUPO 1** 

**Padrão FCI Nº 166**  
**23/12/2010**

**Padrão Oficial da Raça**  
**PASTOR ALEMÃO**  
**(DEUTSCHER SCHÄFERHUND)**



Esta ilustração não representa necessariamente o exemplo ideal da raça.

Figura 1. Descrição oficial da raça Pastor Alemão. Fonte: <http://clubepastoralemao.com/index.php/a-raca/padrao-oficial-da-raca-pastor-alemao-fci>

## 1.2. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1 FISILOGIA DA CÓRNEA

Baseando-se na anatomofisiologia da córnea, incluindo nos cães, torna-se claro que as enfermidades nela sediadas podem conduzir a deficiências visuais importantes, ou mesmo à cegueira nos casos mais graves<sup>1</sup>.

A córnea é a estrutura limitante da porção anterior do bulbo ocular. Constitui o principal meio refringente do olho, respondendo por cerca de 80% do poder total de refração; é por onde os raios luminosos penetram no olho para chegar à retina<sup>2</sup>. O desempenho das funções da córnea depende da integridade de toda a sua estrutura<sup>3</sup>.

A córnea do cachorro é um tecido transparente, avascular, elíptico, com diâmetro horizontal maior que o vertical em proporções que variam entre as espécies. A espessura também é muito variável, mas no cão tem em média 0,6mm no centro e 0,95 mm nas extremidades, sendo o canto temporal superior o mais espesso<sup>4</sup>.

Suas principais funções são: refração e transmissão da luz, dependentes da sua curvatura e transparência, e suporte dos conteúdos intra-oculares. O epitélio corneal, em conjunto com o filme lacrimal, contribui para a manutenção da superfície opticamente regular da córnea<sup>5,6</sup>.

A transparência corneal é mantida pela ausência de vasos sanguíneos, superfície epitelial não queratinizada, ausência de pigmentação, organização e tamanho das fibras de colágeno e por sua deturgescência<sup>1</sup> (Figura 2).

A córnea pode ser dividida em 4 ou 5 camadas, dependendo da espécie: epitélio, membrana de Bowman (apenas nas aves e nos humanos), estroma, membrana de Descemet, e endotélio<sup>7</sup>.



Figura 2- Pastor Alemão 5 anos. Olho direito clinicamente saudável

O estroma compreende 90% da espessura da córnea. Consiste de fibrócitos, ceratócitos, que são células fusiformes derivadas da crista neural, colágeno e substância fundamental<sup>8</sup>. A organização uniforme das camadas de colágeno é o fator mais importante na manutenção da transparência. Um espaçamento regular das fibrilas em camadas entrelaçadas e planas, produzindo lamelas que se sobrepõem, orientadas paralelamente à superfície corneal, permite que a luz passe sem interferência destrutiva. Cinco tipos de colágeno são encontrados nos estroma: tipos I, III, V, VI e XII, e entrelaçados com estes também se encontram glicosaminoglicanos, as glicoproteínas que dão suporte estrutural à córnea. O estroma é relativamente desidratado, característica esta devida à integridade do epitélio, à sua diferença osmótica com o filme lacrimal, e pela ação do endotélio, que ativamente retira água da córnea<sup>9</sup>.

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio e aumenta de espessura com a idade. É muito elástica sendo a proteção mais profunda da córnea. Não é corada pela fluoresceína e é formada por colágenos tipos I, III, IV, V, VI e VIII, sendo que estes dois últimos conferem sua aderência ao estroma<sup>10</sup>.

O endotélio é formado por uma única camada de células hexagonais, derivadas da crista neural, revestindo a câmara anterior do olho. Devido a sua limitada capacidade de divisão mitótica, os defeitos no mosaico endotelial são recobertos por expansão das células adjacentes. A densidade normal em cães é de aproximadamente 2.800 céls/mm<sup>2</sup> (7). Notadamente, até 80% da população de células endoteliais podem ser perdidas antes de ocorrer hidratação e perda de transparência corneal. No entanto em cães jovens o endotélio tem considerável capacidade de regeneração, reparando em 6 semanas até 90% das células lesadas<sup>11</sup>. Com o avançar da idade o número de células diminui, traumas cirúrgicos e inflamações intraoculares contribuem para a perda celular<sup>7,11</sup>.

Os mecanismos de defesa da superfície ocular incluem a presença de filme lacrimal homogêneo com seus componentes antibacterianos (lisozima, beta-lisina, lactoferrina, entre outros), incursões palpebrais eficientes e epitélio íntegro e estável. A existência da microbiota normal inibe o crescimento de patógenos, seja por competição, seja por liberação de substâncias com propriedades



antibióticas<sup>12</sup>. Somado a isto, o limitado acesso dos anticorpos humorais e de linfócitos citotóxicos torna a córnea um local de “privilégio imunológico”<sup>13</sup>.

Este “privilégio” deve-se a fatores como avascularidade, que limita o acesso de mediadores inflamatórios e imunes no segmento anterior do olho, carência de células apresentadoras de antígeno ativadas na região central, ausência de vasos linfáticos e presença de citocinas imunomoduladoras locais que suprimem a inflamação e a ativação do sistema complemento. Há também, na câmara anterior, na face posterior da córnea um sistema complexo mediado por citocinas e células adaptadas chamado Desvio imunológico associado à câmara anterior (ACAID), que faz controle especializado das respostas imunes aos antígenos que possam chegar no ambiente intraocular<sup>14,15</sup>. Assim, antígenos da superfície ocular são processados somente pela conjuntiva e trato uveal, representando estes, centros linfóides ativos do bulbo ocular<sup>13</sup>.

No entanto, nas formas mais graves de lesão, como na Ceratite ulcerativa, Ceratoconjuntivite seca e Ceratite superficial crônica (CSK do inglês - *Chronic Superficial Keratitis*) (Figura 3), o privilégio imunológico aparentemente é perdido o que induz uma resposta angiogênica com o aparecimento de neovasos que se estendem centripetamente na córnea<sup>16,17,18,19</sup>.

Inflamação grave e vascularização estão comumente associados à pigmentação estromal. O pigmento no epitélio corneal surge da camada basal, que é da mesma origem embriológica da camada que naturalmente contém pigmento na conjuntiva. A pigmentação epitelial é uma resposta inespecífica da inflamação da córnea e mais comum nas doenças crônicas, em especial quando exposição, irritação, ou xerose (ressecamento) que induzem no tecido normal um processo de metaplasia escamosa adaptativa. Pigmentação profunda se origina a partir da proliferação dos melanoblastos límbicos normais que migram para o interior do estroma durante a inflamação<sup>20</sup>. Embora os neovasos possam ocorrer em qualquer parte da córnea, na CSK, localiza na porção anterior do estroma<sup>21</sup>.

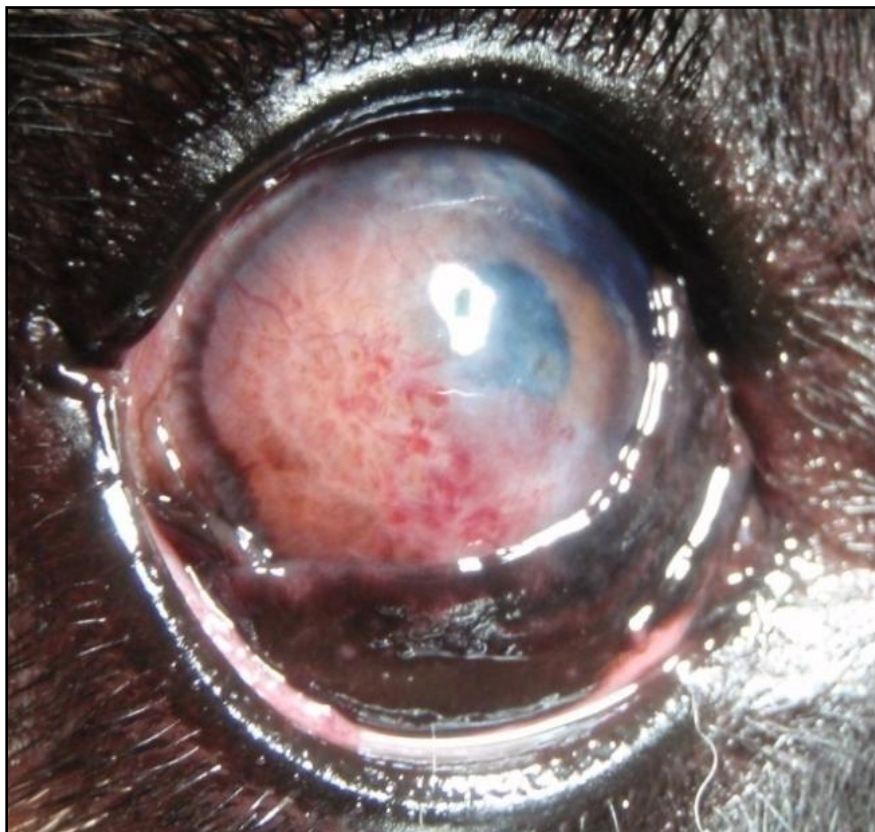


Figura 3. Pastor Alemão 4 anos. Olho direito afetado com CSK ativa;

### 1.2.2. CERATITE SUPERFICIAL CRÔNICA

Esta doença tem diversos nomes: síndrome de Überreiter, ceratite superficial crônica e “pannus” (que significa vascularização inespecífica de tecido avascular). A doença não é restrita à córnea e não é superficial<sup>7</sup>, porém é uma doença crônica, inflamatória e não ulcerativa do estroma superficial corneano, que causa danos significativos e comprometimento visual em cães<sup>22</sup>. Esta condição é particularmente comum em galgos, pastores alemães e pastores belgas, Greyhounds, mas outras raças também podem ser afetadas<sup>23,24</sup> e aparenta ter características herdáveis<sup>25</sup>.

Embora a etiologia não esteja esclarecida, correlações clínicas, histológicas e imunológicas reforçam conjuntamente tratar-se de uma condição imunomediada<sup>26</sup> e evidências epidemiológicas demonstram que ocorre maior agressividade e maior resistência ao tratamento conforme os animais vivem em regiões com maior altitude em relação ao nível do mar<sup>27</sup> (Chavkin, 1994). Sugere-se assim a participação da radiação ultravioleta na origem da doença que causando alteração da antigenicidade tecidual resulta em inflamação mediada por células<sup>7,23,28,29</sup>.

Clinicamente a lesão apresenta-se como bilateral não simétrica, com o infiltrado inflamatório começando a partir da região temporal inferior do limbo em direção ao centro da córnea. Caracteriza-se por uma infiltração de tecido fibrovascular na córnea, que se torna avermelhada devido à neovascularização com perda da transparência ao redor destes. Não há regressão espontânea das alterações da superfície ocular. O surgimento de áreas pigmentadas varia com a severidade e cronicidade da progressão das lesões. Em estágios precoces, as células do epitélio proliferam-se e o estroma superficial é infiltrado por plasmócitos e linfócitos<sup>7,18</sup>. Com o progresso da doença, melanócitos, histiócitos e fibrócitos adentram a córnea, ocorrendo edema e neovascularização. Em estágios avançados, o epitélio e o estroma anterior tornam-se pigmentados e vascularizados e o epitélio pode apresentar-se queratinizado, apesar de não se corar com a fluoresceína<sup>7</sup>.

Deve-se diferenciar da ceratite pigmentar decorrente de irritação crônica, pela prega nasal, triquíase, distiquíase e outras alterações de anexos oculares, da ceratoconjuntivite seca, e da granulação tecidual presente na cicatrização vascularizada de feridas corneais crônicas<sup>7</sup>.

Diversas alterações podem ocorrer simultânea ou seqüencialmente: a neovascularização que se inicia na região do limbo temporal inferior, de forma gradual, amplia-se para o centro da córnea, e os outros quadrantes também podem ser afetados. Pontos pequenos esbranquiçados algumas vezes podem ocorrer no estroma transparente 1 a 3 mm à frente da lesão em progresso e são reconhecidos como o início do infiltrado celular e edema<sup>7,23,30</sup>.

Além disso, também pode ocorrer despigmentação e espessamento da superfície externa da terceira pálpebra, usualmente próximos à margem, dando ao olho a aparência de inflamação ativa, que apesar de não ter significado clínico, pode contribuir para alterar a secreção ocular. Nos casos prolongados também pode se desenvolver depósito lipídico no estroma adjacente à borda da lesão<sup>7,26</sup>. A idade e raça dos animais afetados têm significância prognóstica, em animais jovens (até 5 anos de idade) a condição geralmente progride para lesões graves e rápidas, visto que em animais afetados mais velhos as lesões são menos intensas e lentas. Da mesma maneira, animais que vivem em baixas altitudes respondem mais favoravelmente à terapia<sup>7</sup>.

Posteriormente, Williams, (1999)<sup>(18)</sup>, observou que a migração de células que invadem a córnea mantém uma sequência caracterizada por um denso infiltrado inflamatório na córnea superficial lesada. A região do estroma profundo é quase que totalmente livre desta infiltração. Os linfócitos persistem desde o início do quadro clínico mantendo-se como o tipo predominante em toda a extensão da lesão. Além disso, fibroblastos e fibrócitos são encontrados em um número significativamente alto na área lesada se comparados com a córnea normal. A presença de macrófagos, e uma pequena população de neutrófilos foram observados tardiamente na lesão já estabelecida e estão associados com o desenvolvimento da neovascularização<sup>18,26</sup>.

As características imunológicas inflamatórias da CSK demonstram uma predominância de linfócitos CD4+, confirmando a proposição de se tratar de uma doença auto-imune.

Estudos imunohistoquímicos usando anticorpos monoclonais contra Complexos de Histocompatibilidade Classe II (MHC II) demonstraram que a estrutura imune da córnea normal não apresenta expressão gênica destes na camada epitelial. Os ceratócitos do estroma apresentam baixa expressão do MHC II à semelhança das células dendríticas no limbo e no epitélio conjuntival. Entretanto, em córneas afetadas há um aumento progressivo da marcação imunofluorescente nos limites do processo inflamatório mostrando várias células estromais e epiteliais positivas; aumentando a marcação na direção do centro da lesão,. Outra observação é que muitas células com atividade ATPase positiva tinham morfologia característica de células de Langerhans<sup>23</sup>.

A córnea era considerada privilégio imunológico devido à suposta ausência de células apresentadoras de antígenos na sua estrutura, mas estudos recentes demonstram haver um número significativo destas células no epitélio e estroma anterior da córnea, enquanto que a porção posterior do estroma contém macrófagos<sup>14,31</sup>. A ausência da expressão de MHC classe II no epitélio da córnea central foi por algum tempo considerado como parte importante dos mecanismos do privilégio. Acreditava-se que a manifestação do MHC II era o evento primário em condições auto-ímmunes, porém novas pesquisas têm mostrado ser uma manifestação secundária. Neste novo conceito, se os MHC II não são o instrumento da gênese da lesão inflamatória na CSK, aceita-se que são parte importante da perpetuação do processo. Na córnea as células apresentadoras de antígenos são reconhecidas como as células de Langerhans, estão em concentração decrescente da conjuntiva, limbo e periferia da córnea até o centro da córnea e, no epitélio, seus corpos celulares estão situados na camada basal de onde formam projeções por entre as células em direção à superfície, indo até a camada de células aladas e parando próximo das *tight junctions* entre essas células<sup>31</sup>. A migração destas células para o centro da córnea já foi comprovado como tendo participação em rejeição de transplantes e expressam MHC II da mesma forma que as células epiteliais lesadas<sup>14,23</sup>.

Outro estudo demonstrou a correlação entre tempo/dose de radiação UV e as enzimas metaloproteinases (MMP). Confirmou-se que há aumento da atividade das MMP-2 e MMP-9, notadamente no epitélio corneano dos portadores da CSK. As células inflamatórias, macrófagos, neutrófilos e linfócito T também produzem MMPs de forma que parece haver um reforço positivo entre os tecidos da córnea e as células inflamatórias perpetuando a degradação da matrix extracelular e conservando a neovascularização<sup>32</sup>.

## TRATAMENTO

A terapia da CSK tem por base controlar a reação inflamatória e seus processos como o edema, a vascularização e evitar a pigmentação cicatricial. As lesões podem estar bem avançadas antes de serem notadas pelos proprietários e podem acometer uma grande área da córnea levando a déficit visual.

A CSK é tida, atualmente, como um distúrbio corneal progressivo crônico que não pode ser curado, mas sim controlado, de modo que a cegueira raramente ocorre. O proprietário deve ser informado de que a terapia se faz necessária por toda a vida e que o tratamento varia em função de cada paciente, da gravidade da lesão e da região geográfica onde vivem<sup>7</sup>.

A primeira escolha utiliza corticosteróides tópicos (dexametasona a 0,1% ou prednisona a 1%) instilados quatro a seis vezes ao dia<sup>33</sup>. A freqüência de aplicação, potência e concentração dos esteróides podem ser ajustadas para a resposta terapêutica. Respostas terapêuticas baixas ocorrem em animais que vivem em regiões montanhosas, porém, a maioria dos pacientes mantém capacidade de visão preservada apenas com terapia tópica. Posteriormente, para potencializar os efeitos ou facilitar a terapia em animais indolentes, pode-se realizar injeção subconjuntival de corticosteróides como acetato de betametasona e fosfato dissódico de betametasona. O glaucoma e a catarata, que são os efeitos colaterais descritos em humanos, não ocorrem em cães, permitindo uso

prolongado desses protocolos. Nos casos resistentes também se pode associar corticosteróides sistêmicos, prednisolona 1mg/kg, 1x ao dia até remissão da inflamação ocular<sup>7</sup>.

Concomitantemente, outros estudos demonstraram resultados benéficos através do uso isolado de terapia imunomoduladora ou associação desta com corticosteroides. Três fármacos imunossupressores reportaram resultados promissores para o tratamento das doenças auto-imunes e já evidenciaram efeito imunomodulador, reduzindo a neovascularização da CSK, e mantendo a doença sob controle enquanto administrado, são estes: ciclosporina A<sup>33</sup>, pimecrolimus<sup>28</sup>, tacrolimus com e sem associação de Dimetil-sulfóxido (DMSO)<sup>22,30</sup>, e seus mecanismos de ação são seletivos às células T e às células apresentadoras de antígenos<sup>28,30</sup>.

O que se observa na literatura, com estes protocolos de tratamento, aponta para um padrão clinicamente semelhante, onde há controle e regressão da neovascularização em poucas semanas, oferecendo ganho da capacidade visual aos animais. Nestes tratamentos, a pigmentação cicatricial apresenta resposta variável, ora regredindo ou expandindo a área acometida, ora apenas variando a densidade do pigmento, de tal forma inconsistente que não há correlação clínica interpretável entre fármaco e resposta obtida<sup>22</sup>.

Nos casos refratários ou crônicos onde já ocorreu pigmentação extensa e prejuízo significativo na capacidade visual, a associação com procedimentos cirúrgicos é uma alternativa possível. A Ceratectomia lamelar superficial da área afetada pode ser realizada, e considerando-se a espessura removida, até o máximo de três procedimentos ainda permite manter a resistência necessária da córnea. Cada tentativa tem a intenção de estender o período entre ceratectomias, associada a antibióticos tópicos por 9 a 12 dias até que o estroma seja recoberto por epitélio e depois mantida com a terapia médica já descrita<sup>7</sup>.

Uma possível ferramenta terapêutica, apesar das limitações de disponibilidade desses recursos, vê-se que na literatura também há descrições da técnica cirúrgica interligada com aplicação de radioterapia com raios-X, e com estrôncio-90, produzindo efeitos benéficos em períodos de tempo mais longos<sup>34</sup>.

Alternativamente, houve a experimentação clínica com lentes de contato com capacidade de bloquear raios UV solares, o estudo se alongou por 6 meses e concluiu que não houve resultado clínico positivo<sup>29</sup>.

### 1.2.3.. FARMACOLOGIA

A CSK permanece como uma doença de etiologia desconhecida e sem tratamento que promova a cura. Pode-se assim, considerar que o conhecimento translacional entre as ciências médicas de base e as ciências aplicadas, através das diversas características histológicas e imunológicas já associadas à doença favoreça o desenvolvimento de novos protocolos. Dessa forma, descreveremos sucintamente, os mecanismos de ação dos fármacos já utilizados para a CSK, imaginando que o entendimento destes modos de ação nas células dos olhos dos animais doentes, ofereça à ciência o caminho para encontrar a “peça do quebra-cabeça” que solucionará a CSK.

#### Corticosteróides

Desde a descoberta de glicocorticóides na década de 1940 e o reconhecimento de seus efeitos antiinflamatórios, seu uso para doenças autoimunes se tornou um dos mais efetivos e utilizados métodos terapêuticos. Entretanto sua eficácia clínica é comprometida pelos efeitos metabólicos causados pelo uso prolongado. Então, o entendimento dos seus mecanismos de ação permitirá controlar seus efeitos, equilibrando os resultados benéficos e indesejados<sup>35</sup>.

Na década de 1990, reconheciam-se as ações dos corticosteróides como indutores de linfopenia, por alterar sua recirculação e causar morte celular. O mecanismo imunossupressivo, que ocorria nas células T por inibição na produção



de citocinas e seus efeitos, atuava por processos intracelulares e eram considerados diferentes daqueles da via realizada pela ciclosporina<sup>36</sup>.

Naturalmente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal libera corticóides naturais (cortisol e corticosterona) em um ciclo circadiano e seus níveis basais mantém o estado de tônus celular em todo organismo<sup>37</sup>. Conjuntamente, relacionou-se que as citocinas são potentes ativadores deste eixo e podem permanentemente programar a liberação hormonal<sup>38</sup>. Quando estes hormônios naturais ou os hormônios sintéticos, disponíveis no plasma, adentram as células, a enzima 11 $\beta$ -hidroesteroide-desidrogenase 1 (11 $\beta$ -HSD1) prontamente os converte em esteróides ativos, capazes de se ligar ao seu receptor. O conhecimento dessa enzima tem direcionado estudos paralelos sobre resistência insulínica, obesidade e demais doenças metabólicas<sup>39</sup>.

Com novos estudos, já se observou influência dos glicocorticóides no ciclo celular, movimento celular, controle da glicose e regulação de fluidos<sup>40</sup>.

O Receptor de glicocorticóide (GR) é uma proteína de ligação ao DNA que regula o início da transcrição genética<sup>41</sup>. Pertencente ao grupo dos Receptores nucleares da subfamília 3 grupo C, e por isso recebe a identificação NR3C1, a posição normal do GR é no citoplasma celular até ocorrer ligação com corticóide, quando então é deslocado para o núcleo celular<sup>40</sup>. Várias das ações imunossupressoras dos glicocorticóides são mediadas direta ou indiretamente pelo GR, os quais, alterando a transcrição de numerosos genes, têm ação estimulatória ou inibitória. Notadamente, os glicocorticóides causam, nas células do sistema imune, repressão na transcrição de genes que codificam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão celular e enzimas envolvidas no início e/ou na manutenção da resposta inflamatória<sup>42</sup>. Também se sabe, que seus efeitos se dão pela interferência da sinalização feita pelos reguladores inflamatórios NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa-beta) e AP-1 (ativador protéico tipo 1)<sup>43</sup>. Entende-se assim, que os glicocorticóides inibem vários dos eventos iniciais da resposta imune e também promovem a resolução do processo inflamatório, apesar de até o momento, esses últimos mecanismos terem sido pouco relevados nas pesquisas<sup>35</sup>.

A ação dos GR também induz genes de IL-10, que é um potente imunomodulador. É através da estimulação de GILZ (proteína induzida por glicocorticóide – zíper de leucina) que o GR parece inibir as ações do NF- $\kappa$ B e AP-1<sup>44</sup>.

O GR é expresso em todas as células do organismo, incluindo sistema imune, e os efeitos dos glicocorticóides dependem do estado de diferenciação e ativação da célula. As especificidades do GR variam em cada tipo celular, incluindo a capacidade de remodelar a conformação da cromatina expondo áreas silenciosas do DNA<sup>45</sup>.

Nas células T a diminuição da Anexina A1 (proteína de ligação a fosfolípido – cálcio dependente) pelos glicocorticóides, sugere a possibilidade de que a regulação nas células do sistema imune inato e adaptativo pode estar relacionada com o estado de ativação/diferenciação das células mais do que com uma regulação direta<sup>35</sup>. Na fase imatura as células T são duplamente negativas na expressão de CD4 e CD8, e sofrerão maturação para positividade de um destes marcadores, porém as células duplamente positivas são altamente sensíveis à apoptose induzida por glicocorticóides<sup>46</sup>. A ação direta dos glicocorticóides nas células T CD4+, na presença de vitamina D<sub>3</sub> induz secreção de IL-10 pela células T reguladoras (T<sub>regs</sub>), capazes de regular as resposta Th1 e autoimunidade<sup>47</sup>.

Os efeitos imunossupressivos do GR são resultado de múltiplos mecanismos, os quais, além do estado celular, são dependentes também do tipo celular e do estímulo envolvido<sup>35</sup>.

Tanto quanto afetando profundamente a função celular, o GR também altera a programação de diferenciação celular nas células mielóides progenitoras<sup>48</sup> e sob condições de estresse crônico, pode, provavelmente mudar a forma como a resposta imune se desenvolve<sup>49</sup>. Esse mecanismo é relevante na indução de tolerância periférica.

As células dendríticas (DC) são a chave para apresentação de antígenos, fazendo a ponte de ligação entre o sistema imune inato e adaptativo. São reconhecidas como maduras quando capturando antígenos, processam, migram

para os órgãos linfóides e interagem com células T imaturas. Os glicocorticóides não atuam meramente inibindo a atividade das DC, mas reprogramando-as para a condição de “células dendríticas tolerogênicas”, as quais podem induzir o estado de hipo-responsividade nas células T e a formação de células T<sub>reg</sub>. A indução de tolerância nas DC também é dependente da ação da GILZ, mas todos os mecanismos intrínsecos ainda não são claros. Observou-se também que a enzima 11β-HSD1 está em níveis maiores nas DC imaturas, provavelmente suprimindo uma estimulação inadequada<sup>50</sup>.

Nos estudos da superfície ocular o uso terapêutico dos corticóides é amplo, incluindo cirurgias de transplante (em humanos), ceratoplastias, e doenças associadas a inflamação e neovascularização corneanas, mas os mecanismos de ação em cada tipo celular ainda não estão totalmente caracterizados. O GR é detectável em todas as camadas da córnea, mas com robusta expressão nas células epiteliais<sup>40</sup>. Recentemente, Kadmiel, 2016, demonstrou que na córnea, semelhante às células do sistema imune, o uso de dexametasona tópica por 6 horas induziu a expressão de GILZ. Neste estudo, curiosamente, pode-se verificar a magnitude desses mecanismos onde, apenas no epitélio corneano, foram identificados 4439 genes alterados pela presença de glicocorticóides, dos quais 2046 genes foram estimulados e 2393 genes foram inibidos. Mais especificamente, 679 genes envolvidos na motilidade celular, 1135 genes para crescimento e proliferação, 1002 genes relacionados com desenvolvimento celular, 918 genes para sobrevivência e morte celular e 685 genes envolvidos na morfologia das células do epitélio corneano. Foi elucidado que o GR estimula a formação das proteínas *tight junctions*, melhorando a barreira epitelial, mas paralelamente, induz inibição na migração celular, retardando a reparação de um defeito epitelial.

Nota-se dessa forma, que os glicocorticóides são ativos na córnea e atuam tanto nas células próprias do tecido, como também nas células inflamatórias que estejam permeando cada camada corneana. Essa ação conjunta objetiva modular as reações celulares e os processos quimiotáticos na tentativa de recuperar a homeostasia local.

## Imunomoduladores

A Ciclosporina A (CsA) foi originariamente isolada em 1970 como um metabólito do fungo *Tolypocladium inflatum Gams*<sup>51</sup>. A CsA é o primeiro fármaco imunossupressor, não citotóxico, que age especificamente inibindo a ativação de linfócitos T, através de bloqueio da liberação de citocinas, sem mielotoxicidade concomitante. A CsA não inibe a migração de leucócitos e não tem efeito significativo sobre linfócitos T citotóxicos. O mecanismo de ação específico é reversível e poupa a resistência não-específica, ou seja, os monócitos, macrófagos e neutrófilos mantendo ativas as suas capacidades e funções biológicas<sup>52</sup>.

A principal ação consiste na supressão da produção de linfocinas pelas células *T-helper*, interferindo na ativação dos genes para estas linfocinas, e direta ou indiretamente, reduzindo a expressão de receptores para IL-2 e IL-4 nos linfócitos em processo de ativação<sup>53</sup>.

A CsA liga-se a uma classe de proteínas citoplasmáticas denominadas imunofilinas, que fazem a transdução de sinais de superfície para o núcleo das células. O efeito imunossupressor ocorre devido à formação de um complexo entre a ciclosporina e seu receptor específico, a ciclofilina, que quando formado, une-se a outra proteína, a calcineurina A. Ocorre inibição de sua atividade fosfatase, necessária para a desfosforilação da proteína citosólica reguladora, denominada *fator nuclear de células T ativadas* (NF-AT), a qual após a remoção do fosfato (desfosforilação) seria transportada ao núcleo da célula, onde induziria vários genes específicos para citocinas e seus receptores. Portanto, a ciclosporina inibe a via de transdução de sinais e a ativação transcricional das citocinas dependentes da NF-AT, essenciais para a proliferação e função das células T<sup>54</sup>.

Os macrolídeos com propriedades imunossupressoras foram descobertos na década de 1980 e dentro do processo de desenvolvimento dessa classe de medicamentos, sintetizou-se o pimecrolimus, macrolídeo derivado da ascomicina,

uma das substâncias monolactâmicas produzidas pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus*. Seu mecanismo de ação, à semelhança dos demais macrolídeos imunomoduladores, está relacionado à inibição da calcineurina via macrofilina-12, a principal imunofilina presente no citosol de humanos<sup>55,56,57</sup> e apresenta as seguintes ações: inibe a síntese de IL pelas células Th1, como IL-2 e interferon gama; bem como a síntese de IL pelas células Th2, como IL-4, IL-10<sup>56</sup>.

O tacrolimus foi descoberto em 1987 por pesquisadores japoneses que detectaram a produção de um macrolídeo com propriedades imunossupressoras isolado de uma bactéria denominada *Streptomyces tsukubaensis*. O tacrolimus ao se ligar à calmodulina, inibe a síntese de calcineurina nos linfócitos, células dendríticas, basófilos e eosinófilos. As ações imunológicas que se seguem foram observadas em estudos experimentais e *in vitro*, evidenciando-se: nos linfócitos T, a redução da transcrição e síntese de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF (fator de estímulo ao crescimento de monócitos e granulócitos), fator de necrose tumoral e interferon gama; diminuição das células dendríticas, que atuam como apresentadoras de antígenos e auxiliam no desencadeamento da resposta inflamatória alérgica; redução dos níveis de substância P e fator de crescimento neuronal produzido pelos queratócitos. Estas ações permitem o controle do processo inflamatório, pois os linfócitos T estão menos ativados<sup>57</sup>.

#### 1.2.4. CÉLULAS TRONCO

A célula-tronco (CT) é uma célula que possui três características fundamentais que a distinguem de outros tipos celulares. Primeiro, são células indiferenciadas, ou seja, não comprometidas com nenhuma linhagem celular. Segundo, são células com capacidade de auto-renovação, gerando células-filhas idênticas às células-mães. E por fim, sob certas condições fisiológicas ou experimentais, podem ser induzidas a diferenciar-se, ou seja, tornarem-se células com funções especializadas<sup>58</sup>. As CT podem seguir dois processos diferentes de divisão celular: na divisão simétrica uma célula-tronco mãe origina duas células-

tronco filhas idênticas a ela e na divisão assimétrica origina duas células, uma célula idêntica a ela (auto-renovação) e uma célula especializada.

### Tipos de Células Tronco

As CT estão presentes em todos os tecidos desde a formação do embrião. Com o desenvolvimento embrionário até a fase adulta, as CT vão diminuindo a sua capacidade de diferenciação celular, porém, passam a contribuir com a manutenção do tecido através de outras ações e não só a capacidade de se diferenciar em tecidos específicos. Por esse aspecto, didaticamente as células tronco são divididas em células tronco embrionárias (CTE) e células tronco adultas (CTA).

Em relação à sua capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, as CT podem ser classificadas também em:

1. Totipotentes: São as células encontradas nas primeiras divisões, quando o embrião tem até 16 células, são capazes de produzir o novo indivíduo e também seus anexos embrionários;
2. Pluripotentes: São obtidas da massa interna do blastocisto e podem produzir o novo indivíduo, mas não são capazes de produzir os anexos embrionários;
3. Multipotentes: São o tipo celular presente nos tecidos, em indivíduos após o nascimento, possuem capacidade limitada de diferenciação nos tecidos de um organismo;
4. Oligopotentes: São células comprometidas com um tipo específico de linhagem celular, por exemplo, as células precursoras das células sanguíneas.

### Célula Tronco Embrionária

As CTE são isoladas a partir de embriões pré-implantacionais, e apresentam um grande potencial na medicina regenerativa podendo dar origem a um organismo completo. Porém este alto potencial de diferenciação, que por um lado pode trazer grandes benefícios, também pode levar a um crescimento descontrolado das CT, originando formações tumorais. Portanto, o uso deste tipo celular na terapia clínica ainda não é uma realidade. Existem ainda, riscos associados à sua utilização terapêutica devido a rejeição imunológica e alta capacidade mutagênica<sup>59</sup> (WAKAYAMA et al., 1999). Além disso, o uso de CTE no Brasil apresenta impedimentos legais, éticos e religiosos no que se refere à destruição de embriões para obtenção destas células.

### Célula Tronco Adulta

As CTA são células indiferenciadas encontradas nos tecidos que são responsáveis pela regeneração tecidual durante sua existência. Elas vêm sendo identificadas nos mais diversos tecidos como cordão umbilical, pele, rim, medula óssea, tecido adiposo e polpa dentária. Li e Xie, 2008<sup>(60)</sup> afirmaram que essas células têm propriedades típicas das CT, incluindo autorrenovação, diferenciação de múltiplas linhagens e alto potencial proliferativo. Essas células são encontradas em um nicho específico ou em um compartimento tecidual que são importantes na manutenção da integridade dos tecidos. As células tronco adultas incluem dois grupos principais: **células tronco hematopoiéticas (CTH)**, que classicamente dão origem a toda linhagem sanguínea e **células tronco mesenquimais (CTM)**, que dão origem a vários tecidos conectivos. A concepção de que a linhagem das CT adultas é restrita, só repondendo aos tipos celulares do tecido no qual elas residem, foi recentemente modificada por uma série de publicações sugerindo que essas células têm um grande potencial de diferenciação<sup>61</sup>.

### Células Tronco Hematopoiéticas

As CTH são obtidas apenas através do sangue do cordão umbilical e da porção sanguínea da medula óssea. Estas células, embora ainda consideradas células tronco, já apresentam certo comprometimento com a linhagem sanguínea, ou seja, são células que só podem se diferenciar em células presentes no sangue.

### Células Tronco Mesenquimais

As CTM constituem uma população de células multipotentes, que ao contrário do que se acreditava inicialmente, não estão envolvidas apenas no processo de reparação e homeostase dos tecidos dos quais são isoladas, mas também possuem diversos efeitos parácrinos. Apresentam ação anti-inflamatória, imunossupressora, antiapoptótica, angiogênica, antifibrótica e reparadora endógena, pois estimulam as próprias células tronco intrínsecas do organismo e que contribuem para a recuperação e regeneração de outros tipos celulares e tecidos<sup>62</sup>. A capacidade das CTM de originar diversos tipos de células do indivíduo as têm tornado extremamente atrativas para a regeneração de tecidos<sup>61,63</sup>. Diferentemente das CTE, as CTM não necessitam do uso de embriões como material biológico, contornando assim as questões éticas, legislativas e culturais envolvidas. Além disso, o avanço tecnológico tem ajudado a visualizar o real potencial da utilização terapêutica dessas células, e a sua capacidade de regeneração de tecidos danificados está sendo amplamente estudada em animais<sup>64,65,66</sup> e em humanos<sup>65,67</sup> e o desenvolvimento de protocolos terapêuticos seguros já é realidade em vários países.

As CTM podem ser obtidas a partir de diversos tecidos do organismo. Na medicina regenerativa os tecidos mais utilizados são a medula óssea (porção estromal), tecido adiposo e tecido do cordão umbilical. No entanto, o número de CTM isoladas a partir destes tecidos pode variar<sup>68</sup>.



## Ação anti-inflamatória das CTM

As CTM exercem ações amplas e significativas nas condições inflamatórias. Essas células agem tanto regulando de forma negativa a produção de citocinas pró-inflamatórias proveniente das células de defesa do organismo, como ainda secretando interleucinas com ação anti-inflamatória, como por exemplo as interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13<sup>69,70</sup>.

Na questão inflamatória, os macrófagos possuem um papel muito importante e, dependendo da sua forma de ativação, podem exercer uma ação pró-inflamatória (macrófago de classe 1 - M1) ou anti-inflamatória (macrófago de classe 2 - M2). Os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO), que proporciona lesão tecidual; já os macrófagos M2, estão relacionados ao reparo tecidual, pois produzem mediadores essenciais na resolução da inflamação, remodelagem do tecido e na eliminação de restos teciduais, facilitando a sobrevivência e a proliferação de células residentes<sup>71</sup>. As CTM ao secretarem IL-4 e IL-13, condicionam o favorecimento da expressão do macrófago de classe 2 (M2), que é caracterizado pela produção da interleucina anti-inflamatória (IL-10), aumento do CD206, diminuição da expressão de IL-12, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e NO<sup>72,73,74</sup>. As CTM antagonizam a expressão do fenótipo M1, reduzem a expressão de CD86 e MHCII nos macrófagos, diminuindo assim, a sua potência estimulatória<sup>75</sup>. Além dos macrófagos, os neutrófilos são fagócitos importantes do sistema imune inato. Em resposta à detecção de moléculas microbianas, os neutrófilos produzem uma grande quantidade de produtos microbicidas oxidativos na chamada explosão respiratória oxidativa<sup>76</sup>. As explosões respiratórias também estão intimamente associadas à apoptose dos neutrófilos<sup>77</sup>. As CTM inibem a apoptose dos neutrófilos, mesmo sob condições de ativação mediadas por IL-8, via IL-6 derivada das CTM<sup>78,79</sup>. Pensa-se que as CTM podem aplicar este efeito para preservar o pool de neutrófilos não dividido encontrado nas sinusóides da medula óssea. As CTM também evitam rajadas respiratórias de neutrófilos, um efeito que

se alinha com a imunossupressão das CTM, mas não tem efeito sobre a fagocitose dos neutrófilos, adesão à matriz ou a quimiotaxia<sup>78</sup>.

Ainda dentro da ação anti-inflamatória que as CTM exercem, outro caminho é o controle dos mastócitos, que contribuem fortemente para respostas alérgicas, especialmente através da libertação de citocinas pró-inflamatórias e de grânulos contendo histamina. Nesta situação, a principal ação das CTM é a capacidade de suprimirem a degranulação destas células e conseqüentemente a produção de TNF- $\alpha$ <sup>80</sup>. Num modelo de anafilaxia cutânea passiva *in vivo*, as CTM reduziram a inflamação promovida por mastócitos. Nestes experimentos, a imunossupressão mediada por CTM era dependente da regulação positiva da ciclo-oxigenase-2 nas CTM e da sua produção de PGE<sub>2</sub>, que suprimia mastócitos via ligação do receptor EP4.

#### Ação Imunossupressora das Células Tronco Mesenquimais

Num ambiente natural, as células T de sistemas imunitários adaptativos são divididas em linhagens CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as quais podem ser subgrupadas em diferentes subconjuntos efetores. Após a ativação através de receptores de células T e coestimulação por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como as células dendríticas (CD), as células T proliferam rapidamente e diferenciam-se em células efectoras. As células T efectoras CD4<sup>+</sup> desenvolvem-se como células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , as células Th2 produzem IL-4 e IL-13, as células T reguladoras (Treg) são produtoras de IL-10 e, as TH17, são produtoras de IL-17. Já as células T CD8<sup>+</sup>, são principalmente consideradas como linfócitos T citotóxicos e produzem grânulos citotóxicos que matam células infectadas e cancerosas; entretanto, eles podem se diferenciar em outros subtipos como suas contrapartes de células T CD4<sup>+</sup>.<sup>81</sup>

Na ação imunossupressora, as CTM inibem a proliferação e a citotoxicidade de todas as células T, com exceção das células Treg que secretam

citocina com ação anti-inflamatória (IL-10). Esse mecanismo, que é multifatorial, ocorre porque as CTM regulam a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), que produz o NO, promovem o aprisionamento destas células na fase do ciclo celular G0 / G1 e modulam a produção das citocinas liberadas pelas células T através da produção de moléculas como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), TGF- $\beta$  e PGE2, que, por sua vez, são capazes de suprimirem a produção de IFN- $\gamma$  a partir das células Th1, promoverem a secreção de IL-4 a partir das células TH2 e aumentarem desta forma a proporção de Treg<sup>82,83,84,85</sup>. Com essas ações, as CTM têm demonstrado um forte papel na imunomodulação de várias patologias. Exemplo disso foi relatado por Zappia et al. (2005) e Rafei et al. (2009)<sup>(86)</sup>, que demonstraram uma melhora significativa em casos de encefalomielite autoimune experimental (EAE) mediada pelas CTM. Neste trabalho, a polarização destas células foi inibida *in vivo*, e o HGF derivado das CTM suprimiu a EAE ao mesmo tempo que promoveu um efeito neurotrópico benéfico<sup>84,86,87</sup>. Em outro estudo, as CTM reprimiram a rejeição de enxerto de pele em macacos, o que foi associado à supressão de proliferação de células T<sup>88</sup>. Outros exemplos são num modelo de diabetes autoimune induzida por estreptocitocina, que as CTM conseguiram inibir a destruição mediada pelas células T das células  $\beta$  secretoras de insulina no pâncreas<sup>89</sup> e, num modelo de artrite induzida por colágeno, as CTM também suprimiram a proliferação de células T auto-reativas, além de diminuir a produção de TNF- $\alpha$  e apoiarem a geração de células Treg<sup>90</sup>.

As células B são especializadas na produção de anticorpos, que desempenham múltiplos papéis na neutralização direta de patógenos, promovendo a opsonização para a neutralização da ingestão fagocitária e ativação de outras células imunes. As células B *Naive* são ativadas pela ligação do receptor de células B (BCR), ligação a CD40 / CD40L e ligação dos receptores tipo Toll (TLR) de produtos<sup>91</sup>. Em resposta à ativação, as células B proliferam e se diferenciam em células plasmáticas, que produzem anticorpos. As CTM inibem a proliferação de células B *in vivo* e *in vitro*, por prisão no G0 / G1 *check point*, sem indução de apoptose<sup>91,92</sup>. Além disso, as CTM reduzem a produção de IgG, IgM e IgA durante a co-cultura *in vitro* com células B e suprimem a expressão do receptor de quimiocina nas células B<sup>93</sup> (Corcione et al., 2006). Em transplantes *in vivo*, as injeções de CTM levaram a uma redução de anticorpos alo-específicos

e promoveram a aceitação do enxerto a longo prazo<sup>91,94</sup>. Numa forma de encefalomielite autoimune experimental (EAE) mediada por proteína proteolipídica (PLP) e numa forma murina de esclerose múltipla<sup>86</sup>, os ratos que receberam CTM exibiram uma inibição dos anticorpos específicos da PLP. Isso deve-se ao contato célula-célula e os fatores solúveis sintetizados pelas CTM que suprimem a função das células B.

As células assassinas naturais (NK) são células imunitárias inatas que, além de produzirem citocinas pró-inflamatórias são citotóxicas em relação às células infectadas com patógenos intracelulares e células cancerosas. A citotoxicidade das células NK é regulada por receptores inibidores e ativadores, de expressão do MHC da célula alvo e da citotoxicidade celular dependente de anticorpos. As CTM conseguem inibir proliferação e a citotoxicidade das células NK, reduzir a expressão de receptores ativadores de NK, incluindo 2B4 e NKG2D<sup>95</sup> e reduzir a produção de citocinas amoniativas por elas, tudo através da expressão/síntese de indolamina-2,3-dioxigenase<sup>74</sup>.

As células dendríticas (CD) unem os sistemas imunológico inato e adaptativo, uma vez que funcionam tanto como produtores de citocinas como também potentes apresentadoras de antígenos. As CDs absorvem o antígeno e durante a maturação e ativação, aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD83 e CD86), migram para órgãos linfóides secundários e apresentam antígeno para as células T (resposta imune adaptativa primária). Durante a iniciação de células T, as CDs também produzem uma mistura de citocinas que afetam a função avaliadora das células T. As CTM afetam a maioria desses processos: inibem a endocitose pelas CDs, aumentam a regulação de MHC, CD40, CD80, CD83 e CD86 durante a diferenciação e impedem o aumento adicional da expressão de CD40, CD83 e CD86 durante a maturação<sup>96</sup>. As CTM também interferem na capacidade das CDs produzirem IL-12 e ativarem células T alogênicas<sup>96,97</sup>. Além disso, as CTM bloqueiam a geração de CD dérmicos a partir de precursores de CD14+ CD1a- derivados de CD34 e os derivados de monócitos imaturas<sup>96</sup>. Esta afirmação foi corroborada com os resultados de Ramasamy et al. (2007)<sup>(98)</sup> que observaram que ao cultivarem monócitos em condições de diferenciação de CD na presença das CTM, não proliferaram e se mantiveram no estado G0. Em outro estudo, o tratamento com

CTM inibiu a maturação de CD *in vivo*, bem como a secreção de citocinas e a sua migração para os gânglios linfáticos<sup>99</sup>, resultando na ativação insuficiente de células T nos gânglios linfáticos. A PGE2 secretada pelas CTM regula a produção e a modulação das CD, neste último, diminuindo a conversão das CD imaturas para maduras<sup>100</sup> (Zhang et al., 2014).

### Ação Autócrina das Células Tronco Mesenquimais

A regeneração e manutenção dos tecidos do organismo dependem de um equilíbrio balanceado entre autorrenovação e a diferenciação das CTA residentes em cada órgão<sup>70,101</sup>. Atualmente explicações têm sido propostas para a plasticidade das CT como a **diferenciação, transdiferenciação e fusão celulares**

A **diferenciação** é um processo no qual, células tronco indiferenciadas derivam células especializadas e funcionais. Este fenômeno ocorre mediante estímulos bioquímicos *in vivo* e *in vitro*. Estes estímulos podem ocorrer naturalmente no organismo *in vivo*, mediante a secreção de fatores de crescimento produzidos pelas células intrínsecas do tecido, enquanto *que in vitro* os estímulos ocorrem artificialmente através da utilização de suplementos e o condicionamento de meios de cultivo específicos para determinado tipo celular desejado<sup>102</sup>.

A **transdiferenciação** refere-se à habilidade de uma célula originada de determinada linhagem embrionária (endoderma, mesoderma ou ectoderma) e portanto, comprometida com tal linhagem, em se alterar de tal modo que origine uma célula de outra linhagem. Em mamíferos este fenômeno pode ocorrer de forma espontânea como uma defesa contra a lesão<sup>61</sup>.

Outro mecanismo de diferenciação celular proposto é a **fusão**. A fusão celular é um fenômeno biológico amplamente conhecido, ocorrendo principalmente em células poliplóides (dois ou mais conjuntos de cromossomos), como por exemplo, células musculares esqueléticas<sup>103</sup>. Vários estudos demonstraram que as CTM podem fundir-se a uma célula adulta alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula a qual se uniu. CTM humanas

demonstraram capacidade de fundir com cardiomiócitos de camundongos<sup>104</sup> e com células de Purkinge<sup>105</sup>, contribuindo assim com a funcionalidade das células do tecido.

### Ação Angiogênica das CTM

A angiogênese é outro importante processo biológico positivamente influenciado pelas CTM por meio de seus efeitos parácrinos. As CTM secretam fatores bioativos envolvidos no processo de formação de novos vasos, como o VEGF, FGF, HGF-1, SDF-1 e angiopoietina<sup>106</sup>. Foi demonstrado em modelo isquêmico de membro e infarto do miocárdio que estes fatores secretados pelas CTM estimulam a proliferação e a diferenciação de células endoteliais e de células musculares lisas, promovendo o desenvolvimento de vasos colaterais e aumento da densidade capilar em tecidos isquêmicos<sup>107</sup>.

### Transplante Alogênico de Células Tronco Mesenquimais

As CTM possuem uma característica extremamente importante, são consideradas não imunogênicas, pois apesar de expressarem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I), não expressam marcadores para as moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC II), sendo incapazes de induzir aloreatividade em mamíferos<sup>70,83</sup>. A ausência da expressão do MHC II exime o risco de rejeição no transplante das CTM entre indivíduos diferentes da mesma espécie (transplante alogênico) e entre indivíduos de espécies diferentes (transplante xenogênico). Prova desta condição não imunogênica das CTM são os inúmeros trabalhos publicados utilizando CTM humanas em animais de laboratório. Shen-Yang et al. (2014)<sup>(108)</sup> utilizaram CTM de tecido adiposo suíno em cães com osteoartrose e acompanharam os animais por 12 semanas. O resultado revelou que este tipo de transplante foi seguro e eficaz, pois além de não terem apresentado reações ou efeitos colaterais imediatos ou tardios, ainda apresentaram melhora significativa da osteoartrose em todos os animais tratados.

A ausência da expressão do complexo de histocompatibilidade (MHCII) é muito importante para que não haja rejeição do transplante das CTM em indivíduos diferentes, da mesma espécie ou não. Contudo, outro fator importante que contribui com esta imunocompatibilidade, é o fato destas células atuarem como mediadoras do sistema imunológico, pois secretam biomoléculas capazes de imunomodular e imunossuprimir o microambiente, promovendo uma ausência de resposta imunogênica. Estas ações das CTM são bem observadas nas respostas aos tratamentos para doenças autoimunes, onde o controle da patologia só ocorre quando há uma severa imunossupressão e imunomodulação. Exemplo disso, são os casos de Lúpus Eritematoso Sistêmico, onde o tratamento com as CTM é empregado com sucesso<sup>109,110,111,112</sup>.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

Conforme as práticas médicas e diagnósticas têm evoluído, vê-se na literatura que os estudos para essa doença acompanharam os recursos disponíveis em cada época, de forma que na década de 1980 utilizou-se corticoterapia, na década de 1990 utilizou-se ciclosporina A e seguiram-se as novas propostas farmacológicas. Contemporaneamente os ensaios que forneceram informações histológicas na década de 1970, avançaram com conhecimentos imunoistoquímicos e sorológicos nas décadas que se seguiram, todavia desde as primeiras descrições da doença na década de 1950 a etiologia e a terapia curativa ainda não foram determinadas.

A medicina regenerativa é uma nova abordagem atual e pioneira e tem mostrado resultados promissores e até curativos na medicina veterinária e na também na oftalmologia veterinária<sup>113,114,115</sup>. Visto da acessibilidade aos recursos tecnológicos de medicina regenerativa e da casuística da doença, surge assim, o presente estudo que visa confrontar a doença, ainda obscura, com a nova terapia de vanguarda e observar a evolução clínica.



## 1.4 OBJETIVO

A presente investigação tem por objetivos:

- Observar a segurança do uso de células-tronco mesenquimais alógenas e,
- Clinicamente observar as alterações da superfície ocular de cães pastores Alemães portadores de Ceratite superficial crônica, após utilização de células-tronco mesenquimais aplicadas via subconjuntival na região peri-límbica temporal inferior, próximo da emergência dos neovasos da doença.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo é um estudo piloto do tipo prospectivo intervencionista caso controle que compreende uma série de 8 casos de cães com diagnóstico de CSK. Os cães foram incluídos neste estudo de maio de 2015 a maio de 2017 em Atibaia, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética de Cuidados e Uso Animal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil, sob o protocolo número 3636-1 (Anexo 1). Os proprietários dos animais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

Animais:

Os critérios de inclusão foram:

1. A presença de sinais clínicos compatíveis com a descrição da doença, que inclui: presença de ceratite crônica, não ulcerativa, principalmente no limbo lateral inferior com uma combinação de neovascularização e pigmentação que se estende para o centro da córnea (Fig1. A e D). Em alguns casos, uma linha branca ou manchas brancas aparecem frequentemente na córnea clara 1 a 2 mm antes dos vasos sanguíneos (Fig9.S). Também podem estar presentes espessamento e pigmentação da terceira pálpebra.

2. A caracterização fenotípica da raça “Pastor Alemão” conforme imagem na Figura1.

3. Pacientes que não estavam recebendo qualquer medicação prévia.

## Critérios de exclusão

A presença de outras condições oculares, tais como: ulceração da córnea, ceratoconjuntivite seca, glaucoma, ceratite infecciosa ou conjuntivite e quaisquer outras doenças oculares ou sistêmicas, incluindo a presença de neoplasia. Reações adversas graves que poderiam comprometer a visão do animal de forma permanente ou pôr em perigo sua vida foram considerados critérios para interromper o estudo. Um total de 16 olhos de sete fêmeas e um macho da raça pastor alemão, com idade entre 4 a 10 anos, participaram deste estudo. Todos os participantes recrutados não estavam recebendo tratamento imunossupressor convencional antes e durante o período de estudo.

## Avaliação Clínica

Os cães foram submetidos a avaliações sistêmica e oftalmológicas, incluindo ultra-sonografia abdominal e radiografia torácica, hemograma completo e análises de bioquímica sérica para excluir outras doenças sistêmicas. A avaliação oftalmológica incluiu um exame neuro-oftalmológico (reflexo de ofuscamento, reflexo pupilar fotomotor e teste de resposta à ameaça), teste de lacrimal de Schirmer I (STT-I caracterizado pela aferição sem o uso de anestesia tópica) (Schirmer Test, Ophthalmos®, São Paulo), tonometria de aplanção (Tono-Pen, Reichert Inc®, EUA), teste de fluoresceína (Tiras de Fluoresceína, Ophthalmos®, São Paulo), exame de biomicroscopia de lâmpada de fenda (Kowa, Japan®), oftalmoscopia indireta (Ocular Instruments®, EUA) e citologia corneconjuntival também foi realizada para identificar diferentes tipos de células de superfície ocular e excluir neoplasia. Os cães foram monitorados clinicamente aos dias 0, 30 e 110 dias após o diagnóstico e tratamento. O dia do primeiro transplante foi considerado o dia 0.

Cada avaliação compreendeu um exame clínico e oftalmológico abrangente, incluindo avaliação da superfície corneana com fluoresceína,

tonometria e teste de Schirmer. Os valores de normalidade para o Teste de Schirmer tipo I em cães compreende medidas entre 15mm e 25mm em 1 minuto, e os valores de tonometria normais estão entre 10mmHg e 25mmHg.

A manifestação clínica, em cães, de dor e desconforto ocular caracteriza-se pelo aumento do ritmo natural do ato de piscar até o ponto de manter as pálpebras fechadas (blefarospasmo), associado ao aumento da produção lacrimal (epífora) seja apenas porção aquosa (secreção serosa) seja também do aumento da porção lipídica da lágrima (secreção mucosa).

A percepção de visão em animais se baseia em testes de deambulação em ambientes conhecidos e desconhecidos em condições de claro e escuro, normalmente com alternância de obstáculos da altura dos olhos dos animais (cones de sinalização e móveis comuns do local) para confirmação da capacidade de desviar deles. Também, chamado de Resposta à ameaça, feito pelo examinador, consiste em cobrir um dos olhos e fazer movimento de aproximação da mão à frente do olho aberto, sem produzir som e deslocamento de ar ou tocar nos pêlos do focinho de forma a observar a capacidade do animal de piscar e mover a cabeça na intenção de evitar a agressão que se aproxima (este teste associa a visão com a capacidade cognitiva de interpretação e diversas vias neurológicas relacionadas com nervos cranianos). Estes sinais foram monitorados nos dias de seguimento e os proprietários foram treinados a observar e notificar a ocorrência de variações em casa.

O estado da córnea também foi avaliado, padronizou-se uma escala subjetiva em relação à sua transparência de 0 a 4, sendo 0 o equivalente a uma córnea normal e 4 totalmente opaca e dividindo-se a superfície corneana em 4 quadrantes, avaliando-se quantos quadrantes estavam comprometidos. As áreas de vascularização corneana somadas às áreas com infiltrado inflamatório definiram as medidas da “Área de lesão” ativa. As áreas pigmentadas somadas separadamente compreendem as áreas com a doença na fase inativa ou cicatricial. Para realizar tais medidas objetivas, fotografias foram realizadas em cada tempo de avaliação, aos 0, 30 e 110 dias. Para mensurar as fotografias, foi utilizado um software gratuito na internet, qualificado para análise de imagens (ImageJ -<http://imagej.nih.gov/ij/>). As fotografias foram todas tomadas pelo

mesmo operador e produzidas nas mesmas condições, com a mesma iluminação e equipamentos para assegurar a consistência dos resultados. Nos critérios de avaliação no ImageJ, a área total da córnea em uma determinada imagem foi definida como 100%. A área lesada foi uma porcentagem da córnea total, considerada a soma da área neovascularizada e área com opacidade (infiltrado inflamatório), de forma semelhante à descrita por Balicki (2012)<sup>22</sup>. A área pigmentada foi medida separadamente por ser considerada a reação cicatricial da doença (Figura 5.G; Tabelas 1 e 2).

As medidas da superfície ocular foram realizadas por 3 examinadores que atuam na área de oftalmologia veterinária há mais de 10 anos, todos com formação na mesma instituição denominada ANCLIVEPA-SP (Associação de clínicos veterinário de pequenos animais –SP) e que não conheciam o protocolo e o momento de cada imagem.

#### Inclusão nos grupos de estudo

Os proprietários receberam a instrução clínica sobre a patologia de seus animais de companhia, e dos modelos de tratamento disponíveis. Tiveram livre escolha sobre o protocolo desejado, de forma que seja modelo experimental com CTM, seja tratamento convencional com antiinflamatórios tópicos, a decisão/escolha não teve participação do avaliador.

Em função da rotina clínica e da casuísta, definiram-se 2 grupos com 4 animais em cada:

- Grupo experimental : participantes que receberam 2 aplicações de 1 milhão de CTM, com intervalo de 30 dias entre as aplicações;
- Grupo tratamento convencional: participantes que receberam administração tópica de prednisona (Predfort® colírio, 1 gota 3x ao dia, uso contínuo) e via oral de prednisolona 1mg/kg 1x ao dia até remissão dos sintomas (variando entre 10-20 dias) e depois 50% da dose por mais 5 dias.

## Células-tronco mesenquimais e transplante

As CTM foram fornecidas e processadas por um laboratório privado que cumpre os padrões da International Society for Cellular Therapy (ISCT) (Regenera Stem Cells® Laboratory, São Paulo, Brasil). Sucintamente, as diferentes etapas envolvidas na produção de CTM são: coleta de tecido adiposo; processamento do tecido adiposo; coleta das células-tronco e expansão em cultura; diferenciação e avaliação das células; e criopreservação e transplante, como descrito em Bittencourt (2016). As CTMs criopreservadas são fornecidas acondicionadas em caixas de isopor preenchidas com gelo seco (dióxido de carbono em estado sólido a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) junto com pipetas Pasteur e 3 tubos de ensaio com soluções para passagem e lavagem seqüenciais. Para a realização do transplante as CTM foram descongeladas ( $<2$  min) em  $37^{\circ}\text{C}$  e transferidas para o primeira solução com meio de cultura basal, volume de 5 ml, e levadas à centrifugação a  $300\times g$  durante 5 minutos. Depois, as células foram lavadas duas vezes com 4 ml de Solução salina balanceada (PBS), sempre com a mesma força de centrifugação. O resultado é um botão de células no fundo do tubo de ensaio com um milhão de CTM que foram finalmente ressuspensos em 0,2 ml de solução salina estéril (0,9%) (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil) e foram injetados na região subconjuntival e perilimbal lateral inferior usando uma agulha 25 x 0,7mm em uma seringa de 1 ml (Figuras 4 e 5). Para o procedimento de transplante de CTM, os animais foram sedados com propofol (5 mg / kg, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) e tramadol (2 mg / kg; União Química, São Paulo, SP, Brasil) e, em seguida, ambos os olhos e a pele circundante foram preparadas assepticamente para o transplante. O segundo transplante, com mesmo rigor técnico, foi realizado trinta dias depois do primeiro.

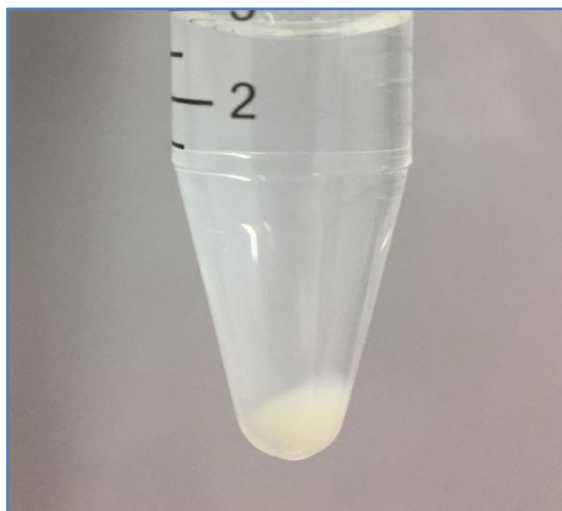


Figura 4. *Pellet* formado no fundo tubo

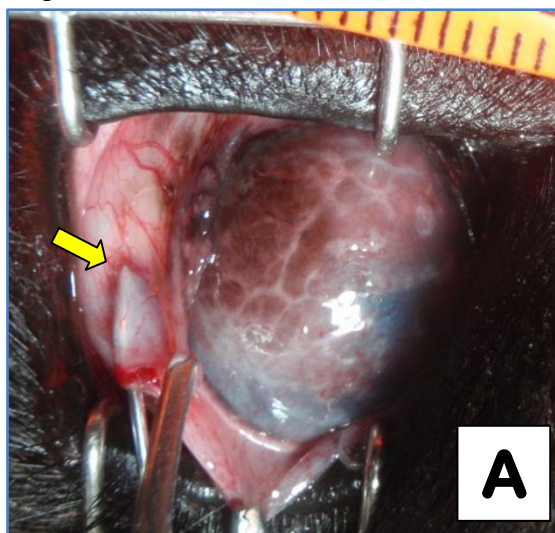


Figura 5. **A**- Local e forma de aplicação subconjuntival da CTM. seta = posição da agulha; **B** Aparência após aplicação

## Análise estatística

As leituras das alterações da superfície ocular em relação a porcentagem da área de vascularização e da área de pigmentação realizadas pelos examinadores foram comparadas para verificar a consistência entre elas e comprovado a semelhança estatística, fez-se a média aritmética entre eles para as análises finais.

As comparações pareadas e não paramétricas dentro de cada grupo analisando a evolução clínica foram submetidas ao teste Wilcoxon para as medidas das áreas de vascularização e pigmentação.

As comparações não pareadas e não paramétricas entre os grupos, relacionando os momentos de seguimento foram submetidas ao teste Mann-Whitney



### 3. RESULTADOS

#### **Segurança do transplante de CTM alogênico**

##### Avaliação oftalmológica e Clínica:

Não foram observados efeitos colaterais, como dor ocular, desconforto ou irritação do tecido conjuntival secundário ao transplante de CTM. Nos momentos de seguimento o exame oftalmológico era repetido de forma completa, de forma que não houve mudanças na produção de lágrima, na integridade do epitélio corneano e na pressão intraocular, como sugerido pelos resultados do teste de Schirmer, teste de fluoresceína e tonometria que mantiveram-se todos dentro da faixa de normalidade em todos os momentos de avaliação (dados não demonstrados). Conforme alguns olhos mudavam favoravelmente a manifestação clínica da neovascularização o teste Resposta à ameaça tornava-se mais pronunciado confirmando a melhora na capacidade visual. Além disso, não foram detectadas alterações quanto ao apetite, frequência de defecação/micção, peso corporal ou temperatura corporal e nenhuma reação alérgica foi observada. Além disso, os participantes permaneceram saudáveis ao longo do acompanhamento, mostrando que o tratamento não produziu alterações sistêmicas detectáveis.

A adesão dos proprietários se mostrou suficiente e eficiente, comprovados tanto pela frequência aos retornos à clínica para avaliações e segundas aplicações de CTM como também pelas descrições relatadas quanto aos valores subjetivos de dor e desconforto ocular, e descrições dos padrões de comportamento diário dos animais.

## Avaliação Laboratorial

A citologia corneana não revelou sinais de neoplasia. Ao invés disso, o fenótipo epitelial resultante da avaliação da superfície ocular demonstrou tecido não corneal, evidenciado pela presença de células caliciformes comumente encontradas na conjuntiva (dados não demonstrados) Figura 6.

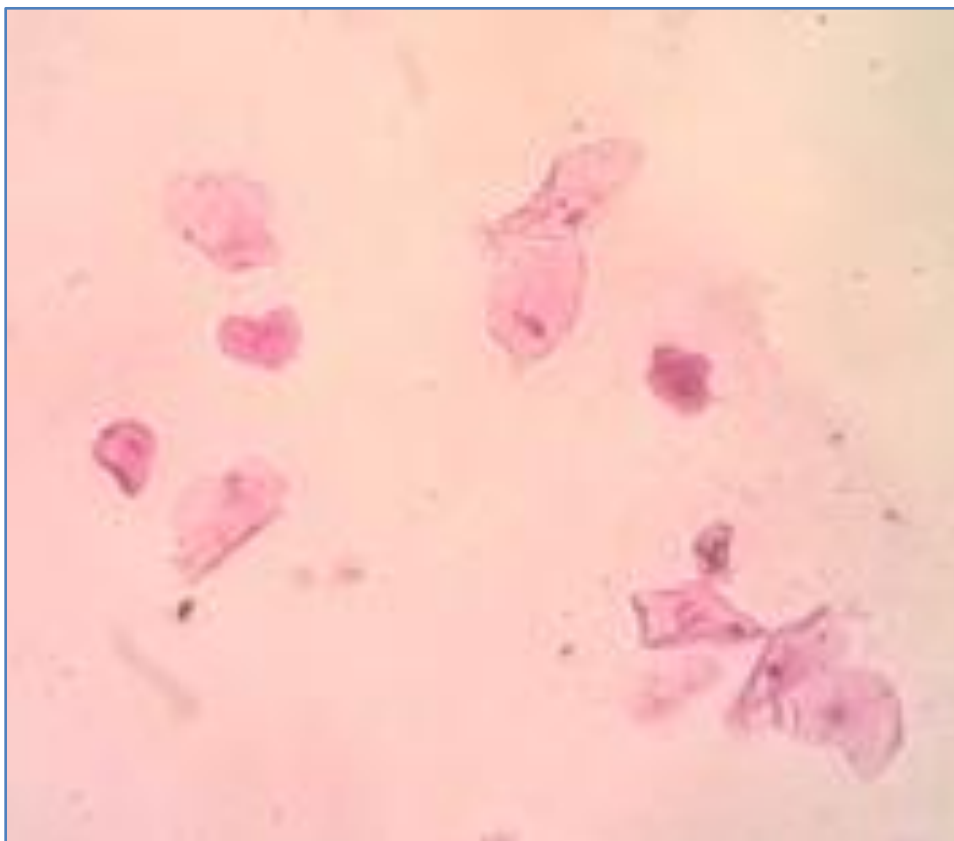


Figura 6. Imagem de citologia esfoliativa demonstrando células estratificado queratinizado. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento 100x.

## **Tratamento da CSK**

### **Descrição das alterações da superfície ocular do grupo experimental:**

O participante #1 no início do estudo apresentava neovascularização migrando centripetamente em 360 graus, resultando em opacidade que bloqueava a visibilização da câmara anterior, juntamente com comportamento de baixa capacidade visual evidenciada pelo resultado negativo no teste de resposta à ameaça. Aos 30 dias após o primeiro transplante de CTM, uma redução desses vasos sanguíneos permitiu o exame clínico parcial da câmara anterior, bem como a melhora do teste de resposta à ameaça. A opacidade permaneceu no centro da córnea enquanto a pigmentação estava mais concentrada na periferia. Entre o segundo transplante de CTM até o final dos dias de seguimento, a neovascularização continuou diminuindo até o ponto em que apenas um pequeno número de vasos sanguíneos era visível, e a periferia das córneas tornou-se mais transparente, enquanto no olho esquerdo a pigmentação cicatricial avançava para o centro da córnea. No final dos 110 dias de acompanhamento, o comportamento visual era clinicamente normal (Figura 7).

O participante #2 mostrou a porção lateral das córneas afetadas, ocupando 3 quadrantes da área das córneas e a capacidade e comportamento visuais eram normais. Após 30 dias, o olho direito demonstrou redução da neovascularização, no entanto, no olho esquerdo, os vasos sanguíneos aumentaram e cobriram toda a córnea. Esse foi o único olho neste estudo no qual um padrão de piora clínica foi observado. No final do seguimento, a córnea direita não mostrava nenhum vaso sanguíneo e a pigmentação ocupava clinicamente a mesma área que os vasos sanguíneos iniciais. O olho esquerdo também mostrava redução da neovascularização em menor grau do que o observado no dia 0, mas a área de pigmentação foi maior, no entanto, o comportamento visual continuou clinicamente normal (Figura 8)

O participante #3 apresentava a condição havia 2 anos antes do tratamento, o olho direito teve a maior neovascularização e era clinicamente cego. O olho esquerdo mostrava a pigmentação avançada com os vasos, mas ainda apresentava teste de resposta à ameaça positiva. No final do seguimento, a

aparência clínica no olho direito reduziu os vasos e apresentou um teste positivo de resposta à ameaça, enquanto a esquerda mostrou redução da intensidade da pigmentação (Figura 9).

O participante #4 teve a doença no estágio inicial com apenas 1 quadrante afetado em ambos os olhos. Durante o seguimento, os vasos e a opacidade foram progressivamente reduzidos, a córnea ficou clara com pequena reação de pigmentação (Figura 10).

### **Descrição das alterações da superfície ocular do grupo controle**

O participante A. Apresentava a doença no estágio inicial com apenas 1 quadrante afetado no olho direito e 2 quadrantes no olho esquerdo. O proprietário não compareceu no prazo estipulado para acompanhamento aos 30 dias (problemas particulares), mas informou que mantinha a posologia prescrita. Aos 110 dias em ambos os olhos o processo inflamatório havia regredido, porém as áreas pigmentadas eram maiores que as áreas afetadas inicialmente (Figura 11).

Participante B. Semelhantemente, apresentava a doença no estágio inicial com apenas 2 quadrantes inferiores afetados em ambos os olhos. Aos 30 dias de acompanhamento já era perceptível a regressão do processo inflamatório e a pigmentação nas mesmas regiões inicialmente afetadas nas córneas. Aos 110 dias em ambos os olhos a área pigmentada havia regredido em área e densidade (Figura 12).

Participante C. Em estágio mais avançado, a doença já com padrão crônico devido à presença de extensa pigmentação visível, e com quase a totalidade das córneas acometidas em ambos os olhos. Aos 30 dias de acompanhamento já havia marcante diminuição da neovascularização e a pigmentação expandia-se um pouco mais, sem comprometer todas as regiões inicialmente afetadas nas córneas. Aos 110 dias em ambos os olhos a área pigmentada havia regredido em

área e densidade, porém ocorria o reaparecimento de neovasos. O proprietário relatava que havia interrompido a medicação diária (Figura 13).

Participante D. Em estágio clínico inicial, com apenas 2 quadrantes afetados no olho direito e 1 quadrante no olho esquerdo e com pigmentação visível apenas próximo ao limbo. Aos 30 dias de seguimento havia remissão total do processo ativo da inflamação, com ampla diminuição da neovascularização e a pigmentação expandia-se um pouco mais da posição inicial, sem comprometer todas as regiões inicialmente afetadas nas córneas. Aos 110 dias em ambos os olhos a área pigmentada havia regredido em área e densidade deixando pouca reação cicatricial (Figura 14).

#### **Avaliação da superfície ocular:**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as leituras das alterações da superfície ocular entre os examinadores ( $p = 0,5474$ ) (Gráfico 1.)

Realizou-se comparação entre os dados iniciais das alterações da superfície ocular dos dois grupos para verificar a relação de semelhança entre eles, e não houve diferença significativa no dia 0, permitindo que as comparações finais sejam consistentes ( $p = 0,2786$ ) (Gráfico 2.)

#### **Avaliação intragrupo**

O grupo experimental apresentou as seguintes observações:

- Quanto às áreas inflamadas ou lesadas, que compreende a soma das áreas vascularizadas e áreas com opacidade:

- Não há diferença significativa ( $p=0,25$ ) comparando os valores dos dias inicial (dia 0) e intermediário (dia 30) das áreas inflamadas (Gráfico 3.)

- Houve diferença significativa ( $p=0,0078$ ) comparando os dias inicial e final (dia 110) com redução da área com inflamação ativa, em 8/8 olhos (Gráfico 3.)

- Quanto às áreas pigmentadas:

-Não há diferença significativa ( $p=0,25$ ) comparando os dias inicial e final (Gráfico 4.)

O grupo tratamento convencional apresentou as seguintes observações:

- Quanto às áreas inflamadas:

- Houve diferença significativa ( $p=0,0313$ ) comparando os dias inicial e intermediário (sem considerar participante A que não tem dados pareados), com redução em 6/6 olhos;

- Houve diferença significativa ( $p=0,0391$ ) comparando os dias inicial e final com redução em 7/8 olhos (Gráfico 5).

- Quanto às áreas pigmentadas:

-Não há diferença significativa ( $p=0,3828$ ) comparando os dias inicial e final (Gráfico 6.)

Avaliação entre os grupos observa-se:

- Há diferença significativa ( $p=0,0426$ ) comparando os valores do dia intermediário entre os grupos (Gráfico 7.);

- Há diferença significativa ( $p=0,0263$ ) comparando os valores do dia final entre os grupos (Gráfico 8.).

Os valores das médias dos examinadores para o Grupo experimental estão expressos na Tabela 1 e do Grupo tratamento convencional na Tabela 2.

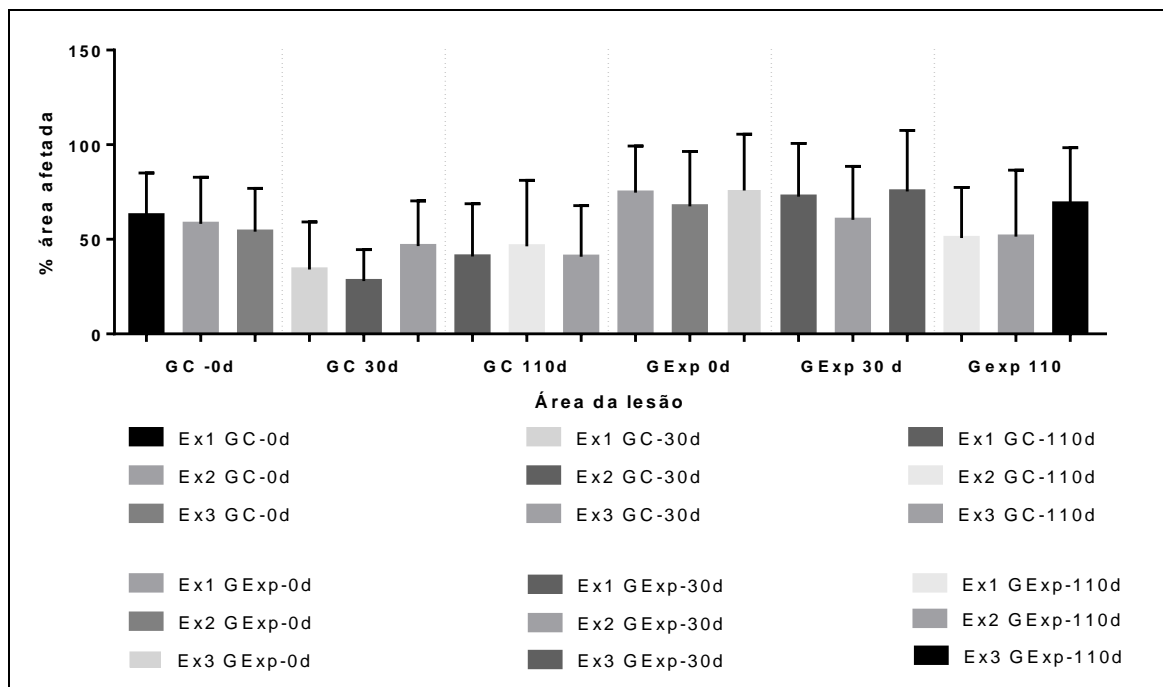


Gráfico 1. As avaliações por grupo dos 3 examinadores, sem diferença estatística entre seus valores ( $p = 0,5474$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ .

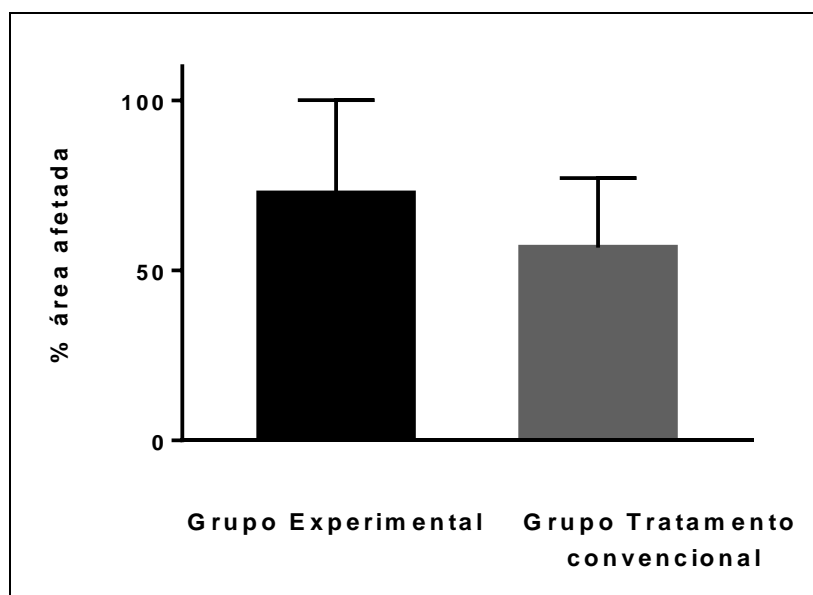


Gráfico 2. Comparação entre os grupos no dia 0, sem diferença estatística entre seus valores ( $p = 0,2786$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ .

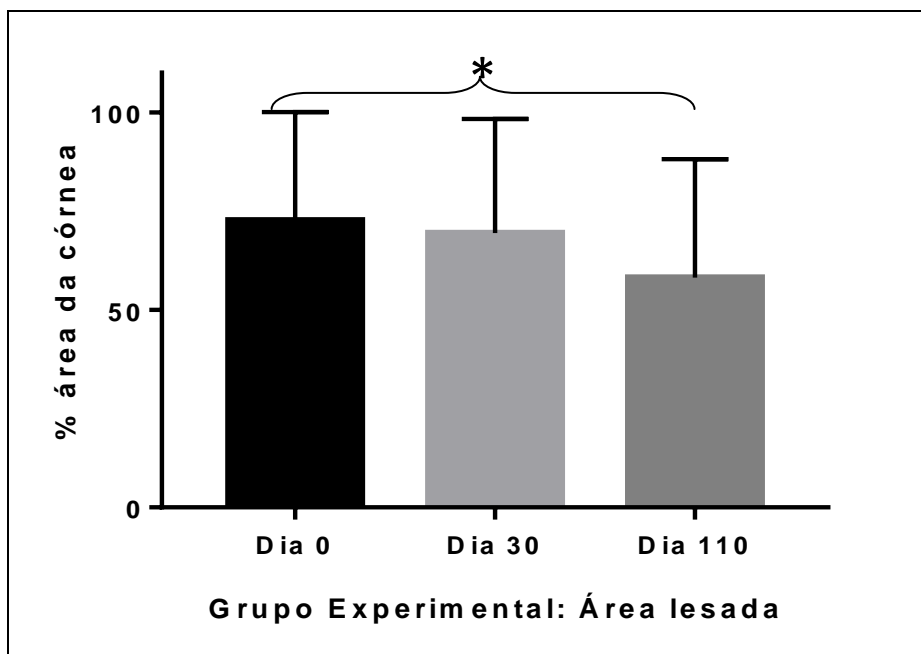


Gráfico 3. Grupo experimental: áreas lesadas. Comparação entre os dias de seguimento. Sem diferença estatística entre dia 0 e dia 30 ( $p=0,25$ ) e com diferença estatística (\*) entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,0078$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ .

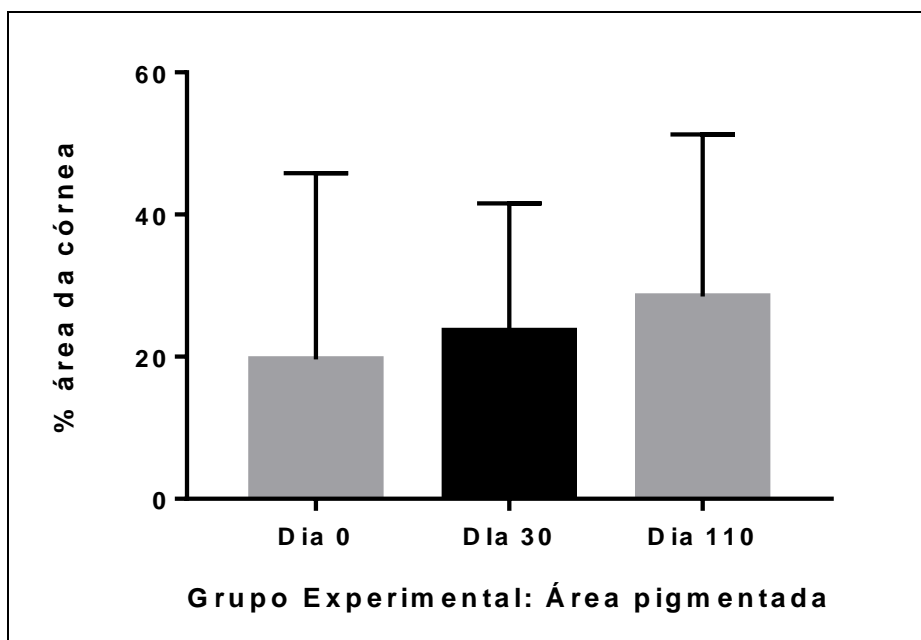


Gráfico 4. Grupo experimental: áreas pigmentadas. Comparação entre os dias de seguimento. Sem diferença estatística entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,25$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ .



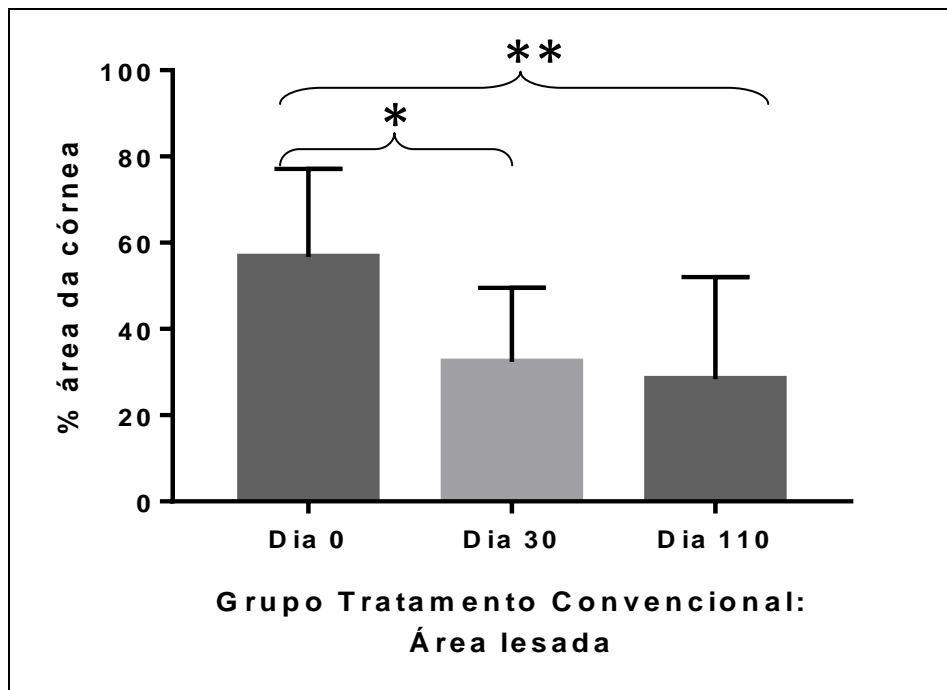


Gráfico 5. Grupo Tratamento convencional: áreas lesadas. Comparação entre os dias de seguimento. Com diferença estatística (\*) entre dia 0 e dia 30 ( $p=0,0313$ ) e com diferença estatística (\*\*) entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,0391$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ .

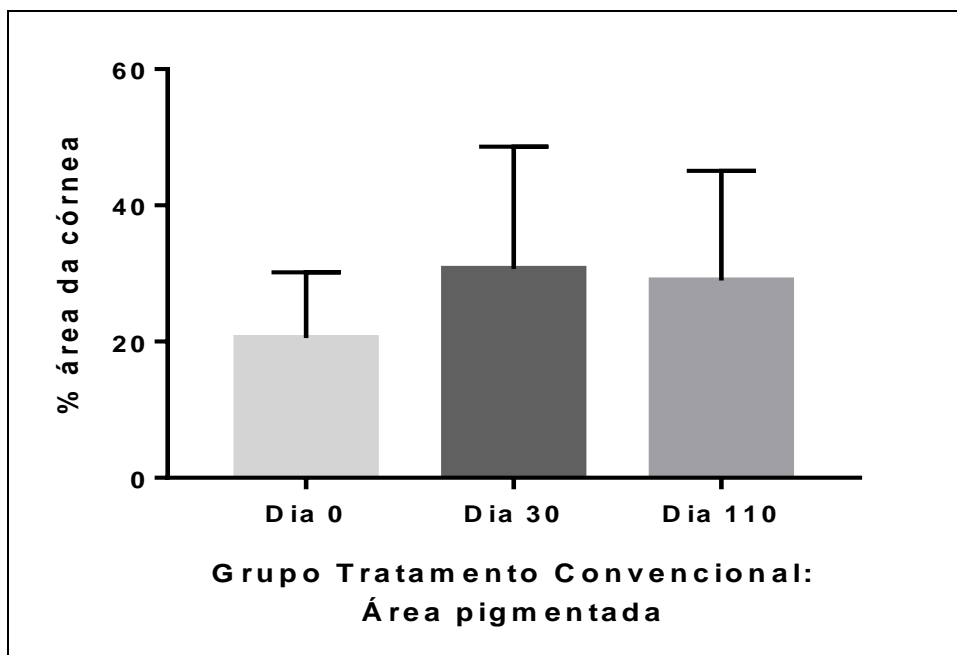


Gráfico 6. Grupo Tratamento convencional: áreas pigmentadas. Comparação entre os dias de seguimento. Sem diferença estatística entre dia 0 e dia 110 ( $p=0,3828$ ). Colunas representam a média e desvio padrão,  $n=8$ .

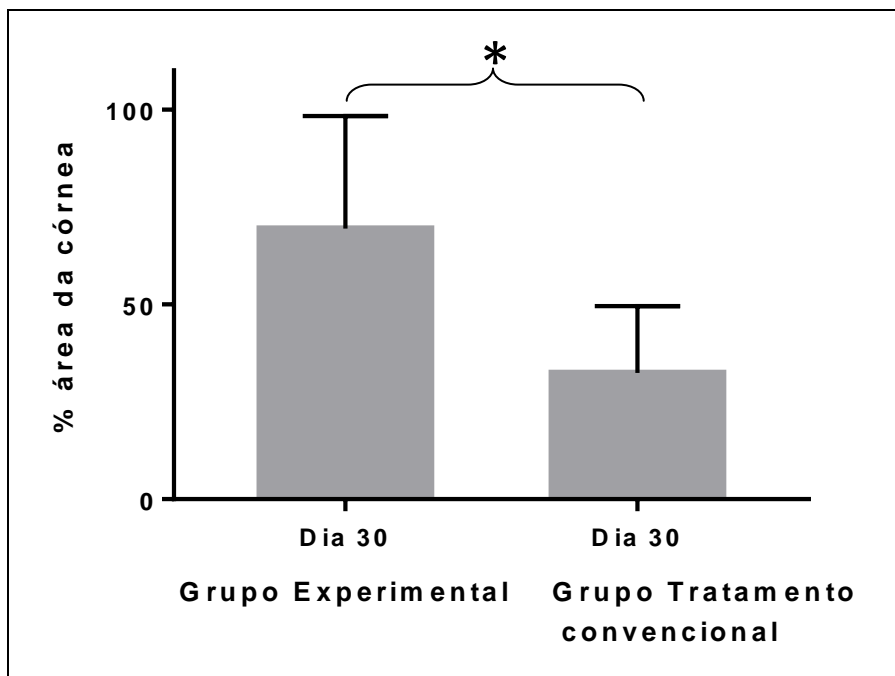


Gráfico 7. Comparação entre os grupos no dia 30, com diferença estatística (\*) entre seus valores ( $p = 0,0426$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ .

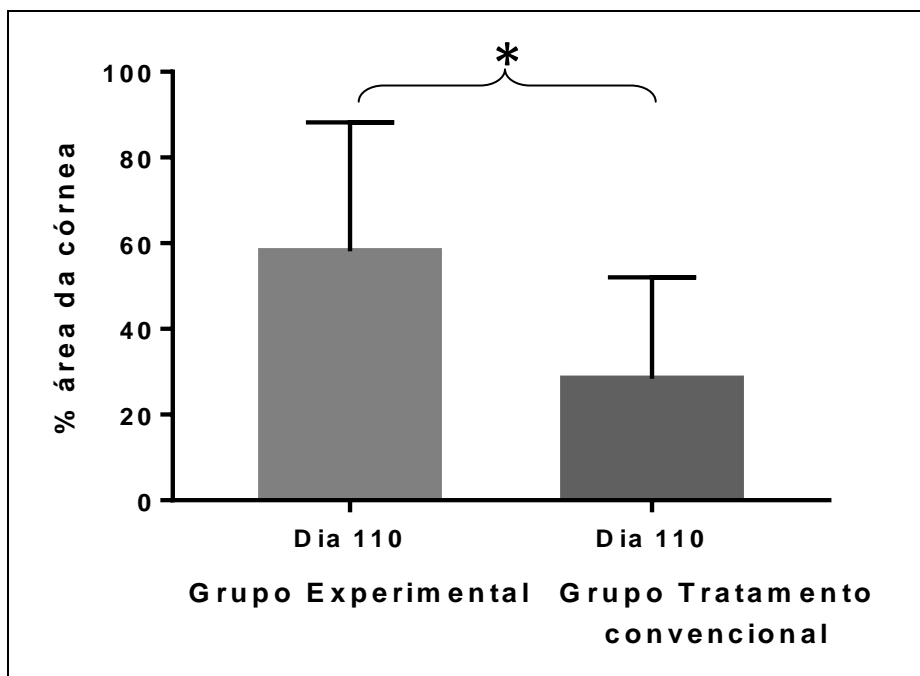


Gráfico 8. Comparação entre os grupos no dia 110, com diferença estatística (\*) entre seus valores ( $p = 0,0263$ ). Colunas representam média e desvio padrão,  $n=8$ .

Tabela.1. Grupo experimental. Medidas quantitativas das áreas afetadas e pigmentadas e qualitativas de densidade e área.

Cão	Idade (anos)	Olho	Vascularização corneal (score de intensidade e número de quadrantes afetados)			Área vascularizada na córnea (%)			Área pigmentada na córnea (%)		
			Início Tratamento	30 dias	110 dias	Início Tratamento <sup>a</sup>	30 dias <sup>a</sup>	110 dias <sup>b</sup>	Início Tratamento <sup>c</sup>	30 dias <sup>c</sup>	110 dias <sup>c</sup>
1	5	OD	++++ / 4	++ / 3	++ / 3	95,20	89,31	91,03	12,64	26,39	14,11
		OE	++++ / 4	++ / 3	++ / 3	93,29	87,46	77,05	10,27	18,82	52,29
2	4	OD	++++ / 3	++ / 2	- / 2	69,93	61,18	33,63	8,73	38,87	36,36
		OE	+++ / 3	++++ / 4	+ / 4	75,01	87,53	45,81	21,36	26,38	40,92
3	10	OD	++++ / 4	++++ / 4	++++ / 2	95,65	95,83	83,62	7,74	8,74	8,75
		OE	+++ / 3	+++ / 4	+++ / 4	89,95	82,84	88,81	82,91	56,97	63,36
4	4	OD	+++ / 1	+++ / 1	+ / 1	30,65	27,19	24,26	12,7	12,10	10,39
		OE	++ / 1	+ / 1	+ / 1	31,27	23,81	20,93	0,74	0,87	1,59

OD = Olho direito; OE = Olho esquerdo. Escore "+" = baixa densidade; "++++" = alta densidade. <sup>a,b,c</sup>= grupos estatísticos.

Tabela.2. Grupo tratamento convencional. Medidas quantitativas das áreas afetadas e pigmentadas e qualitativas de densidade e área.

Cão	Idade (anos)	Olho	Vascularização corneal (score de intensidade e número de quadrantes afetados)			Área vascularizada na córnea (%)			Área pigmentada na córnea (%)		
			Início Tratamento	30 dias	110 dias	Início Tratamento <sup>a</sup>	30 dias <sup>b</sup>	110 dias <sup>c</sup>	Início Tratamento <sup>d</sup>	30 dias <sup>d</sup>	110 dias <sup>d</sup>
A	5	OD	+++/1	*	+/2	42,61	*	57,94	16,91	*	43,10
		OE	++/3	*	+/3	56,34	*	42,06	14,13	*	50,85
B	4	OD	+/3	+/2	++/2	64,24	46,04	15,93	29,28	35,10	38,94
		OE	+/2	+/2	+/1	47,14	35,80	15,93	11,22	27,1	22,89
C	10	OD	++++/4	+/2	++/3	90,43	34,49	14,59	36,02	58,17	23,29
		OE	++++/4	+/3	+/3	80,68	53,59	66,46	29,01	40,26	37,17
D	4	OD	++++/2	-/-	-/-	34,37	11,12	7,49	9,97	13,79	8,09
		OE	++++/1	-/-	-/-	37,99	13,20	6,35	17,65	9,75	7,58

OD = Olho direito; OE = Olho esquerdo. Escore "-" = sem lesão "+" = baixa densidade; "++++" = alta densidade, <sup>a,b,c,d</sup> = grupos estatísticos..

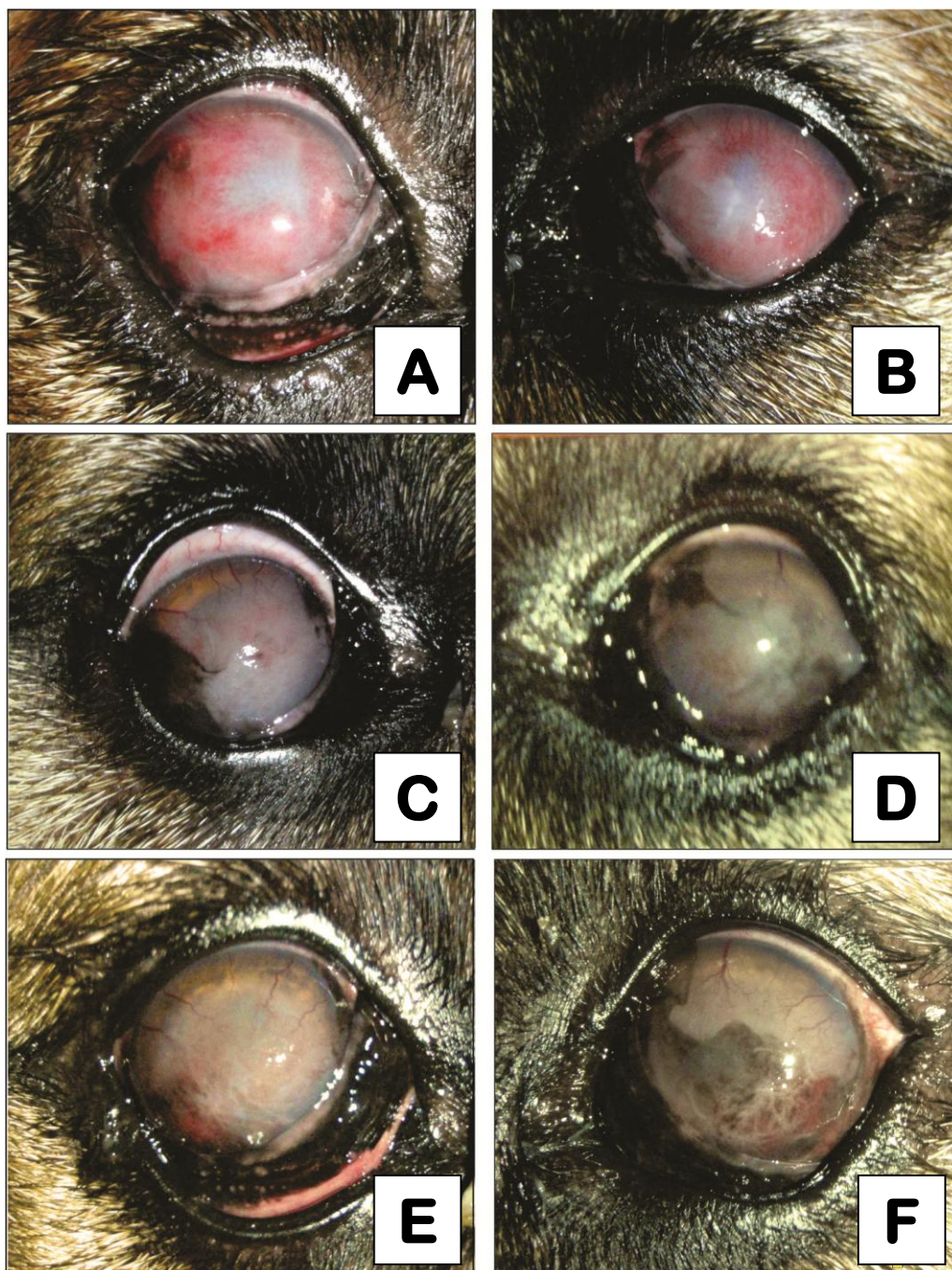


Figura 7. Grupo experimental. Participante #1. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento.

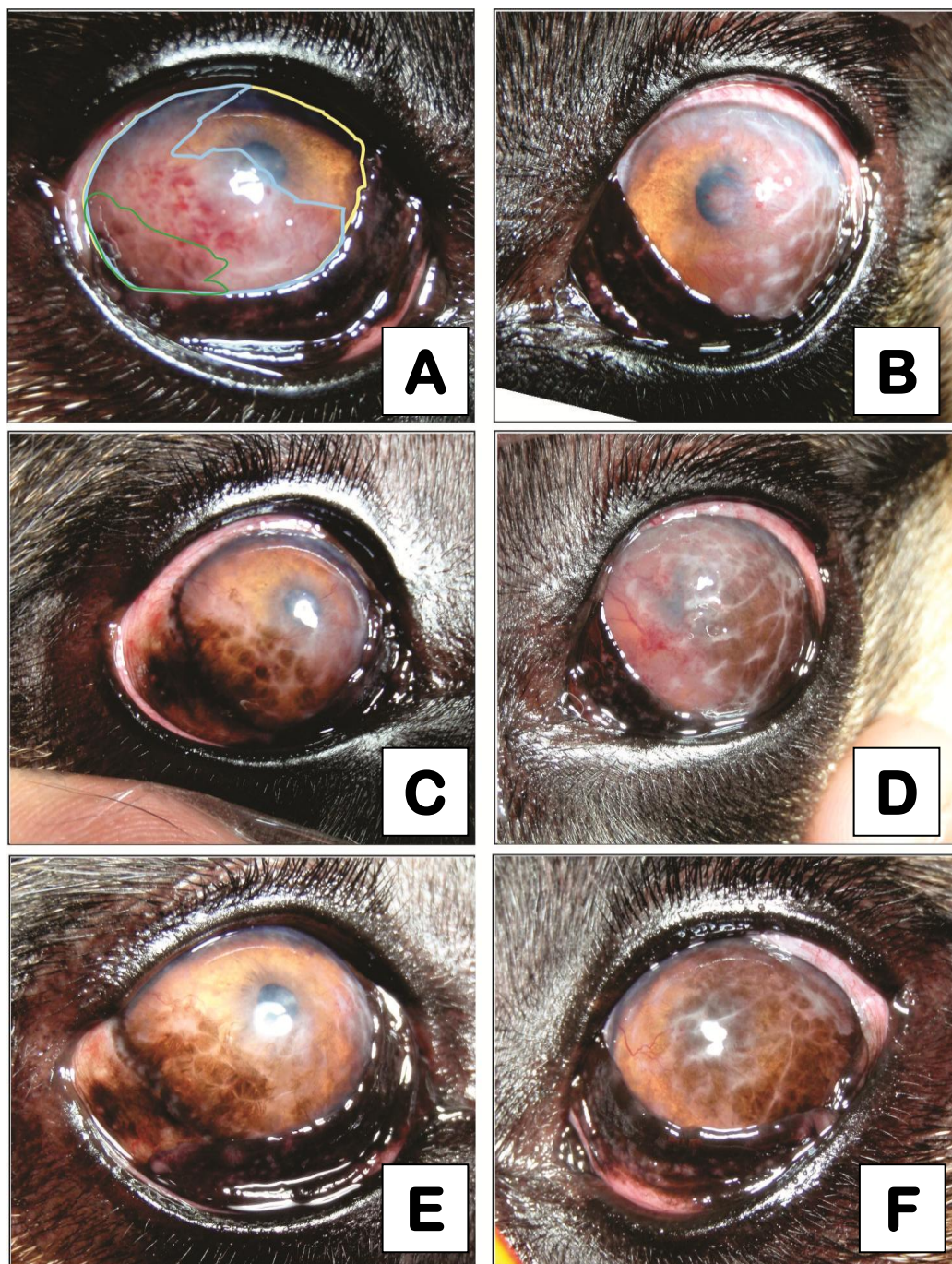


Figura 8. Grupo experimental. Participante #2. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento. Imagem G: linha amarela = córnea total (100%), linha azul = córnea afetada e linha verde = área pigmentada.

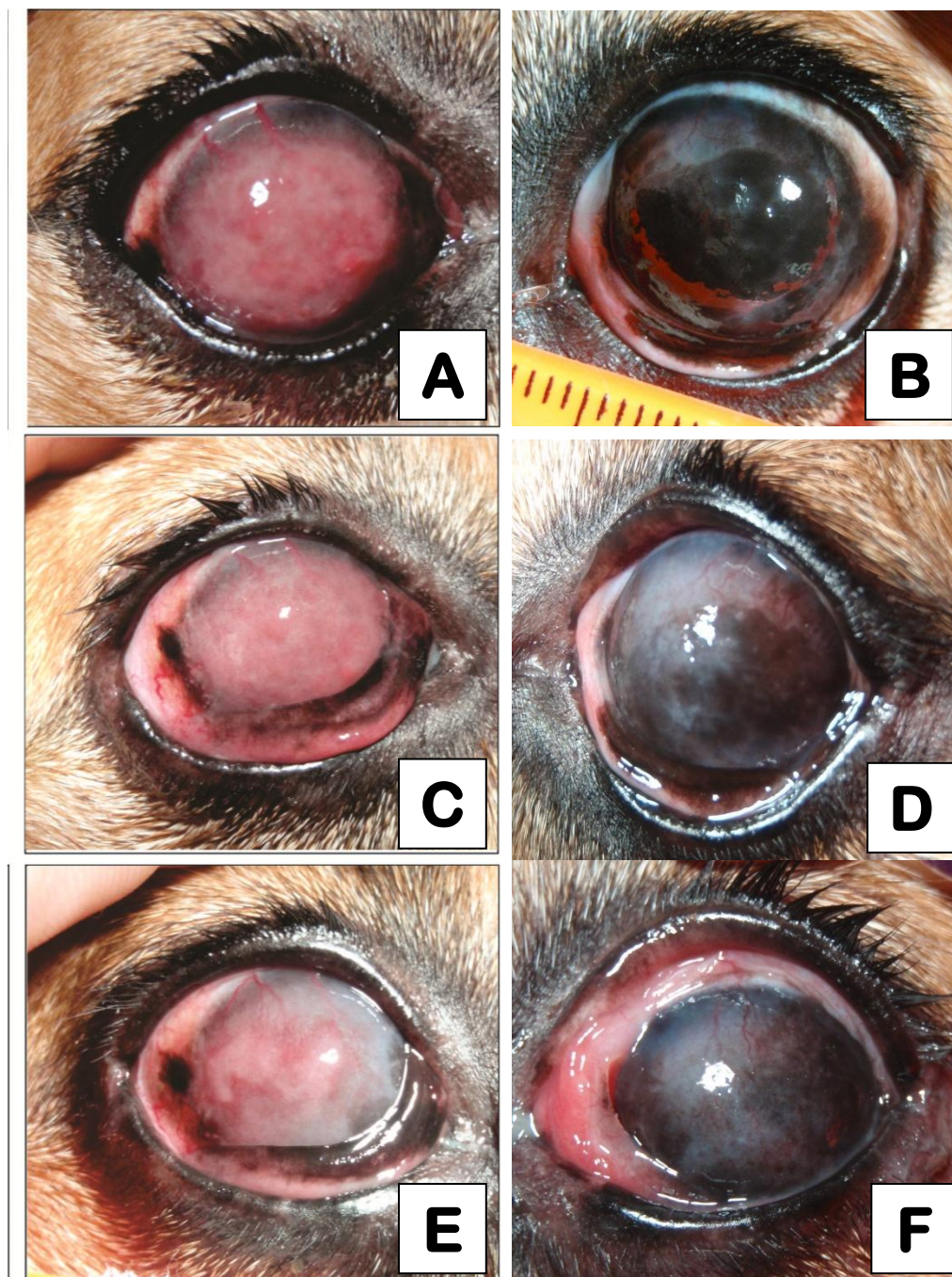


Figura 9. Grupo experimental. Participante #3. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento

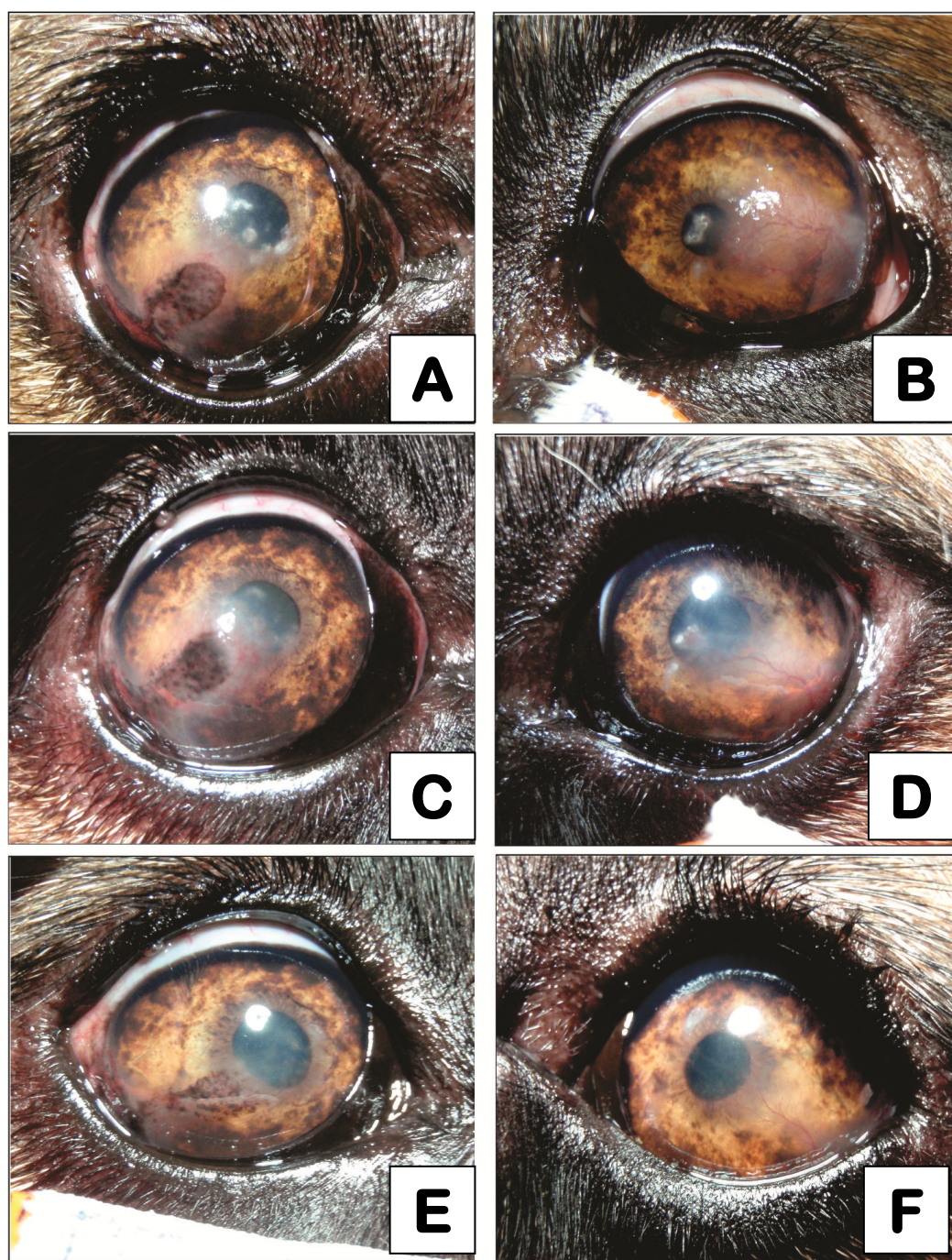


Figura 10. Grupo experimental. Participante #4. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento



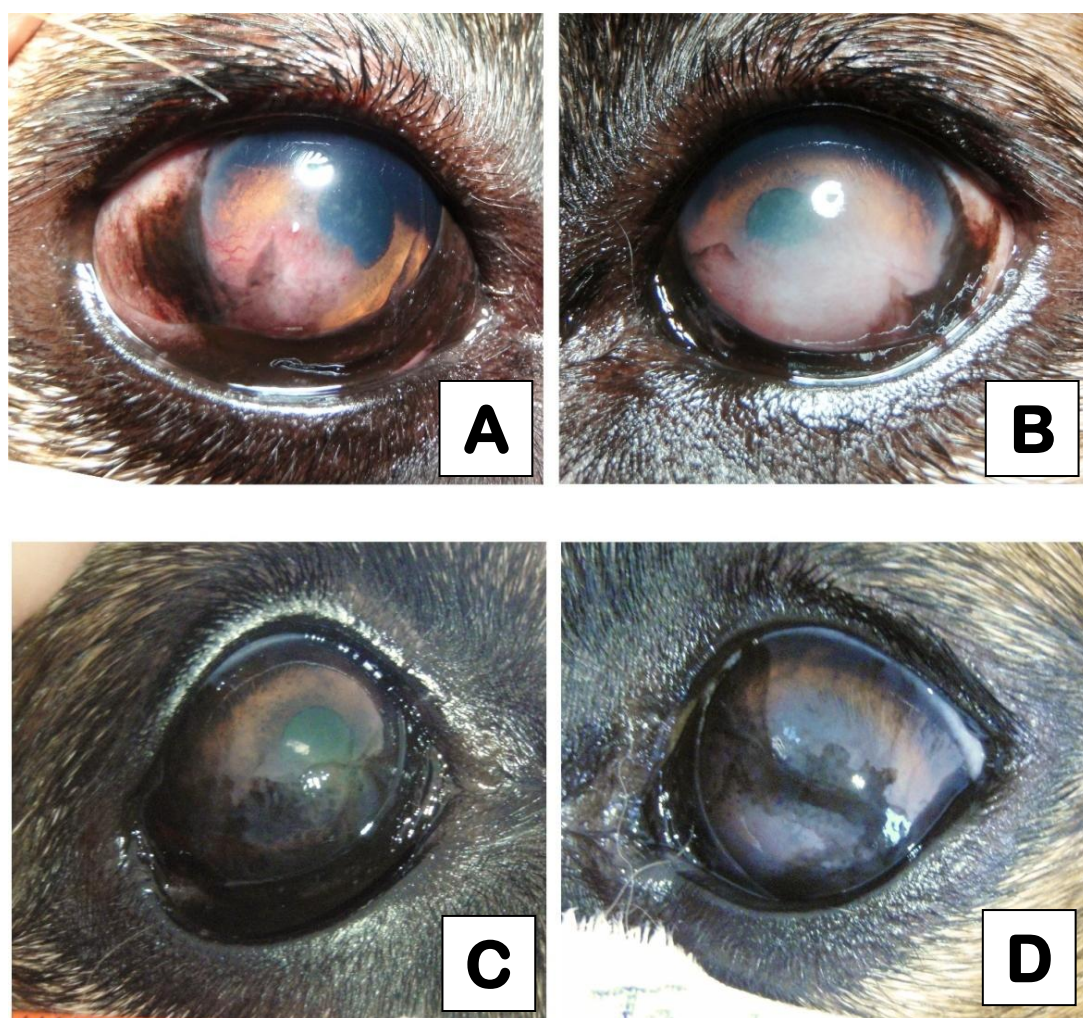


Figura 11. Grupo tratamento convencional. Participante A. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. Proprietário não compareceu no retorno planejado aos 30 dias e C e D aos 110 dias de seguimento.

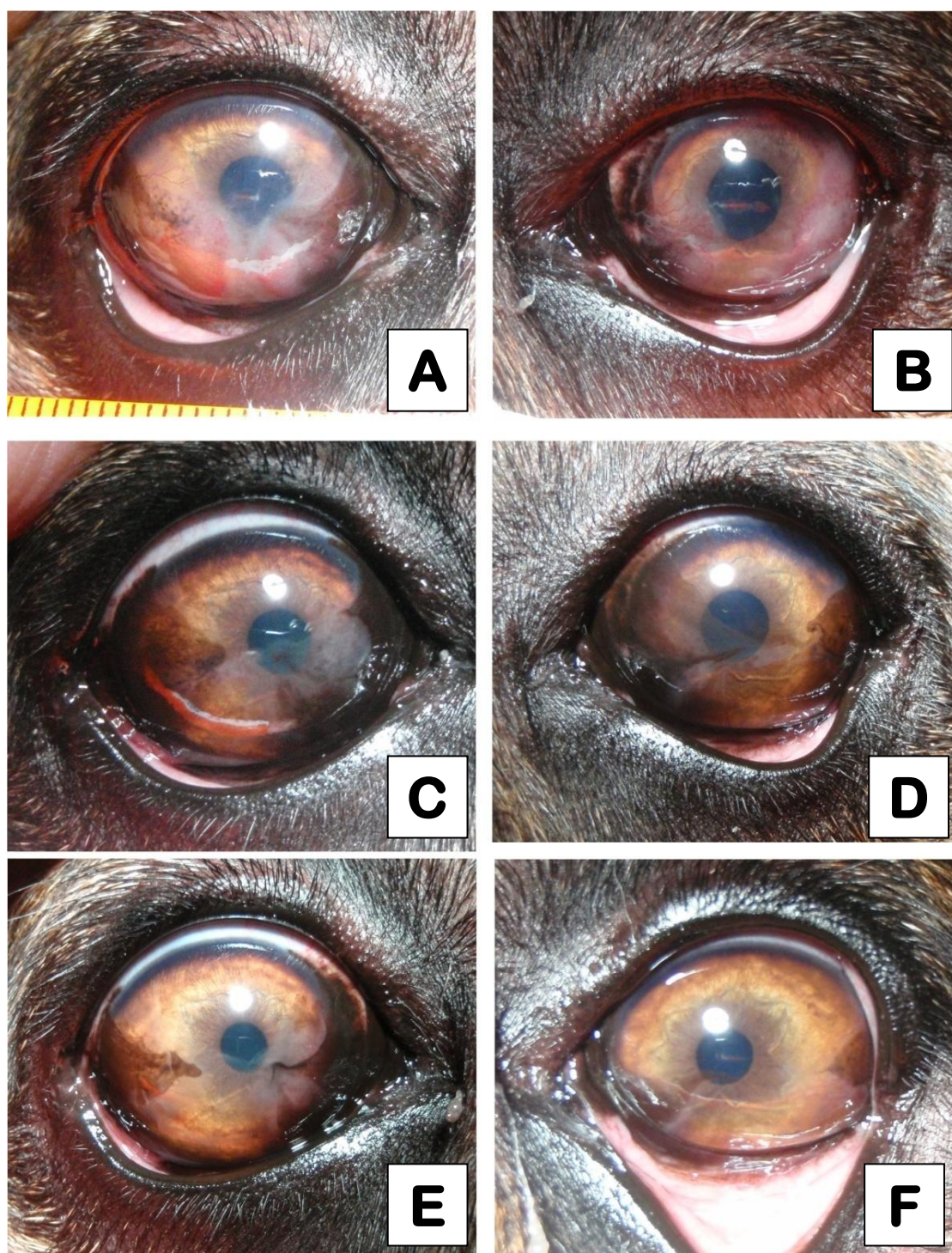


Figura 12. Grupo tratamento convencional. Participante B. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento.

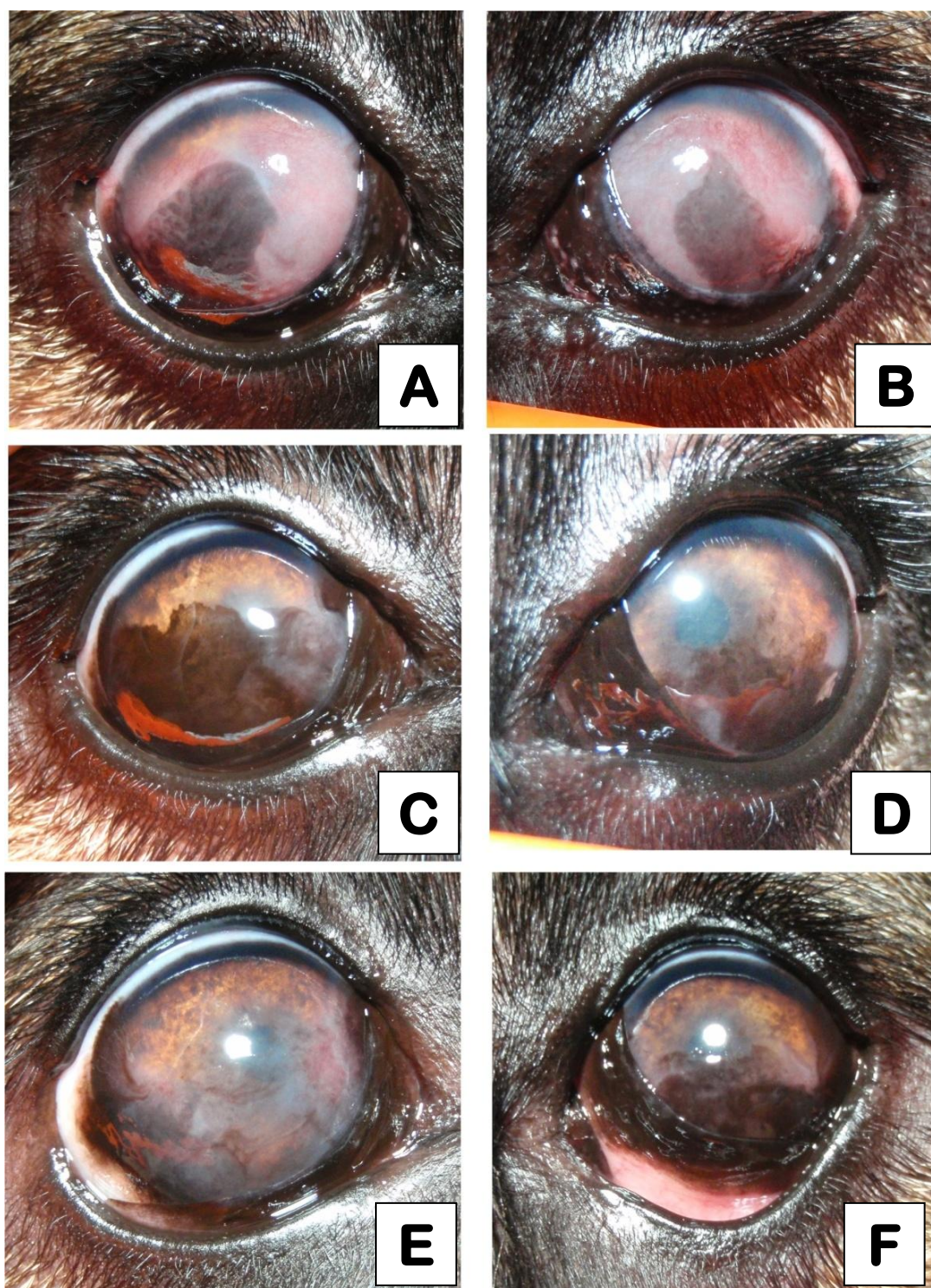


Figura 13. Grupo tratamento convencional. Participante C. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento.

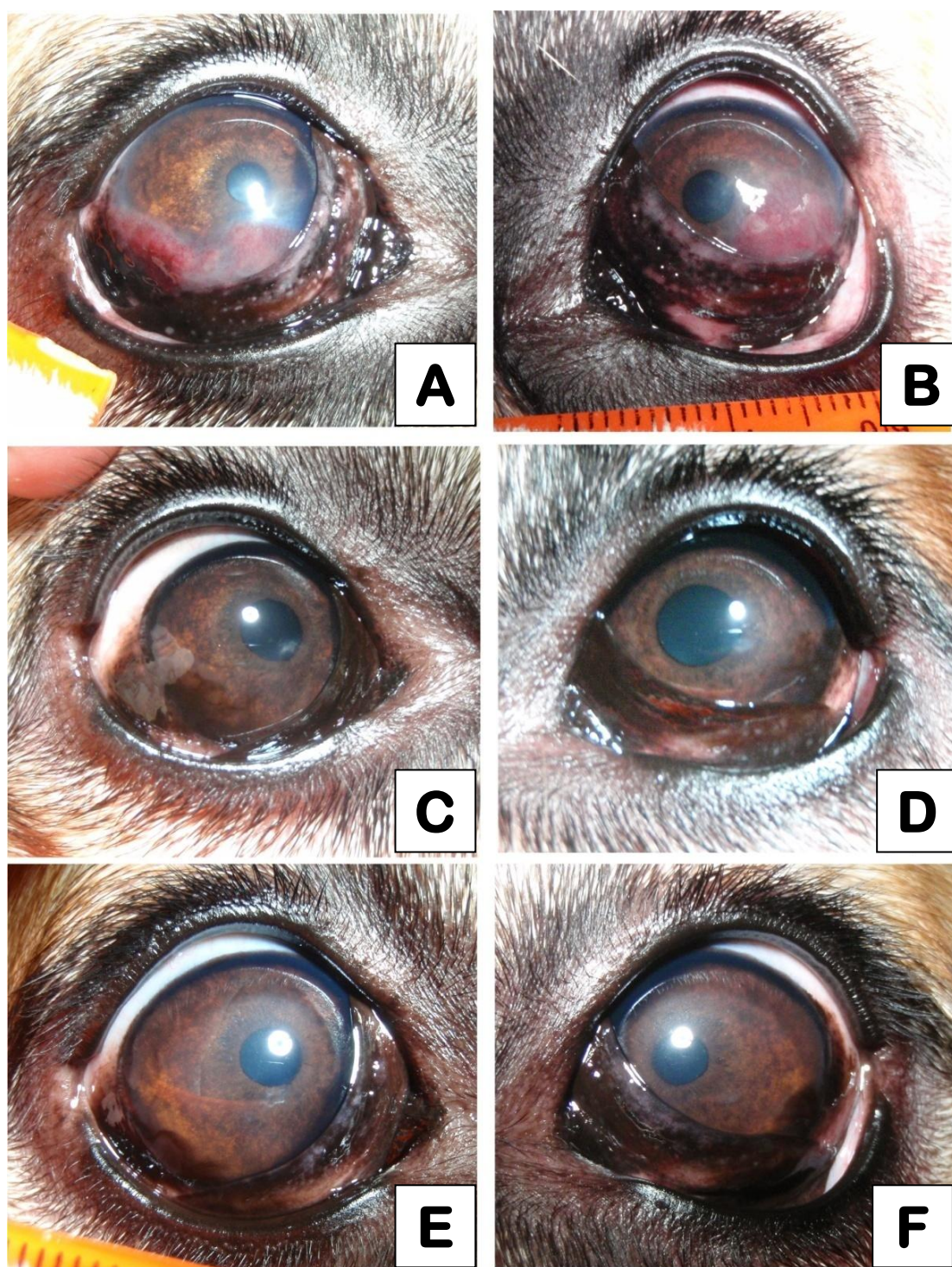


Figura 14. Grupo tratamento convencional. Participante D. Imagens A e B, respectivamente olho direito e olho esquerdo no dia 0. E seqüencialmente C e D aos 30 dias e E e F aos 110 dias de seguimento.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo de uma série de casos com controle, sugere-se o uso seguro do transplante de CTM alogênico através de aplicação perilimbal subconjuntival em cães naturalmente afetados com CSK. Houve melhora significativa na neovascularização no grupo experimental, assim como nos testes visuais clínicos e no comportamento visual, este último segundo relatos dos proprietários. Considerando que nessa patologia não há regressão espontânea da inflamação, os resultados mostram que as CTMs foram capazes de reduzir a neovascularização, e de fato, a compreensão destas ações requer novos estudos para elucidar quais mecanismos quimiotáticos se alteraram nas respostas inflamatórias e na infiltração de células do sistema imune. Após 110 dias de acompanhamento, a redução nas áreas afetadas em relação à neovascularização variou até 36% da área total das córneas e corresponde à média dos valores obtidos em diversos estudos utilizando fármacos.

Na literatura, atualmente a resposta clínica com fármacos é satisfatória. Vários estudos usaram diferentes produtos aplicados diariamente, entre elas ciclosporina A e dexametasona<sup>33</sup>, pimecrolimus<sup>28</sup>, tacrolimus com e sem associação de Dimetil-sulfóxido (DMSO)<sup>22,30</sup> e freqüentemente levam a uma redução da neovascularização e opacidades corneanas dentro de 4 a 6 semanas. Somente o pimecrolimus apresentou redução da pigmentação cicatricial. No entanto, na interrupção de tais medicações utilizadas para controle da doença, a condição patológica recidiva em pouco tempo.

Outras abordagens descritas incluem a sugerida por Allgoewer (2010)<sup>34</sup>, que utilizando radioterapia em associação com ceratectomia superficial, demonstrou que a redução na pigmentação e vascularização foi mantida durante o período de observação de 24 semanas. Opostamente, o uso de lentes de contato com bloqueio de radiação ultravioleta demonstrou ser um protocolo que não produz o efeito terapêutico desejado<sup>29</sup>.

A vantagem que se destaca na terapia com CTM é que não foi necessária a administração tópica diária de medicamentos e que os animais não sofreram

nenhum desconforto no olho ou qualquer outra reação que os proprietários pudessem observar e relatar. O fato de os testes de fluoresceína, de Schirmer e a tonometria serem normais indicam que não houve reações adversas e que a administração subconjuntival dos CTMs não afetou os processos anatômicos e fisiológicos associados a esses testes clínicos.

No Grupo experimental não houve variação estatística na neovascularização entre os dias 0 e 30. Uma possível explicação seria que o primeiro transplante de células-tronco isoladamente não conseguiu produzir um resultado significativo. No entanto, com a segunda aplicação a melhora clínica pode ser notada. Quanto à pigmentação, nos demais estudos para CSK observa-se que não há uma correlação direta entre protocolo e o resultado obtido, de forma que sempre há pacientes com redução da pigmentação enquanto que em outros há crescimento ou variação na densidade do pigmento<sup>22,30,33</sup>. No nosso experimento, o uso de células-tronco, no modelo estudado, não produziu alteração clínica consistente, semelhantemente às descrições da literatura. As áreas com pigmentação aumentaram em grau variável em seis olhos e reduziram em dois olhos. Provavelmente, a pigmentação estaria camuflada pela inflamação e só se tornou visível uma vez que a vascularização havia retrocedido. Também é possível que as células-tronco não afetem a produção de pigmento, ou que o tecido pigmentado não oferece um microambiente adequado para a ação imunomoduladora das células-tronco.

A análise estatística do grupo experimental demonstra que houve mudança significativa da superfície ocular, confirmando que as CTM nesse protocolo, induziram alterações clínicas favoráveis.

Assim se o tratamento com CTM tornar-se viável, há de se considerar que a necessidade de procedimentos sedativos para administrar as CTM pode ser o único fator limitante para pacientes de alto risco.

Analisando os mecanismos da ação imunomoduladora das CTM, outros autores caracterizaram a CSK como uma doença em que as células T CD4 + são o tipo de célula infiltrante predominante na lesão<sup>18</sup> e demonstraram recentemente que as CTM podem modular a atividade dessas células<sup>116,117</sup>. Assim, nossos resultados corroboram essas observações.

A etiologia da CSK ainda é desconhecida, e apesar de haver estudos demonstrando tendência genética<sup>25,118, 119</sup> e as observações atuais mostram que apesar da doença ocorrer na camada estromal da córnea, as citologias da superfície corneana indicaram a presença de conjuntivalização da córnea em todos os pacientes com CSK, é possível supor que esses pacientes podem possuir algum tipo de comprometimento da função de barreira do limbo<sup>120</sup>. Estudos recentes mostraram a importância das células-tronco do limbo na preservação das características especializadas da córnea. Quando há uma deficiência de células-tronco do limbo, a córnea adjacente torna-se opaca, como resultado da conjuntivalização, com aparência irregular e presença de vasos sanguíneos e infiltrado linfocítico. Condições inflamatórias crônicas como CSK podem estar associadas a esta deficiência<sup>121</sup>. Embora a administração subconjuntival de CTM tenha produzido uma melhora clínica na CSK em cães, o processo pelo qual as CTM atua ainda não foi esclarecido.

Paralelamente, o Grupo controle demonstrou que a ação antiinflamatória dos corticostéroides é eficiente para supressão da CSK e promoveu a regressão da neovascularização em tempo semelhante ao descrito por Williams (1995)<sup>33</sup>. O resultado foi mais eficiente em tempo de resposta e intensidade da remissão do processo inflamatório ativo se comparado ao grupo experimental, porém, há de se considerar que os efeitos das CTM espontaneamente interagindo e regulando o microambiente corneano sem interação externa se aproximam ao uso de fármacos conhecidos.

Outros estudos devem ser realizados para investigar os efeitos benéficos e indesejáveis desse novo tratamento potencial. Para este fim, o número de células administradas, o número de aplicações e o intervalo entre as aplicações podem ser melhor determinados e padronizados, a fim de obter um controle ainda maior da resposta terapêutica. Essas variações poderão ser melhor definidas se forem elucidados os mecanismos parácrinos das CTM no microambiente da superfície ocular.

Os mecanismos conhecidos onde as CTM agem regulando de forma negativa a produção de citocinas pró-inflamatórias proveniente das células de defesa do organismo atuam da mesma forma na superfície ocular dos cães? As

CTM secretam interleucinas com ação anti-inflamatória, por exemplo, as interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13<sup>63,69</sup> e também o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), TGF- $\beta$  e PGE2, que, por sua vez, são capazes de suprimirem a produção de IFN- $\gamma$  a partir das células Th1<sup>122</sup>. Investigar se esse mecanismos aconteceram nos olhos dos cães participantes é parte importante dos próximos estudos.

Novos desafios devem, portanto, ser superados, incluindo investigar os mecanismos intrínsecos pelos quais as CTM atuam, identificando as citocinas encontradas na superfície do olho em vários estágios da doença e identificar os receptores de membrana onde essas citocinas atuam, sejam elas nas várias células envolvidos na resposta imune ou nas células nativas na superfície ocular.

Uma vez que estas informações estiverem disponíveis, a CSK ou Síndrome de Ueberreiter<sup>123</sup> e outras doenças da superfície ocular poderão ser melhor compreendidas e poderá até ser possível aos veterinários fornecer a combinação de tratamento ideal para cada paciente em cada estágio da doença.

Este estudo apresenta limitações, principalmente a não randomização entre tratamento convencional e com as CTM, entretanto os grupos eram comparáveis em relação aos parâmetros clínicos avaliados no início do estudo. Apesar do número pequeno de participantes, este foi suficiente para indicar uma melhora clínica em ambos os grupos e sugerir que o grupo de tratamento convencional apresenta uma melhor resposta clínica ao tratamento. As hipóteses dos mecanismos pelos quais houve melhora clínica com o uso das CTM na CSK foge do escopo deste estudo.



## 5. CONCLUSÃO

Geral: O uso subconjuntival de células-tronco mesenquimais alogênicas adultas se mostrou clinicamente seguro para o uso em cães durante o período de seguimento.

Específica: O uso subconjuntival de células-tronco mesenquimais alogênicas adultas promoveu melhora na manifestação clínica de ceratite superficial crônica em cães pastores alemães naturalmente afetados, demonstrado pela redução da intensidade e da extensão das áreas corneanas afetadas sem o uso de associação de fármacos, porém aquém do tratamento convencional com corticoesteróide tópico.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Teixeira RB. Efeitos da aplicação tópica de Ciclosporina "A" a 2% sobre a córnea de cães submetidos a ceratoplastia lamelar com implante de pericárdio eqüino conservado em glicerina: Avaliação clínica e morfológica. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia, Universidade De São Paulo; 2000.
2. Waring GO. Corneal structure and pathophysiology. In: Leibowitz H. Corneal Disorders: Clinical Diagnosis and Management. Philadelphia: Wb Saunders; 1984. p.3-25.
3. Shively JN, Epling GP. Fine structure of the canine eye: Cornea. American Journal of Veterinary Research. 1970; 31(4): 719-22.
4. Helper LC. Diseases and surgery of the cornea and sclera. In: Magrane WG. Magrane'S Canine Ophthalmology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1989. p.102-49.
5. Schoenau LSF, Pippi NL. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: Uma breve revisão. A Hora Veterinária. 1993; 12(72): 49-53.
6. Martin CL. Córnea and Sclera. In: Martin CL. Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine. London: Manson, 2005. p.241-88.
7. Slatter D. Cornea and Esclera. In: Slatter D. Fundamentos de oftalmologia veterinaria. São Paulo: Roca, 2005: p. 283-338.
8. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland SJ, Palay DA. Fundamentals of cornea and external disease. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland SJ, Palay DA. Cornea. St Louis: Mosby Yearbook. 1998. Cd-Rom.
9. Connon CJ, Meek KM. The structure and swelling of corneal scar tissue in penetrating full thickness wounds. Cornea. 2004; 23(2): 165-71.
10. Brooks DE, Ollivier FJ. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2004; 34(3): 611-22.
11. Slatter D. Cornea and Esclera. In: Slatter D. Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1990. p.257-303.
12. Kern TJ. Ulceratite keratitis. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 1990; 20(3): 643-66.
13. Eichenbaum JD. Immunology of the ocular surface. Compendium on Continuing Education for The Practicing Veterinarian. 1987; 9(11): 1101-09.

14. Novak N, Siepmann K, Zierhut M, Bieber T. The good, the bad and the ugly--APCs of the eye. *Trends Immunol.* 2003; 24(11):570-4.
15. Vallochi AL, Commodaro AG, Schwartzman JP, Belfort RJr, Rizzo LV. The Role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18(1-2):135-41.
16. Stolz RA, Connors MS, Gerritsen ME, Abraham NG, Laniado-Schwartzman M. Direct stimulation of limbal microvessel endothelial cell proliferation and capillary formation *in vitro* by a corneal-derived eicosanoid. *American Journal of Pathology.* 1996; 148(1): 129-39.
17. Sansom J, Barnett KC, Neumann W, Schulte NA, Clerc B, Jegou JP, Haas V, Weingarten A. Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: A European clinical field trial. *Veterinary Record.* 1995; 137(20): 504–7.
18. Williams DL. Histological and Immunohistochemical evaluation of canine chronic superficial keratitis. *Research in Veterinary Science.* 1999; 67(2): 191-5.
19. Ledbetter EC, Munger RJ, Ring RD, Scarlett JM. Efficacy of two chondroitin sulfate ophthalmic solutions in the therapy of spontaneous chronic corneal epithelial defects and ulcerative keratitis associated with bullous keratopathy in dogs. *Veterinary Ophthalmology.* 2006; 9(2): 77-87.
20. Peiffer Júnior RL, Wilcock BP, Dubielzig RR, Render JA, Whiteley HE. *Fundamentals of Veterinary Ophthalmic Pathology.* In: Gelatt, K. N. *Veterinary Ophthalmology.* 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. p.355-85.
21. Jin-Hong Chang, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Current Opinions in Ophthalmology.* 2001; 12(4): 242-49.
22. Balicki I. Clinical study on the application of tacrolimus and DMSO in the treatment of chronic superficial keratitis in dogs. *Pol J Vet Sci,* 2012; 15: 667-76.
23. Williams DL. Major histocompatibility class II expression in the normal canine cornea and in canine chronic superficial keratitis. *Veterinary Ophthalmology.* 2005; 8(6):395-400.
24. Drahovska Z, Balicki I, Trbolova A, Mihalova M, Holickova M. A retrospective study of the occurrence of chronic superficial keratitis in 308 German Shepherd dogs: 1999-2010. *Polish journal of veterinary sciences.* 2014; 17: 543-6.
25. Barrientos LS, Zapata G, Crespi JA, Posik DM, Díaz S, It V, Peral-García P, Giovambattista G. A study of the association between chronic superficial keratitis and polymorphisms in the upstream regulatory regions of DLA-DRB1, DLA-DQB1 and DLA-DQA1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 156: 205– 10.

26. Andrew SE, Clippinger TL, Brooks DE, Helmick KE. Penetrating keratoplasty for treatment of corneal protrusion in a great horned owl (*Bubo virginianus*). *Veterinary Ophthalmology*. 2002; 5(3): 201-5.
27. Chavkin MJ, Roberts MS, Salman MD, Severin GA, Scholten NJ. Risk factors for development of chronic superficial keratitis in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1994; 204: 1630-4.
28. Nell B, Walde I, Billich A, Vit P, Meingassner JG. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study. *Vet Ophthalmol*. 2005; 8(1):39–46.
29. Denk N, Fritsche J, Reese S. The effect of UV-blocking contact lenses as a therapy for canine chronic superficial keratitis. *Veterinary ophthalmology*. 2011; 14(3): 186-94.
30. Balicki I, Trbolova A. Clinical evaluation of tacrolimus eye drops for chronic superficial keratitis treatment in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2010; 54: 251-8.
31. Takaaki Hattori, Hiroki Takahashi, Reza Dana. Novel insights into the immunoregulatory function and localization of dendritic cells. *Cornea*. 2016; 35(Suppl 1): 49-54.
32. Chandler HL, Kusewitt DF, Colitz CM. Modulation of matrix metallo-proeinases by ultraviolet radiation in the canine cornea. *Vet Ophthalmol*. 2008; 11:135–44.
33. Williams DL, Hoey AJ, Smitherman P. Comparison of topical cyclosporine and dexamethasone for the treatment of Chronic superficial keratitis in dogs. *Veterinary Record*. 1995; 137(25): 635-9.
34. Allgoewer I, Hoecht S. Radiotherapy for canine chronic superficial keratitis using soft X-rays (15 kV). *Veterinary Ophthalmology*, 2010; 13: 20–5.
35. Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; Mar 15;335(1):2-13. doi: 10.1016/j.mce.2010.04.005.
36. Hall BM. Corticosteroids in autoimmune diseases. *Aust Prescr*. 1999; 22:9-11.
37. Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story *J. Neuroendocrinol*. 2008; 20: 880-4.
38. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD, Lightman SL. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97: 5645–50.

39. Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. Glucocorticoids and 11-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004; 59: 359–93.
40. Kadmiel M, Janoshazi A, Xu X, Cidlowski JA. Glucocorticoid action in human corneal epithelial cells establishes roles for corticosteroids in wound healing and barrier function of the eye. *Exp Eye Res.* 2016; 152:10-33.
41. Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* 1985; 19: 209–52.
42. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* 2004; 125: 697–706.
43. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato ACB. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J.* 1994; 13: 4087–95.
44. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 2009; 23: 3649–58.
45. van Tilborg MA, Lefstin JA, Kruiskamp M, Teuben J, Boelens R, Yamamoto KR, Kaptein R. Mutations in the glucocorticoid receptor DNA-binding domain mimic an allosteric effect of DNA. *J. Mol. Biol.* 2000; 301: 947–58.
46. Purton JF, Monk JA, Liddicoat DR, Kyparissoudis K, Sakkal S, Richardson SJ, Godfrey DI, Cole TJ. Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death. *J. Immunol.* 2004; 173: 3816–24.
47. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 1459–63.
48. McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL, Weiss JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Rev.* 1997; 23: 79–133.
49. Rook GA, Hernandez-Pando R, Lightman SL. Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunol. Today.* 1994; 15: 301-3.
50. Freeman L, Hewison M, Hughes SV, Evans KN, Hardie D, Means TK, Chakraverty R. Expression of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood.* 2005; 106: 2042–9.

51. Wenger R. Synthesis of cyclosporine and analogues: Structure, Activity, Relationships of New Cyclosporine Derivates. *Transplantation Proceedings*: 1983; 15: 2230-41. Supplement 1.
52. White JV. Cyclosporine: Prototype of a T-Cell selective immunosuppressant. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1986; 189(5): 566-70.
53. Hutchinson I. Transplante e rejeição. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Imunologia*. 5. ed. Great Britain: Mosby International; 1999. p.353-66.
54. Weller I, Lockwood CM, Chandra RK. Imunodeficiências secundárias. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Imunologia*. 5<sup>th</sup> ed. Great Britain: Mosby International: 1999. p. 293-300.
55. Grassberger M, Baumruker T, Enz A, Hiestand P, Hultsch T, Kalthoff F, Schuler W, Schulz M, Werner FJ, Winiski A, Wolff B, Zenke G. A novel anti-inflammatory drug, Sdz Asm 981, for the treatment of skin diseases: *In Vitro Pharmacology*. *British Journal of Dermatology*. 1999; 141(2): 264–73.
56. Eichenfield LF, Beck L. Elidel (Pimecrolimus) cream 1%: a non-steroidal topical agent for the treatment of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 111(5): 1153-68.
57. Castro APBM. Inibidores de calcineurina no tratamento das dermatoses alérgicas. *Jornal de Pediatria, Rio De Janeiro*. 2006: 82(5): 166-72.
58. Alvarado SA. Stem cells: time to check our premises. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(1): 25-9.
59. Wagayama T. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 26: 14984-89.
60. Li L, Xie T. Stem Cell Niche: Structure and Function. *Stem Cells*. 2008; 1: 605-31.
61. Heo J, Ahn EK, Jeong HG, Kim YH, Leem SH, Lee SJ, et al. Transcriptional characterization of Wnt pathway during sequential hepatic differentiation of human embryonic stem cells and adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434(2):235-40. Epub 2013 Mar 28.
62. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20(5-6):419-27. Epub 2009 Nov 18.
63. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Cells-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Engineering*. 2005; 11: 1198-1211.

64. Monteiro BG, et al Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell Prolif.* 2009; 4: 587-594.
65. Martinez AM, Goulart CO, Ramalho Bdos S, Oliveira JT, Almeida FM. Neurotrauma and mesenchymal stem cells treatment: From experimental studies to clinical trials. *World J Stem Cells.* 2014; 6(2):179-94.
66. Pelizzo G, Avanzini MA, Icaro Cornaglia A, Osti M, Romano P, Avolio L, et al. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *J Transl Med.* 2015; 13: 219.
67. Pileggi A, Xu X, Tan J, Ricordi C. Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013; 18(6):672-81.
68. Webster RA, Blaber SP, Herbert BR, Wilkins MR, Vesey G. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *N Z Vet J.* 2012; 60(5):265-72. Epub 2012 May 31.
69. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y. Transplantation of mesenchymal stem cells improve cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2005; 112(8): 1128-35.
70. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006; 98: 1076-84.
71. Shalhoub J, Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *Journal of Inflammation.* 2011; 8: 9.
72. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 2009; 37:1445-53.
73. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med.* 2014; 46: e70. doi: 10.1038/emm.2013.135.
74. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing CTMs, whereas CTMs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006; 107(4): 1484-90. Epub 2005 Oct 20.
75. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9252.

76. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000; 80(5):617-53.
77. Watson RW. Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4(1):97-104.
78. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells.* 2008; 26(1): 151-62. Epub 2007 Oct 11.
79. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. *Cell Biol Int.* 2011; 35(12):1247-51.
80. Brown JM, Nemeth K, Kushnir-Sukhov NM, Metcalfe DD, Mezey E. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41:526-34.
81. Araujo FS. The immunomodulation of CD4+ and CD8+ T cells induced by mesenchymal stem cell responses. [Doutorado]. Ribeirão Preto, 2010; 157p.
82. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99(10):3838-43.
83. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 4: 1815-22.
84. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005; 106(5): 1755-61. Epub 2005 May 19.
85. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008; 2:141-50.
86. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol.* 2009; 182(10): 5994-6002.
87. Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci* 2012; 15:862-70.



88. Bartolomew D, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 2002; 30(1):42-8.
89. Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Góczy E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*. 2008; 26(1):244-53. Epub 2007 Oct 11.
90. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(4):1175-86.
91. Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyó JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol*. 2012; 3:212.
92. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008; 93(9):1301-9. Epub 2008 Jul 18.
93. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006; 107(1):367-72. Epub 2005 Sep 1.
94. Ge W, Jiang J, Baroja ML, Arp J, Zassoko R, Liu W, et al. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transplant*. 2009; 9(8):1760-72. Epub 2009 Jun 26.
95. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006; 24(1):74-85. Epub 2005 Aug 11.
96. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006; 177(4): 2080-7.
97. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem cells and development* 2004; 13(3): 263-71.
98. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007; 83(1): 71-6. Erratum in *Transplantation*. 2007 Jun 15; 83(11): 1524.

99. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(42): 17384-9. Epub 2011 Sep 29.
100. Zhang Y, Cai W, Huang Q, Gu Y, Shi Y, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology* 2014; 59:671-82.
101. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 5: 641-50.
102. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-76. Epub 2006 Aug 10.
103. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119: 2004-13.
104. Acquistapace A, et al. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through a partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells*. 2011; 5: 812-24.
105. Bae JS, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells*. 2007; 5: 1307-16.
106. Souza R. et al. Células-Tronco Mesenquimais: Células Ideais para a Regeneração Cardíaca? *Rev Bras Cardiol Invasiva*. 2010; 18(3): 344-53.
107. LaFlamme A, et al. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Pathology*. 2007; 2: 307-39.
108. Shen-Yang T. et al. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study. *World J Transplant*. 2014; 4(3): 196-205
109. Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(8): 1423-9.
110. Schena F, Gambini C, Gregorio A, Mosconi M, Reverberi D, Gattorno M, et al. Interferon- $\gamma$ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(9): 2776-86.

111. Chang JW, Hung SP, Wu HH, Wu WM, Yang AH, Tsai HL, et al. Therapeutic effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis. *Cell Transplant*. 2011; 20(2): 245-57. Epub 2010 Aug 18.
112. Choi EW, Shin IS, Park SY, Park JH, Kim JS, Yoon EJ, et al. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(1): 243-53.
113. Villatoro AJ, Fernández V, Claros S, Rico-Lhanos GA, Becerra J, Andrades JA. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *BioMed Research International*. 2015; Article ID 527926, 10 pages.
114. Bittencourt MK, Barros MA, Martins JF, Vasconcellos JP, Morais BP, Pompeia C. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca *Cell Medicine*, 2016; 8(3): 63–77.
115. Villatoro AJ, Claros S, Fernandez V, Alcoholado C, et al. Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment *BMC Veterinary Research*. 2018; 14:116. doi.org/10.1186/s12917-018-1413-4.
116. Machado CV, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2013; 35(1): 62–67.
117. Lee MJ, Ko AY, Ko JH, Lee HJ, Kim MK, Wee WR. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015; 23(1): 139-46.
- 118 Cheng S, Wigney D, Haase B, Wade CM. Inheritance of chronic superficial keratitis in Australian Greyhounds. *Anim Genet*. 2016; 47(5): 629. doi: 10.1111/age.12446. Epub 2016 May 5.
119. Jokinen P, Rusanen E, Kennedy L, Lohi H. MHC class II risk haplotype associated with Canine chronic superficial keratitis in German Shepherd dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2011; 140 (1–2): 37–41.
120. Sanchez RF, Daniels JT. Mini-Review: Limbal Stem Cells Deficiency in Companion Animals: Time to Give Something Back? *Curr Eye Res*. 2016 Apr;41(4):425-32. doi: 10.3109/02713683.2015.1056801. Epub 2015 Aug 19.

121. Ledbetter EC, Marfurt CF, Dubielzig RR. Metaherpetic corneal disease in a dog associated with partial limbal stem cell deficiency and neurotrophic keratitis. *Vet Ophthalmol.* 2013; 16(4): 282-8.
122. Abbas Abul K, Lichtman H. Andrew, Pillai Shiv. *Imunologia celular e molecular.* 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
123. Überreiter O. Eine besondere keratitisform (*Keratitis Superficialis Chronica*) Beim Hunde. Wiener

## 7. APÊNDICE

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ao ler, entender e assinar este documento de esclarecimento, eu, abaixo assinado, \_\_\_\_\_ (nome completo e em letra legível do participante), portadora do RG número \_\_\_\_\_ e CPF número \_\_\_\_\_, responsável pelo animal \_\_\_\_\_, ( ) macho ( ) fêmea, espécie canina, raça Pastor Alemão cor \_\_\_\_\_ idade \_\_\_\_\_, doravante serei chamado apenas participante, nos termos deste Termo de Consentimento, **permitir e autorizar** que o cão acima citado participe do estudo **“Uso clínico de células tronco mesenquimais de tecido adiposo em caninos portadores de ceratite superficial crônica”** aprovado pelo comitê de ética do IB da UNICAMP sob o número 3636-1 do protocolo CEUA, sob a responsabilidade do Pesquisador **Dr Alexandre Luiz Pereira CRMV SP 9379 e da empresa Regenera Medicina Veterinária Avançada Ltda, localizada na Rua Bagaçu, 26 - Alphaville Empresarial Edifício Business Center II Sala 101 - Campinas, inscrita no CNPJ 15.700.380/0001-44), na qualidade de Banco de Células-Tronco Animais e detentora de tecnologia na Área de Engenharia Tecidual e Aplicação de Células-Tronco, a proceder a aplicação das Células-Tronco no animal em questão.**

Este estudo será realizado para avaliar o **efeito da terapia com células tronco mesenquimais aplicadas por via subconjuntival em cães portadores de Ceratite superficial crônica (CSK)**. Não envolve risco algum conhecido para o participante. Além do alto custo das medicações destinadas ao tratamento de CSC, sabe-se que o tratamento instituído, apenas ameniza os sinais clínicos não sendo curativo, devendo ser continuado por toda a vida do animal. Diante da necessidade de estudos relacionados à reparação tecidual da córnea e da representatividade do tema dentro das discussões científicas na atualidade, propõe-se a utilização de células-tronco como uma nova opção terapêutica para a CSK. Esperamos **comprovar a utilidade da terapia com células tronco no tratamento da doença em questão**, o que trará benefício ao participante. Métodos adicionais alternativos de tratamento deste problema, de comprovada eficácia, como a utilização de colírios imunossupressores no olho, não terão sua

utilização permitida pelo participante no período do estudo . O participante será submetido a exame oftalmológico completo prévio ao estudo , exames complementares (solicitados pelo veterinário responsável e executados pelo proprietário em laboratórios de análises clínicas e de imagem terceirizados ), exames de diagnóstico específico da CSK de caráter não -invasivo (não irão causar nenhum dano ao olho ) e fotografia para documentação . Será aplicada a terapia com células -tronco, sem qualquer ônus . Os animais deverão passar por uma leve sedação sob a supervisão de um anestesiologista veterinário, a qual pode conter alguns riscos a saúde conforme explicado ao proprietário . Os animais desta pesquisa não serão submetidos a sofrimento ou desconforto evitável , para isso será realizado um planejamento experimental cuidadoso e observação constante do pesquisador responsável . Não existe previsão de qualquer gasto por parte do participante e não caberá ao pesquisador responsabilidade alguma de ressarcimento ou indenização de gastos extras por parte do participante (o transporte das células e para a realização dos exames e dos retornos será de inteira responsabilidade do participante ). Comprometo-me a comparecer com o animal nas datas agendadas para a coleta de dados inicial e para os exames de acompanhamento mensal (retornos) até o término do estudo (previsão de 6 meses). Esclarecimentos adicionais poderão ser solicitados ao pesquisador por parte do participante a qualquer momento durante o estudo e este estará livre para retirar ou recusar o consentimento sem penalização . Os dados obtidos no estudo serão utilizados apenas após a total compreensão deste Termo de Consentimento por parte do participante e só serão utilizados dentro do meio acadêmico, com provável publicação , resguardado o caráter confidencial (sigilo e privacidade) e omitido sempre o nome do participante.

Declaro ter entendido em detalhes o Termo de Consentimento do estudo acima descrito e concordo em dele participar

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante maior  
de idade e RG

Atibaia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.



Alexandre Luiz Pereira  
CPF: 0379  
Médico

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável  
RG

## 8. ANEXO



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Uso clínico de células tronco mesenquimais em caninos portadores de ceratite superficial crônica" (protocolo nº 3636-1), sob a responsabilidade de Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos / Alexandre Luiz Pereira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

*Por se tratar de experimento realizado junto a clínicas veterinárias e com animais particulares, a CEUA/UNICAMP declara que a manipulação animal que consta do protocolo está em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e que os experimentos devem ser acompanhados por veterinário responsável e o pesquisador deve ter em mãos os termos de consentimento dos proprietários dos animais.*

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Campinas, 06 de fevereiro de 2015.

Fátima Alonso  
Secretária Executiva