



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

RAQUEL MELLO FERNÁNDEZ CARNEIRO

USO TÓPICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES COM
CERATOCONJUNTIVITE SECA (CCS)

Belém

2018

RAQUEL MELLO FERNÁNDEZ CARNEIRO

**USO TÓPICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES COM
CERATOCONJUNTIVITE SECA (CCS)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração:

Saúde Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Érika Renata Branco

Belém

2018

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal Rural da Amazônia

Fernández Carneiro, Raquel Mello

Uso tópico de células-tronco mesenquimais em cães com ceratoconjuntivite seca
(CCS) / Raquel Mello Fernández Carneiro. - 2018.
69 f.

Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e
Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2018.
Orientador: Dr. Érika Renata Branco

1. Cães . 2. Cães - Ressecamento ocular. 3. Cães - Células-tronco. I. Branco, Érika
Renata (*orient.*) II. Título.

CDD- 636.7

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: FERNÁNDEZ, Raquel Mello; FERNÁNDEZ CARNEIRO, Raquel Mello. Título: Uso tópico de células-tronco mesenquimais em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS).

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Data da aprovação: 22/02/2018

Banca Examinadora

_____ Orientadora e Presidente

Profa. Dra. Érika Renata Branco

Instituto da Saúde e Produção Animal/Universidade Federal Rural da Amazônia



_____ Membro Titular

Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP e do Departamento de Microbiologia do ICB-USP

_____ Membro Titular

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Instituto Evandro Chagas

_____ Membro Titular

Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

Universidade Federal Rural da Amazônia

_____ Suplente

Profa. Dra. Marcella Mergulhão Tagliarini

Instituto Evandro Chagas

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Uso de células-tronco como terapia alternativa para tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães*”, registrada com o nº de protocolo 027/2016 (CEUA) e 23084.007991/2016-40 (UFRA), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Érika Branco que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.099, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia, em reunião de 31/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2016 a 31/05/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis familiaris</i> / SRD – CRD
Nº de animais	20
Peso/Idade	A partir de 1kg / 6 meses a 14 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Setor de Oftalmologia e Clínica Médica do Hospital Veterinário “Prof. Mário Dias Teixeira” – UFRA

Belém, 01 de setembro de 2016.



Profª Drª Maria Cristina Manno
Coordenadora CEUA UFRA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montesa, Belém – PA, CEP: 66.077-901
Contatos: (11)210-5185 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua



AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora **Dr^a. Érika Branco**, pelos ensinamentos compartilhados, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade, pela paciência, pela amizade, pelo incentivo constante, e por não medir esforços para que este trabalho acontecesse da melhor maneira possível, possibilitando um enorme aprendizado e crescimento profissional. Muitíssimo obrigada!

À Professora **Dr^a. Ana Rita de Lima**, minha co-orientadora, por todo carinho com que me recebeu, por todas as contribuições prestadas no desenvolvimento do trabalho, pelo conhecimento compartilhado, pela amizade, pela disponibilidade em auxiliar e contribuir sempre. Muito obrigada!

Ao Professor **Dr^o. Edivaldo Herculano de Oliveira**, pelo acolhimento em seu laboratório, pela oportunidade, e sobretudo, pelo aprendizado que me proporcionou no decorrer deste estudo. Sem sua contribuição não teríamos conseguido. Muito obrigada.

À toda equipe do **Laboratório de Cultivo de Tecidos e Citogenética**, pela forma amigável com que me receberam e pelo conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos e pelo apoio constante. Em especial, agradeço a Michele, Michel e Carol pela disponibilidade, paciência e prontidão em ajudar na execução deste trabalho.

Aos **Amigos e companheiros de “Células”**, José Gabriel e Luciana. Em especial a **Luane**, por toda paciência e prontidão ao ensinar e compartilhar seus conhecimentos, sem seu apoio nada disto seria possível, foi um prazer enorme. Muitíssimo obrigada.

À toda equipe do **HOVET/UFRA**, pela parceria, pelos conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade e comprometimento de sempre para que este trabalho acontecesse. Em especial queria agradecer ao **Dr. Gilvando, Dr. Luis Fernando, Dra. Sinerey, Dra. Marcia, Herika, Flavia e Andrey** por toda contribuição e amizade, sem vocês nada disso seria possível.

Ao Professor **Ednaldo Filho**, pela prontidão e disponibilidade para contribuir com esta pesquisa. Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos.

Ao Amigo e Professor **Drº. Rinaldo Viana**, por toda contribuição na construção da minha vida acadêmica desde a graduação, por nunca me desamparar e por estar sempre disposto a contribuir para meu crescimento profissional. Muito obrigada pela amizade e pelo carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante a realização desta pesquisa.

À minha **Família**, minha mãe Suely, meu pai Huáscar, meus irmãos Huáscar e Sue Ellen, meus sobrinhos Gabriel, Bernardo e Leonardo, minha afilhada Laura, pela certeza absoluta de ter sempre com quem contar, pelo amor incondicional que cuida, ampara, revigora e orienta em todos os momentos. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu **Marido**, Ronny, pelo apoio incondicional, pelo amor e dedicação constantes, pelo companheirismo, por entender minha ausência e meu cansaço sempre me dando forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis. Amo você.

À minha filha canina **Mel**, meu presente de Deus, pelo amor incondicional e verdadeiro.

Aos **Amigos** de todas as horas, Fernanda, Ingrid, Fabiola, Priscila e Inaê por todo apoio, carinho e incentivo tanto pessoal quanto profissional. Obrigada por acreditarem em mim.

E a todos os meus **amigos Vet's e "ufranianos"**, pelo companheirismo, pelo apoio, pelos aprendizados compartilhados e pela torcida durante toda minha jornada desde a graduação até aqui, vocês não fazem ideia da importância que tiveram para que tudo isso acontecesse.

RESUMO

FERNÁNDEZ CARNEIRO, R. M. **Uso tópico de células-tronco mesenquimais em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS).** [Topical use of mesenchymal stem cells in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS).] Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará. 2018.

A Ceratoconjuntivite Seca (CCS) é uma condição multifatorial que acarreta em desordem na produção de lágrimas, resultando em sinais clássicos como: ressecamento ocular, hiperemia conjuntival, incômodo, dor, hiperpigmentação, neovascularização, secreção mucosa ou mucopurulenta, podendo ou não haver presença de úlceras. No tratamento convencional normalmente são utilizados fármacos imunossupressores, administrados por longos períodos, porém possuem resultados limitados. Desta forma, a necessidade de se buscar novos tratamentos, que visem reparar e restaurar a funcionalidade da glândula lacrimal comprometida é um dos principais desafios no campo da medicina veterinária. Diante do exposto, foram utilizados quatro cães (CCS-1, CCS-2, CCS-3 e CCS-4) acometidos bilateralmente pela Ceratoconjuntivite Seca, adultos, que receberam células-tronco autólogas, instiladas em cada olho, recebendo 3 aplicações, com intervalo de 30 dias cada uma e sendo avaliados semanalmente quanto a evolução clínica e a produção lacrimal, por meio do Teste de Schirmer. Inicialmente houve redução dos sinais clínicos da doença, com melhora significativa durante todo o período de avaliação ($p < 0,05$), apresentando queda acentuada da secreção ocular, melhora quanto a opacidade e vascularização da córnea, e aumento significativo da produção lacrimal ($p < 0,05$). No entanto, o custo benefício precisa ser melhor avaliado visto que o uso de células, assim como o tratamento convencional, se mostra limitado, podendo não ser duradouro quando se trata de animais com estágio avançado da doença, o que pode ter influenciado diretamente nos resultados encontrados. Desta maneira, mais estudos com animais com a enfermidade de leve a moderada se fazem necessários no que concerne o uso tópico de células-tronco mesenquimais.

Palavras chaves: Ceratoconjuntivite Seca, células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, autólogo, terapia celular tópica.

ABSTRACT

FERNÁNDEZ CARNEIRO, R. M. **Topical use of mesenchymal stem cells in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS).**[Uso tópico de células-tronco mesenquimais em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS) .] Masters Degree in Animal Health and Production in the Amazon, Federal Rural University of Amazonia, Pará. 2018.

Dry keratoconjunctivitis (DKC) is a multifactorial condition that causes tear production disorder, resulting in classic signs such as: ocular dryness, conjunctival hyperemia, nuisance, pain, hyperpigmentation, neovascularization, mucous or mucopurulent secretion, and may or may not be present ulcers. In conventional treatment, immunosuppressive drugs are usually used, administered for long periods, but they have limited results. Thus, the requirement to pursue new treatments aimed at repairing and restoring the functionality of the compromised lacrimal gland is one of the main challenges in the field of veterinary medicine. In the present study, four dogs (DKC-1, DKC -2, DKC-3 and DKC-4) bilaterally affected by Dry keratoconjunctivitis were used, which received autologous cells, instilled in each eye, receiving 3 applications with interval of 30 days each and being evaluated weekly for clinical evolution and lacrimal production, by means of the Schirmer test. Initially, there was a reduction of the clinical signs of the disease, with a significant improvement throughout the evaluation period, showing a marked decrease in ocular secretion, improvement in opacity and corneal vascularization, and subtle increase in lacrimal production. However, the benefit in relation to the cost needs to be better evaluated since the use of cells as well as the conventional treatment is also limited, and may not be long lasting when it comes to animals with a chronic stage of the disease, which may have had a direct influence on the results found. In this way, more studies using animals of mild to moderate disease are necessary regarding the topical use of mesenchymal stem cells.

Key words: Dry keratoconjunctivitis, mesenchymal stem cells, autologous, topical cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Diagrama das células caliciformes, glândulas lacrimais, glândulas tarsais, e ultraestrutura do filme lacrimal de cães. Fonte: GRAHN & STOREY, 2004.....	24

LISTA DE FIGURAS (Artigo)

	Página
Figura 1 Fotomicrografia da cultura de <i>ADSCs</i> de cão portador de ceratoconjuntivite seca (CCS) em #0 (A) e #2 (B). Barra de escala: 100 µm (5x).....	51
Figura 2 Diferenciação celular de CTM-TA de <i>cão</i> . (A) Osteogênica, demonstrando matriz de cálcio extracelular pela coloração Alizarin Red. (B) Adipogênica, demonstrando gotículas lipídicas pela coloração Oil Red O. (C) Condrogênica, demonstrando proteoglicanos corados em azul pelo Alcian Blue. Barra de escala: 100 µm em A, e 50 µm em B e C.....	52
Figura 3 Animal CCS-1: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando vasos congestionados, hiperemia, ressecamento palpebral e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1º aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório bem diminuído. (E e F) ambos após 2º aplicação de células-tronco, na qual em F (seta) observa-se úlcera de córnea causada por trauma mecânico. (G e H) ambos após 3º aplicação de células-tronco.....	56
Figura 4 Animal CCS-2: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando vasos congestionados, hiperemia, secreção mucopurulenta e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1º aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2º aplicação de células-tronco. (G e H) ambos após 3º aplicação de células-tronco.....	57

Figura 5 Animal CCS-3: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando hiperemia, secreção mucopurulenta e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1º aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2º aplicação de células-tronco, com grande quantidade de secreção mucopurulenta após início das obras. (G e H) ambos após 3º aplicação de células-tronco. **58**

Figura 6 Animal CCS-4: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando vasos congestos, hiperemia, secreção mucopurulenta, ressecamento palpebral e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1º aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2º aplicação de células-tronco. (G e H) ambos após 3º aplicação de células-tronco..... **59**

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Análises estatísticas para valores de STT (média ± Erro padrão da média em mm / minutos) antes e depois da aplicação de CTM	54

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Descrição dos cães usados no experimento	46

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 Efeito das Células-tronco mesenquimais em cães diagnosticados com CCS por meio do Teste de Schirmer em mm/minuto.....	53
Gráfico 2 Quantidade de secreção ocular, opacidade da córnea e vascularização da córnea, no decorrer do tratamento com células-tronco mesenquimais (Utilizando-se as médias dos valores encontrados para cada animal avaliado).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

BL: parâmetro inicial basal

BSA: *Bovine Serum Albumine*

CCS: Ceratoconjuntivite Seca

CT: Células-tronco

CTM: Células-tronco Mesenquimais

CTM-TA: Células-tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

FA: Fosfatase alcalina

F12: *Ham's F12 Nutrient Mixture*

FISH: *Fluorescent in Situ Hybridization*

GL: Glândula lacrimal

IM: Via Intramuscular

LFU: Unidade Funcional Lacrimal

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

SFB: Soro Fetal Bovino

STT: Teste de Schirmer

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVO.....	20
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivo específico.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Aparelho lacrimal.....	23
3.2 Ceratoconjuntivite seca (CCS).....	24
3.2.1 Patogênese e fisiopatologia.....	25
3.2.2 Sinais Clínicos.....	26
3.2.3 Diagnóstico.....	27
3.2.4 Tratamento.....	28
3.3 Células-tronco.....	29
3.3.1 Células-tronco mesenquimais (CTM).....	30
3.3.2 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM-TA).....	31
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
5 Uso tópico de células-tronco mesenquimais em cães com Ceratoconjuntivite Seca (CCS).....	42
Introdução	44
Materiais e Métodos	45

Resultados	50
Discussão.....	60
Conclusão.....	62

REFERÊNCIAS

6 ANEXO

1. INTRODUÇÃO

A oftalmologia veterinária é uma especialidade que vem se desenvolvendo continuamente, evoluindo de acordo com as exigências de mercado e com o aumento da expectativa de vida dos cães, os quais se inserem nesse contexto de forma indispensável, já que a idade também influencia na predisposição das enfermidades. Sendo assim a compreensão da semiologia oftálmica e a sua realização são imprescindíveis à acurácia diagnóstica desta especialidade (MARTINS & GALERA, 2011).

Dentre as enfermidades oftálmicas, a ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma das mais comuns em pequenos animais, principalmente em cães (PIGATTO et al., 2008). Segundo o comitê apresentado em 1995 no Instituto Nacional do olho/ Indústria Dry Eye Workshop, o olho seco é uma desordem da lágrima devido à degradação ou evaporação excessiva da mesma, causando danos a superfície interpalpebral e está associada a sintomas de desconforto ocular (LEMP, 1995).

Apesar da patogênese da CCS ainda não ser bem compreendida, sabe-se que é uma doença multifatorial, porém com componentes genéticos e ambientais que contribuem para a autoimunidade da mesma (LIU et al., 2014). Assim, é comumente utilizado para o tratamento lacrimoestimulantes e imunomoduladores, os quais dificilmente repercutem a cura total do paciente devido caráter imunomediado da doença. Valendo ressaltar que apesar dos bons resultados obtidos em grande número de pacientes, o uso dos medicamentos na maioria das vezes é feito por toda vida do animal e em alguns casos este tratamento é não responsivo, sendo a terapêutica, insatisfatória (PEIXOTO, 2013).

Desta forma, a necessidade de se buscar novos tratamentos, que visem reparar e restaurar a funcionalidade da glândula lacrimal comprometida, substituindo células originais lesionadas por células íntegras, capazes de produzir a fração aquosa do filme lacrimal em quantidades adequadas para o desempenho satisfatório de suas funções é um dos principais desafios no campo da medicina veterinária. Sendo assim, a utilização de células-tronco mesenquimais tem apresentado resultados promissores no tratamento de diversas enfermidades, e sua utilização pode vir a ser uma abordagem eficaz na recuperação de cães com ceratoconjuntivite seca, implicando melhora clínica definitiva ou por longo período para o paciente se comparada aos tratamentos convencionais.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Avaliar o uso das CTM de gordura em cães com CCS

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar eficácia do uso de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo por meio da via tópica de aplicação no tratamento da CCS em cães
- Avaliar a segurança do uso tópico de células-tronco derivadas do tecido adiposo para tratamento da CCS em *cães*
- Avaliar o tratamento com células em animais com a enfermidade de moderada a grave

3. REVISÃO

DE

LITERATURA

3.1 O aparelho lacrimal

Apesar de amplamente pesquisada a morfologia da superfície ocular e da glândula lacrimal, pouco se sabe sobre a morfologia do sistema nasolacrimal (HIRT et al., 2012), o qual é composto por glândula lacrimal (situada dorsoventralmente ao bulbo ocular), glândula da terceira pálpebra, canalículos lacrimais (componentes do sistema de drenagem), saco lacrimal e ducto nasolacrimal (KONIG & LIEBICH, 2004).

A glândula lacrimal e da terceira palpebral, são glândulas intraorbitais, as quais nos cães, separam a porção aquosa da película lacrimal, sendo estruturas muito importantes para a manutenção da integridade da superfície ocular (PARK et al., 2016). Estas glândulas são histologicamente caracterizadas como estruturas tubuloacinares, no qual os ductos e as unidades secretoras, dão origem ao parênquima glandular, enquanto os tecidos conjuntivos, vasos sanguíneos e fibras nervosas originam o estroma glandular. Apresentam coloração rosada-cinzenta, compostas de pequenos lóbulos intercalados com septos de tecido conjuntivo e carecem de verdadeira cápsula (MAUSOLF, 1975). É interessante destacar que as glândulas lacrimais masculinas são maiores que as femininas (CABRAL et al., 2005).

O filme lacrimal é uma camada fluida complexa composta de porção mucosa, a qual é produzida por células de cálice conjuntival, porção aquosa, produzidas pela glândula lacrimal e da terceira pálpebra e porção lipídica, produzidas pelas glândulas tarsais (Figura 1), sendo este filme, essencial na manutenção da clareza corneana, além de servir como superfície de refração anterior e fornecer nutrição necessária para a córnea (GRAHN & STOREY, 2004).

Em cães, existe um ponto lacrimal superior e um inferior situados na conjuntiva palpebral a poucos milímetros do canto medial. Esses pontos desembocam nos canalículos, superior e inferior, que se unem ao saco lacrimal, sendo uma estrutura pouco desenvolvida nas espécies domésticas, tratando-se apenas de uma dilatação no topo do ducto nasolacrimal e uma depressão no osso lacrimal. O sistema nasolacrimal é revestido por epitélio colunar pseudoestratificado e possui como objetivo drenar lágrimas do olho para as passagens nasais (TURNER, 2010).

O ducto nasolacrimal, em aproximadamente 50% dos cães, tem uma segunda abertura na via oral mucosa do palato duro central, por trás dos incisivos ao nível dos dentes caninos. O canal nasolacrimal mede aproximadamente 1 mm de diâmetro e o comprimento varia consideravelmente entre braquicefálico (apresentam o focinho achatado, encurtado como as raças Shih-tzu e pug), mesocefálico (cabeça média com comprimento moderado como as raças labrador e beagles), e cães dolicocefálicos (a cabeça é longa e estreita com o focinho longo como a raça dachshund). Nas raças braquicefálicas normalmente os ductos nasolacrimais são muito curtos, e várias vezes drenam as lágrimas para a faringe (GELATT, 1991; DYCE et al., 2010).

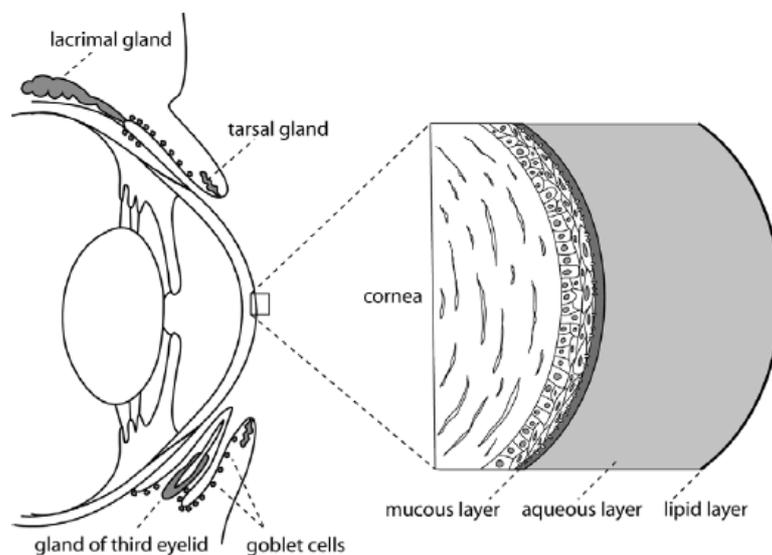


Figura 1: Diagrama das células caliciformes, glândulas lacrimais, glândulas tarsais, e ultraestrutura do filme lacrimal de cães. **Fonte:** GRAHN & STOREY, 2004

3.2 Ceratoconjuntivite Seca (CCS)

A ceratoconjuntivite seca, ou distúrbio do olho seco é uma doença ocular que acomete entre 4 e 20% da espécie canina, causando Inflamação da glândula lacrimal (GL) e diminuição da produção de lágrimas devido à deficiência ou evaporação excessiva, implicando em disfunção do componente lacrimal, levando a alterações no volume, composição e depuração do filme lacrimal, os quais causam danos à superfície ocular interpalpebral, estando associados a sintomas de desconforto ocular e distúrbios visuais.

Ainda que seus mecanismos não estejam completamente elucidados, existem evidências que sugerem que as atividades inflamatórias comuns na CCS sejam mediadas por citocinas e receptores (BARABINO & DANA, 2004; HIRT et al., 2012).

Esta enfermidade é multifatorial e pode ser desenvolvida de maneira espontânea, secundária a infecções, vírus da cinomose canina, induzida por fármacos, por intoxicação, por trauma, pela morfologia da superfície ocular, blefaroconjuntivite crônica, hipoplasia acinar congênita, remoção de glândulas nictitantes, perda da inervação parassimpática das glândulas lacrimais (Nervo craniano VII), perda da inervação sensorial (isto é, sensação), doenças metabólicas sistêmicas (hipotireoidismo, diabetes Mellitus e doença de Cushing), sem contar que muitos casos da CCS em cães são causados por doenças autoimune ou podem ter origem desconhecida, (GELATT, 1991; GAO et al.,1998; SCHRADER et al.,2008).

Animais idosos, com idade maior que sete anos e algumas raças como buldogue inglês, pugs, cockers, yorkshire, pequinês, schunauzer, lhasa apso, shih tzu e poodle são mais predispostos a doença (RAMOS, 2016). Pacientes com histórico de seborreia ou atopia e alguns positivos ao fator reumatoide, podem ser mais propensos a apresentar ceratoconjuntivite seca associada (HERRERA, 2008).

A microbiota conjuntival normal é composta por fungos e bactérias, os quais exercem papel de destaque na estimulação da resposta imune local (MOELLER et al., 2005), desta forma, a microbiota local age como mecanismo de defesa importante, por meio da secreção de substâncias com propriedades antimicrobianas e no mecanismo competitivo entre os microrganismos (WANG, 2008). No caso da ocorrência de injúrias e perda da integridade ocular, podem-se formar colônias oportunistas e infecções secundárias nos olhos desses animais (ARMSTRONG, 2000).

3.2.1 Patogênese e Fisiopatologia

A doença do olho seco é resultante de modificações dos constituintes da lágrima, a qual culminam com a disfunção da Unidade Funcional Lacrimal (LFU), que representa um sistema integrado agrupado pelas glândulas lacrimais, superfície ocular (córnea e

conjuntiva), pálpebras e os nervos sensoriais e motores que as constitui. O funcionamento satisfatório do filme lacrimal é que mantém a superfície ocular saudável, proporcionando lubrificação, proteção e ambiente capaz de renovar as células epiteliais da córnea (STERN et al., 2004).

Nos idosos, as variações fisiológicas envolvendo a gênese do olho seco são mais significativas, incluindo diminuição do volume e fluxo lacrimal, além do aumento da osmolaridade, diminuição da estabilidade do filme e alteração na composição lipídica da lágrima (FONSECA et al., 2010).

A perda de células epiteliais acaba deixando a córnea exposta a injúrias ambientais, induzindo ao incômodo ocular crônico. O processo inflamatório da superfície ocular pode ser considerado causa ou efeito da ceratoconjuntivite seca e estimula a produção dos mediadores inflamatórios, os quais podem levar a alteração das glândulas secretórias. Independentemente do que desencadeou o estímulo inicial, o estresse sucessivo leva a gradual disfunção das células como um todo, a liberação de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio, as quais podem culminar com apoptose e necrose celular (WAKAMATSU et al., 2008).

3.2.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da Ceratoconjuntivite Seca variam de acordo com o tempo decorrido do início da doença, se ela é aguda ou crônica, variam também com a extensão do ressecamento ocular, se é uni ou bilateral, temporária ou permanente (LAUS & ORIÁ, 1999; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

Em seu estágio mais precoce, a CCS inicia de forma gradual, com presença de hiperemia conjuntival, dor, secreção mucoide ou mucopurulenta, podendo ou não apresentar descarga intermitente, fotofobia, desconforto ocular, neovascularização da córnea e conjuntivite bacteriana, podendo ainda apresentar exsudato ao redor das margens palpebrais e incomodo (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

Com a progressão do quadro a superfície ocular torna-se sem brilho, pode apresentar ceratite caracterizada por extensa vascularização corneana, presença de

hiperpigmentação, com depósitos de melanina em todo epitélio e estroma anterior, a córnea pode encontrar-se edemaciada, irregular, com presença de ulceração, inflamação supurativa que pode resultar em malácia do estroma, prolapso da íris e levar o animal a cegueira (GELATT, 1991).

3.2.3 Diagnóstico

Para o diagnóstico da ceratoconjuntivite seca, se faz necessário conhecer a história clínica do animal e se utilizar de questionários para avaliar sinais e sintomas, no entanto a confirmação da doença só é feita mediante o emprego de técnicas oftalmológicas que serão citadas mais à frente.

Inicia-se a anamnese observando a presença de alterações como: hiperemia conjuntival, ceratite, a qual pode ser ulcerativa ou não, melnose corneal, neovascularização, fotofobia entre outras características presentes na CCS. Vários testes podem ser aplicados para analisar acuidade visual, estabilidade do filme lacrimal, superfície ocular e produção de lágrima dentre eles tem-se: avaliação da morfologia e padrão de secreção, teste de ameaça, teste de Schirmer e coloração da superfície ocular com fluoresceína (VAN BIJSTERVELD, 1969; BEGLEY, 2002; LAUS, 2008).

Para avaliação da acuidade visual, o teste da ameaça é um dos mais utilizados, por meio dele o examinador realiza um gesto suave que pode ser com uma das mãos em direção a cada olho separadamente, com o cuidado de não tocar as vibrissas e evitar o deslocamento abrupto de ar, ou pode jogar uma bola de algodão em frente ao animal fazendo com que ele a siga, acompanhando o movimento do algodão. A presença de visão faz com que o animal pisque ou movimente sua cabeça em direção ao estímulo (MARTINS & GALERA, 2011).

A partir do teste de Shirmer é aferida a quantidade da produção de lágrima em um minuto, consistindo na colocação de tiras de papel absorvente estéril, apropriado, no terço médio do saco conjuntival inferior durante um minuto. A distância do entalhe à extremidade umedecida do papel é mensurada imediatamente após a remoção da tira do olho e representa o valor normal da produção de lágrimas (SLATTER, 2005).

A produção lacrimal em cães resulta entre 15 e 25 mm/minuto. Pacientes com valores entre 10 e 15 mm/minuto e inferiores a 10 mm/minuto são considerados suspeitos e portadores de CCS, respectivamente (LAUS e ORIÁ, 1999; TAFFAREL, 2002; LAUS et al., 2009), enquanto que valores de produção de lágrimas abaixo de 5 mm/minuto classificam o paciente como portador grave de CCS (LAUS e ORIÁ, 1999).

Já o teste com corante de fluoresceína, é um teste clínico primário para identificar a presença de úlceras de córnea, além de ser um teste de patência. O corante líquido de fluoresceína é instilado nos olhos do animal e depois de decorridos alguns minutos podemos observar presença de ceratites, úlceras de córnea e lesões de conjuntiva (GELATT, 1991).

3.2.4 Tratamento

O tratamento da ceratoconjuntivite seca é normalmente sintomático e medicamentoso (tópico e/ou sistêmico), incluindo medidas anti-inflamatórias (não hormonais, corticosteróides, ciclosporina A, tacrolimus), lacrimogênicos, lacrimomiméticos, mucolíticos, antibacterianos, ômega-3, secretagogos e o soro autólogo (HARTLEY et al., 2006; ROCHA et al., 2006).

Tendo em vista que a ceratoconjuntivite seca causa ressecamento da superfície ocular e como consequência pode levar a úlcera de córnea em cães, seguido de cegueira nesses animais, para a reposição lacrimal foram desenvolvidos colírios com composição semelhante aos componentes da lágrima, os quais são indicados para umedecer a superfície ocular e oferecer um pouco mais de conforto ao paciente. As lágrimas artificiais devem ser instiladas várias vezes ao dia, (em média de 6 a 8 vezes), e geralmente associadas com outros agentes terapêuticos na tentativa que a produção lacrimal retorne aos níveis fisiológicos (MOORE, 1999), entretanto, essa condição fica atrelada à disponibilidade do proprietário, o que nem sempre corresponde com as expectativas. Além disso, somente poucos pacientes se recuperam completamente após utilizar essa estratégia (STADES et al, 1999).

Nos casos não responsivos ao tratamento medicamentoso pode ser realizada transposição do ducto parotídeo da cavidade oral ao saco conjuntival inferior (HARTLEY

et al., 2006). No entanto, complicações tanto trans quanto pós-operatórias podem surgir como, torção, laceração, ou trauma no ducto parotídeo cirurgicamente induzido. Ademais, devido à maior concentração de minerais na saliva em comparação com a lágrima, podem ocorrer depósitos de minerais na córnea (MOORE, 1999; SLATTER, 2005), resultando em cristalização da mesma e blefarite (DUNN, 2001).

Mesmo com todos os estudos que visam esclarecer os fatores etiológicos e fisiopatológicos que compreendem a ceratoconjuntivite seca, o tratamento desta enfermidade permanece sendo desafiador, buscando-se estabelecer o melhor manejo dos portadores. Sendo assim, devido a maior importância que vem sendo dada aos cuidados com os caninos, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos com terapias de células-tronco adultas, fornecendo oportunidade para avaliar a eficácia e a segurança das mesmas, inclusive avaliando possível utilização dessa terapia na medicina humana (FONSECA et al., 2010; VOLK & THEORET, 2013; BITTENCOURT et al, 2016).

3.3 Células-tronco

As células-tronco são aquelas que possuem capacidade de auto renovação e quando submetidas a condições propícias podem se diferenciar em vários tipos celulares, inicialmente sem função específica, porém, de acordo com os estímulos, aos quais são sujeitas, podem inclusive dar origem a células maduras de formas e funções especializadas, como as células cardíacas, epiteliais, nervosas, dentre outras. Além disso, suas propriedades imunomoduladoras e efeitos parácrinos diante de lesões ou injúrias, as tornam capazes de substituir células danificadas por células integras (KIRSCHSTEIN, 2001; ZUTTON et al, 2013).

Conforme sua habilidade e capacidade de se diferenciar em diversas linhagens e formar tecidos do organismo, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias ou adultas, sendo as embrionárias, pluripotentes e isoladas a partir do embrião no estágio de blastocisto, apresentando capacidade de se diferenciar em qualquer tecido derivado do endoderma, mesoderma ou ectoderma. Já as células-tronco mesenquimais são obtidas por meio do cordão umbilical, da medula óssea, do tecido adiposo, do sangue periférico ou de órgãos específicos do organismo revelando capacidade de participar da formação de muitos tecidos, no entanto, as células-tronco

adultas, diferentemente das embrionárias, não possuem capacidade de originar um organismo completo (THOMSON et al., 1998; ROBEY, 2000; VOGEL, 2000).

A relevância na utilização de células-tronco tem determinado estudos que descrevem sua aplicação alógena e autógena para reparação de diversos tecidos, o que vem despertando interesse não apenas na terapia celular em animais domésticos, mas também sua importância como modelos experimentais aplicáveis a pacientes humanos (PINTO FILHO et al., 2013; BITTENCOURT et al., 2016).

3.3.1 Células-tronco Mesenquimais (CTM)

As células-tronco mesenquimais são células somáticas, multipotentes, presentes em regiões perivasculares de tecidos adultos, estando em pequenas quantidades, derivam do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, e podem ser encontradas na medula óssea, no tecido adiposo, no periósteo, no tecido muscular e ainda em órgãos parenquimatosos (SINGER & CAPLAN, 2011; PINTO FILHO et al., 2013).

Os primeiros experimentos que deram origem aos conhecimentos sobre células-tronco foram realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till, os quais constataram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Em seguida, já nas décadas de 1970 e 1980 outros estudiosos, como Alexander Friedenstein e colaboradores ampliaram os horizontes no que concerne o potencial de uso das células-tronco mesenquimais evidenciando sua capacidade de autorrenovação e diferenciação (TILL et al., 1964; DRZEWIECKI et al., 2010). No entanto foi Caplan (1991), quem propôs o termo célula-tronco mesenquimal.

Inicialmente conhecidas como células fibroblastoides devido sua capacidade de aderir aos plásticos da garrafa de cultivo e formar colônias parecidas com fibroblastos, as MSCs são consideradas células multipotentes não hematopoiéticas, somáticas, presentes em regiões perivasculares de tecidos adultos: medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos (OWEN & FRIEDENSTEIN, 1988; MONTEIRO et al., 2010; ALDAHMAH et al., 2012).

Segundo a *International Society for Cellular Therapy*, para que uma população de células seja classificada como células-tronco mesenquimal ela precisa atender alguns dos pré-requisitos: ser plástica aderente quando submetida a condições de cultura; ser positiva para CD105, CD73 e CD90, e negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR; e ainda estarem aptas a se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (ZUTTON et al, 2013).

Uma das fontes mais comuns para obtenção de células-tronco adulta é a medula óssea, no entanto outras possibilidades também estão ao alcance, como o sangue do cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, fígado, baço e tecido adiposo (BIANCO & COSSU, 1999; CONGET & MINGUELL, 1999; ZUK et al., 2001).

3.3.2 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (*CTM-TA*)

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo são denominadas multipotentes. Nos mamíferos, o tecido adiposo branco é predominante em comparação ao amarelo, e está presente em recém-nascidos, porém, quase ausente em adultos (LIN et al., 2010). O nicho das *CTM-TA* situa-se na região perivascular, composto por células de tecido conjuntivo associado a vasos sanguíneos, podendo estar presente também células adiposas, estromais e diversas células progenitoras (ZANNETTINO et al., 2008).

Foi a partir de um relato, que afirmava estarem presentes células-tronco mesenquimais em um lipoaspirado humano que as células de tecido adiposo se tornaram uma fonte alternativa para extração de células-tronco mesenquimais, dando início a pesquisas sobre as mesmas (ZUK et al., 2001). Desde então, as *CTM-TA* têm se destacado devido sua abundância e facilidade de obtenção por meio de cirurgias menos invasivas (CHANG et al., 2014).

De acordo com Kern et al. (2006) as células-tronco derivadas de tecido adiposo possuem taxa de sucesso no isolamento de 100% e além disso, seu rendimento é 40 vezes maior que o da medula óssea. Ademais as *CTM-TA* são interessantes, pois sua quantidade parece não diminuir com o avanço da idade (DIMUZIO & TULENKO, 2007).

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo apresentam alta capacidade de expansão e podem ser utilizadas em diversas áreas, inclusive na terapia regenerativa devido sua capacidade quimiotática (SOUZA et al., 2010). De acordo com Gutierrez-Fernandez et al. (2013), as *CTM-TA* possuem propriedades imunomoduladoras, fazem liberação de fatores tróficos e interações parácrinas. Além disso, não existem questionamentos éticos com relação a sua utilização, o que as tornam ainda mais atraentes (BLYDLOWSKI et al., 2009), bem como, não envolvem questões filosóficas nem religiosas, como quando se trabalha com células-tronco embrionárias. E por fim, favorecendo ainda mais seu uso, as células-tronco mesenquimais extraídas de animais adultos tornam possível a realização de transplantes autólogos, os quais possuem natureza imunocompatíveis e não necessitam de estoque de células em bancos de tecidos (ZUK et al., 2001; MOTA et al., 2005).

*4. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

ALDAHMAH, A.; ZAHER, W.; AL-NBAHEEN, M.; KASSEM, M. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration. *Ann Saudi Med.* v. 32, n. 1, p. 68-77, 2012.

ARMSTRONG, R. A. The microbiology of the eye. *Ophthalmology Physiology Optics*, v. 20, n. 6, p. 429- 441, 2000.

BARABINO, S.; DANA, M. R. “Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations,” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 45, n. 6, p. 1641–1646, 2004.

BEGLEY, C.G.; CAFFERY. B.; CHALMERS, R. L.; MITCHELL, G. L.; Dry Eye Investigation (DREI) Study Group. Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye. *Cornea.* v. 21, n. 7, p. 664-70, 2002.

BIANCO, P.; COSSU, G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res.* v. 251, n. 2, p. 257-63, 1999.

BITTENCOURT, M. K. W.; BARROS, M. A.; MARTINS, J. F. P.; VASCONCELLOS, J. P. C.; MORAIS, B. P.; POMPEIA, C.; BITTENCOURT, M. D.; EVANGELHO, K. S.; KERKIS, I.; WENCESLAU, C. V. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Medicine*, v. 8, p. 63–77, 2016.

BLYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia Hemoter.* v. 31, n.Supl.1, p. 25-35, 2009.

CABRAL, P.V. et al. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands macroscopic and morphometric characteristics. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.391-397, 2005.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.

CHANG, K. A.; LEE, J. H.; SUH, Y. H. Therapeutic potential of human adipose-derived stem cells in neurological disorders. *J Pharmacol Sci.* v. 126, p. 293–301, 2014.

CONGET, P. A.; MINGUELL, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* v. 181, n. 1, p. 67-73, 1999.

DIMUZIO, P.; TULENKO, T. Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose derived stem cells. *J Vasc Surg.* v. 45, Suppl A. p. 99-103, 2007.

DRZEWIECKI, B.A.; THOMAS, J. C.; TANAKA, S. T. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. *Stem Cells Int*: 2010.

DUNN, J. K. *Tratado de medicina de pequenos animais.* 1ª Ed. São Paulo – Ed. Roca. 1035p. 2001.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. *Tratado de anatomia veterinária.* 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

FONSECA, E. C.; ARRUDA, G. V.; ROCHA, E. M. Olho seco: etiopatogenia e tratamento. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia.* v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.

FONSECA, S.A. Efeitos clínicos e histopatológicos da aplicação autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e cães. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 83p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). 2011.

FONSECA, S.A.; GALERA, P.D.; BRITO, D.L; HASHIMOTO, H.H.; GRACINDO, C.V.; PIMENTEL, C.M.M. Clinical and histopathological results of the application of the mononuclear fraction of autologous bone marrow cells on the third eyelid gland of

dogs. In: 42th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Hilton Head., v. 14. p.606-622, 2011.

FONZAR, J. F. Uso subconjuntival de lipossomas com rapamicina e tacrolimus tópico no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia. Botucatu – SP. Julho, 2014.

GAO, J. SCHWALB, T. A. ADDEO, J. V. GHOSN, C. R. STERN, M. E. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy. *Cornea*. v. 6, n. 17, p. 654-663, nov, 1998.

GELATT, K. N. Canine lacrimal and nasolacrimal diseases. *Veterinary Ophthalmology*. 5. Ed. Philadelphia. Cap. 9. p. 186-199. 1991.

GRAHN, B.H & STOREY, E.S. Lacrimostimulants and lacrimomimetics. *Veterinary Clinics Small Animal* v 34. p 739–753. 2004.

GUTIERREZ-FERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ-FRUTOS, B.; OTERO-ORTEGA, L.; RAMOS-CEJUDO, J.; FUENTES, B.; DIEZ-TEJEDOR, E. Adipose tissue-derived stem cells in stroke treatment: from bench to bedside. *Discov Med* v. 16, p. 37–43, 2013.

HARTLEY C., WILLIAMS D.L. & ADAMS V.J. Effect of age, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*. v. 9, p. 53-57, 2006.

HERRERA, D. *Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia*. 1ª Ed, Editora Medvet, p.111-140, São Paulo, 2008

HIRT, R.; TEKTAS, O. Y.; CARRINGTON, S.D.; ARNETT, R.; FITZPATRICK, E.; KNIPPING, S.; PAULSEN, F.P. Comparative Anatomy of the Human and Canine Efferent Tear Duct System – Impact of Mucin MUC5AC on Lacrimal Drainage. *Current Eye Research*, v.37, n. 11, p. 961–970, 2012.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. v. 24, n. 5, p. 1294-301, 2006.

KIRSCHSTEIN, R. *Stem cells: scientific progress and future research*. Bethesda: The National Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. *Anatomia dos animais domésticos*. 2.v, p. 305-306, 2004.

LAUS, J. L., ORIÁ, A. P. Doenças Corneanas em Pequenos Animais. *Revista de Educação continuada do CRMV-SP*. São Paulo, v. 2, nº 1, p. 26-33, 1999.

LAUS, J.Z. Oftalmologia Canina. XXXV Semana Capixaba do Médico Veterinário e II Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária. Guarapari – ES. Setembro de 2008.

LAUS, J. L., GALERA, P. D., ORIÁ, A. P. Principais Afecções da Túnica Fibrosa. In: *Oftalmologia clínica em cães e gatos*. Ed. Rocca, Rio de Janeiro, cap. 4, p. 69-95, 2009.

LI, G.; YUAN, L.; REN, X.; NIAN, H.; ZHANG, L.; HAN, Z.C.; LI, .; ZHANG, X. The effect of mesenchymal stem cells on dynamic changes of T cell subsets in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clinical and experimental immunology*. Jan, 2013.

LIN, C. S.; XIN, Z. C.; DENG, C. H.; NING, H.; LIN, G.; LUE, T. F. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. v. 25, n. 6, p. 807-15, 2010.

MARTINS, B. C.; GALERA, P.D. *Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*. v. 9, n. 31, p. 612-620, 2011.

MAUSOLF, F. A. *The Anatomy of the Ocular Adnexa; Guide to Orbital Dissection*, Thomas, Springfield, Ill, USA, 1975.

MOELLER, C. T. A.; BRANCA, B. C.; YU, M. C. Z.; FARAH, M. E.; SANTOS, M. A. A.; HÖFLING-LIMA, A. L. Evaluation of normal ocular bacterial flora with two different culture media. *Canine Journal Ophthalmology*, v. 40, n. 4, 2005.

MONTEIRO, B. S; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. *Cienc Rural*. v. 40, n. 1, p. 238-45, 2010.

MOORE, C. P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K. N. *Veterinary Ophthalmology*. 3.ed., Philadelphia: Lippincott Williams; Wilkins, p.583-618, 1999.

MOTA, A. C. A.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares: perspectiva do hematologista. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 27, p. 126-132, 2005.

OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. v.136, p. 42-60, 1988.

PARK, S. A; TAYLOR, K. T;. ZWINGENBERGER, A. L; REILLY, C. M; TOUPADAKIS, C. A; CARL F. MARFURT, C. F; GOOD, K. L; MURPHY, C.J. Gross anatomy and morphometric evaluation of the canine lacrimal and third eyelid glands. *Veterinary Ophthalmology* .v 19, n 3, p 230–236. 2016

PEIXOTO, R. V. R. Aplicação autóloga da fração de células mononucleares (fcm) da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra em cães com Ceratoconjuntivite Seca, e sua repercussão sobre a superfície ocular. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Brasília/DF. 2013.

PIGATTO, J. A. T.; PEREIRA, F. Q.; ALMEIDA, A. C. V. R.; REDAELLI, R.; ALBUQUERQUE, L. Ceratoconjuntivite seca em cães – revisão de literatutra. *Veterinária em Foco*, v.5, n.2, jan./jun. 2008.

PINTO FILHO, S. T. L.; TREICHEL, T. L. E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J. S.; ROSA, M. B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M. V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N. L. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20 (Edição Comemorativa) p. 49-59, 2013.

RAMOS, D. S. Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-graduação em anatomia dos animais domésticos e silvestres da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP- São Paulo. 2016.

RADAELLI, S.; BENTIVEGNA, A.; FOUDAH, D. Fromcytogenomic para perfis epigenômicos: monitorização do comportamento biológico in vitro de células estaminais mesenquimais da medula óssea humana cultivadas. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 3, n. 6, artigo 47, 2012.

RIBEIRO, A.P., BRITO, F.L.C., MARTINS, B.C., MAMEDE, F., LAUS, J.L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. *Ciencia Rural*, v. 38, n.2, mar-abr; 2008.

SCHRADER, S.; MIRCHEFF, A. K.; GEERLING, G. Animal models of dry eye. *Dev Ophthalmol*; v.41 p. 298–312; 2008.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. v. 6, p. 457-78, 2011.

SLATTER, D.E. Fundamentos da Oftalmologia Veterinária. Cap 8. 3rd ed. São Paulo. Editora Rocca, 2005.

SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S. W.; LIMA, V. C.; CARVALHO, A. C. C. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. v. 18, n. 3, p.344-53, 2010.

STADES, F. C. et al. Aparelho lacrimal. In: *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 58p. 1999.

STERN, M. E.; GAO, J.; SIEMARKO, K. F.; BEUERMAN, R. W.; PFLUGFELDER, S. C. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res.* v. 78, n. 3, p.409-16, 2004.

TAFFAREL, M. O. CAVALCANTE, C. Z. CUNHA, O. Ceratoconjuntivite seca. *Revista Nosso Clínico.* São Paulo, ano 5, n. 28, p. 6-12, jul/ago, 2002.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A.; SIMINOVITCH, L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci.* v. 51, n. 1, p. 29-36, 1964.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHAL, V. S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* v. 282, n. 5391, p. 1145-47, 1998.

TURNER, S. M. *Oftalmologia em pequenos animais.* Cap.15, p. 91-92, 2010.

VAN BIJSTERVELD, O. P. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol.* v. 82, n. 1, p.10-4, 1969.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? *Science.* v. 287, n. 5457, p. 1418-9, 2000.

VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen.* v. 21, n. 3, p. 382–94, 2013.

WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, L.; XUE, Q.; CUI, J.; QI, C. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Veterinary Ophthalmology,* v. 11, n. 3, p. 145-149, 2008.

WAKAMATSU, T. H.; DOGRU, M.; TSUBOTA, K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia.* V. 71, n.6 Suppl, p.72-9, 2008.

ZANNETTINO, A. C.; PATON, S.; ARTHUR, A.; KHOR, F.; ITESCU, S.; GIMBLE, J. M. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* v. 214, n 2, p. 413-21, 2008.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* v. 7 n. 2. p. 211- 28, 2001.

ZUTTON, M. S. S. R; WENCESLAU, C. V.; LEMOS, P. A.; TAKIMURA, C.; KERKIS, I. Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*; v. 21, n. 3, p. 281-7, 2013.

5. ARTIGO

Uso tópico de células-tronco mesenquimais em cães com Ceratoconjuntivite Seca (CCS)

Raquel Mello Fernández Carneiro¹, Ana Rita De Lima¹, Luane Lopes Pinheiro¹, Michel Platini², Fabiele B. Russo⁵, Graciela C. Pignatari⁵, Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda⁵, Gilvando Rodrigues Galvão⁴, Luis Fernando Moraes Moreira⁴, Ednaldo da Silva Filho¹, Edivaldo Herculano C. De Oliveira², Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga³, Érika Branco¹

1 Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil

2 Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil, e Instituto de Ciências Naturais. UFPA, Belém. Pará, Brasil.

3 Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP e do Departamento de Microbiologia do ICB-USP

4 Hospital Veterinário Prof. Mario Dias Teixeira HOVET/UFRA

5 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP

A Ceratoconjuntivite Seca (CCS) é uma condição multifatorial que acarreta em desordem na produção de lágrimas, resultando em sinais clássicos como: ressecamento ocular, hiperemia conjuntival, incômodo, dor, hiperpigmentação, neovascularização, secreção mucosa ou mucopurulenta, podendo ou não haver presença de úlceras. No tratamento convencional normalmente são utilizados fármacos imunossupressores, administrados por longos períodos, porém possuem resultados limitados. Desta forma, a necessidade de se buscar novos tratamentos, que visem reparar e restaurar a funcionalidade da glândula lacrimal comprometida é um dos principais desafios no campo da medicina veterinária. Diante do exposto, foram utilizados quatro cães (CCS-1, CCS-2, CCS-3 e CCS-4) acometidos bilateralmente pela Ceratoconjuntivite Seca, adultos, que receberam células-tronco autólogas, instiladas em cada olho, recebendo 3 aplicações, com intervalo de 30 dias cada uma e sendo avaliados semanalmente quanto a evolução clínica e a produção

lacrimal, por meio do Teste de Schirmer. Inicialmente houve redução dos sinais clínicos da doença, com melhora significativa durante todo o período de avaliação ($p < 0,05$), apresentando queda acentuada da secreção ocular, melhora quanto a opacidade e vascularização da córnea, e aumento significativo da produção lacrimal ($p < 0,05$). No entanto, o custo benefício precisa ser melhor avaliado visto que o uso de células, assim como o tratamento convencional, se mostra limitado, podendo não ser duradouro quando se trata de animais com estágio avançado da doença, o que pode ter influenciado diretamente nos resultados encontrados. Desta maneira, mais estudos com animais com a enfermidade de leve a moderada se fazem necessários no que concerne o uso tópico de células-tronco mesenquimais.

Palavras chaves: Ceratoconjuntivite Seca, células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, autólogo, terapia celular tópica.

Introdução

A ceratoconjuntivite seca (CCS), xeroftalmia ou síndrome do olho seco é uma afecção oftálmica comum em pequenos animais, principalmente em cães (PIGATTO et al., 2007), causada por insuficiência na porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa) ou pela evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa), resultado da produção inadequada da camada lipídica. Como consequência, causa ressecamento e mudanças inflamatórias progressivas na córnea e conjuntiva, além de diminuição da acuidade visual, podendo até mesmo levar a cegueira (RIBEIRO et al., 2008).

O filme lacrimal é composto por três camadas: lipídica, aquosa e mucoide, as quais atuam na manutenção da integridade da superfície ocular, sendo a lágrima responsável pela lubrificação, nutrição e função antimicrobiana dos olhos (KLEINNER, 2006 e PIGATTO et al., 2008). Assim, em algumas raças de cães, a CCS pode ser causada por alterações congênitas, por traumas, infecções locais, infecções sistêmicas como a cinomose, inflamações crônicas da glândula lacrimal, endocrinopatias, efeitos tóxicos do uso de drogas, causas idiopáticas ou processos autoimunes (BARNETT, 2006; BERANCK, 2006; BRITO et al., 2007). Além disso, animais que apresentam idade próxima de cinco ou seis anos são mais acometidos pela doença (BARROS, 1997).

Os sinais clínicos da CCS, além da dor, podem variar de acordo com o tempo decorrido de seu início e, se é uni ou bilateral. A maioria dos cães com CCS apresenta antecedentes de ceratoconjuntivite crônica, recorrente e inespecífica. Nos casos mais recentes é comum o desconforto ocular, presença de secreção mucosa, hiperemia conjuntival intensa, sensibilidade à luz e conjuntivite bacteriana (HERRERA, 2008).

Casos agudos podem produzir ulcerações superficiais, profundas e até a perfuração da córnea (LAUS e ORIÁ, 1999). Com a cronicidade da doença, destaca-se a neovascularização e pigmentação da córnea (LAUS et al., 2009).

O tratamento normalmente é medicamentoso e inclui, principalmente lacrimogênicos, lacrimomiméticos, mucolíticos e antibacterianos tópicos, os quais precisam ser administrados normalmente por um longo período ou durante toda a vida do animal. Alguns profissionais optam pelo procedimento cirúrgico, que consiste na transposição do ducto parotídeo da cavidade oral ao saco conjuntival inferior (HARTLEY et al., 2006), no entanto, as abordagens clínicas ou cirúrgicas utilizadas, além de possuírem custo elevado, não oferecem cura ao paciente.

Diante desta ineficiência quanto ao tratamento convencional, ao longo das últimas duas décadas, pesquisadores procuram nas células-tronco, respostas que possam elucidar o mecanismo de ação destas células frente algumas enfermidades, uma vez que estas são capazes de se autorenovar e de se diferenciar em diversos tipos celulares, além de apresentarem propriedades imunomoduladoras e efeitos parácrinos mediante injúria tecidual (THOMSON et al., 1998; ZUTTON et al., 2013; RAMOS, 2016).

Diante do exposto, objetivamos avaliar a segurança e eficácia no uso tópico de células-tronco mesenquimais, autólogas, derivadas do tecido adiposo para tratamento da CCS em *cães*, com grau moderado a grave, bem como já em estágio crônico da doença.

Material e Métodos

Os procedimentos realizados nesse experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), registrada com número de protocolo 027/2016 (CEUA/UFRA), estando de acordo com todos os preceitos exigidos.

Seleção dos Animais

Foram estudados 4 cães adultos (Quadro 1), com idades entre 6 e 10 anos, sendo três machos e uma fêmea, totalizando 8 olhos, os quais, 7 apresentavam CCS grave, dentre eles 6 não produziam lágrimas e 1 produzia 2 mm/minuto. Apenas 1 olho era somente portador da CCS, apresentando 8 mm/minuto de lágrimas, deixando evidente que os animais estudados apresentavam a doença em estágio avançado, indicando cronicidade.

Quadro 1: Descrição dos cães usados no experimento

Cachorro	Raça	Idade	Sexo	Olhos Afetados
CCS1	Shih Tzu	6 anos	Macho	OD e OE
CCS2	SRD	10 anos	Femea	OD e OE
CCS3	Bull Dog Ingles	7 anos	Macho	OD e OE
CCS4	SRD	8 anos	Macho	OD e OE

Os animais foram avaliados por exames físico e clínico, teste da lágrima de Shirmer, teste da fluoresceína, hemograma completo e perfil bioquímico sérico (ureia, creatinina, ALT, FA). No processo de triagem foram eliminados do experimento animais com alterações que não fossem a CCS ou que apresentaram qualquer histórico de neoplasias.

Colheita do Tecido Adiposo

Foi realizada tricotomia e antisepsia da região do flanco, seguida de medicação pré-anestésica com Cloridrato de tramadol 3 mg/kg por via intramuscular (IM), sedados com o uso de anestésico propofol, na dosagem de 4 mg/kg, por via endovenosa (EV) e manutenção com isoflurano inalatório.

Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

As amostras de tecido adiposo foram lavadas com Solução Salina Equilibrada de Hank e digeridas com colagenase tipo IV, mantida a 37°C em estufa de cultivo celular, por 1 hora, seguido de inativação enzimática com DMEM suplementado com SFB, e em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi removido, e o precipitado ressuspensionado em mais 5 mL meio completo, sendo estes centrifugados mais uma vez.

Cada *pellet* de células foi ressuspensionado em 5 mL DMEM:F12 com 20% de SBF e mantido em cultivo para realização de repiques.

Para manutenção, o meio completo foi trocado a cada dois ou três dias, e os frascos de cultivo observados ao microscópio invertido (Axiovert 200, Zeiss®) para avaliação da morfologia e do crescimento da monocamada de células. Quando as culturas atingiram 90%, foram congeladas células no repique zero (#0), em 90% de Soro Bovino Fetal e 10% de Dimetil Sulfoxido, visando um grande número de células para posterior diferenciação, além de mostrar a resistência celular ao crescer e expandir após o descongelamento.

A cada repique foi verificada a viabilidade celular por meio do teste de exclusão pelo corante azul de Tripán.

Diferenciação celular

Diferenciação osteogênica

Foram utilizadas células em repique 5 (#5), plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/mL em placa de 24 poços. Após dois dias o meio completo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), trocado a cada dois dias durante 14 dias, seguindo recomendações do fabricante, e mantendo-se no controle negativo o meio completo. O potencial de diferenciação osteogênica foi avaliado pela coloração com solução de Alizarin Red S 2% por 5 min, após fixação com paraformaldeído 4% por 20 min à temperatura ambiente.

Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica foram utilizadas células em repique 5 (#5), cultivadas em tubo cônico de 15 mL, sob alta densidade celular ($5,7 \times 10^7$ células) em sistema de micromassa. Após centrifugação por 10 min a 556 g, o meio completo foi descartado e adicionado 5 mL de meio de indução de diferenciação condrogênica (STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), seguido de homogeneização e nova centrifugação. O tubo foi mantido em estufa a 37°C com 5% de CO₂, trocando-se o meio de diferenciação a cada dois dias durante 21 dias, seguindo recomendações do fabricante. Posteriormente, o meio foi retirado e adicionado 2 mL de paraformaldeído a 4% para fixação da micromassa. Esta foi retirada do tubo para desidratação em diluições seriadas de etanol e embebição em blocos de parafina seguindo protocolo histológico de rotina. Os blocos foram cortados com espessura de 5 µm e corados com solução de Alcian Blue 1% por 5 min.

Diferenciação Adipogênica

Para diferenciação adipogênica, as células foram inicialmente incubadas em placa de 24 poços (passagem 4), contendo DMEM/F12, em uma densidade de 1×10^4 células/cm² no quarto repique. Após 24 horas, este meio de expansão foi substituído pelo kit de diferenciação adipogênica (STEMPRO, Gibco), de acordo com as instruções do fabricante, contendo cálcio, fosfato de sódio, piruvato, bicarbonato de sódio, e as células permaneceram em cultivo por 21 dias, sendo a troca do meio realizada a cada 2 dias. Como controle negativo, um número igual de células foi incubada com meio de cultivo por igual período. Para confirmar a diferenciação em adipócitos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em Paraformaldeído 4% por 1 hora a temperatura ambiente, sendo lavadas novamente em PBS e coradas com 1,25% Oil Red O por 5 minutos para a visualização do acúmulo intracelular de vacúolos enriquecidos de lipídeos.

Imunofenotipagem

As células foram caracterizadas pela presença de marcadores de superfície exclusivo de células-tronco mesenquimais, CD105 e CD73, bem como por marcadores específicos para células-tronco hematopoiéticas, CD34 e CD45.

Células em repique 4 (#4) foram quantificadas, e transferidas para lamínulas redondas em placa de 24 poços com meio completo, e mantidas em estufa a 37°C, para aderência celular por 24 horas. Após atingir 70% de confluência, retirou-se o meio de cultivo e efetuou-se lavagem em PBS três vezes. As células foram incubadas em PFA 4% por 30 minutos à temperatura de 4°C, e após duas lavagens, foi feito o bloqueio com Albumina Sérica Bovina (BSA) 2% durante 6 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas *overnight* com anticorpos primários diluídos em PBS (CD105 - 1:25, CD73 -1:25, CD34 - 1:100, CD45 - 1:100) em ambiente úmido.

Para marcação imunocitoquímica, cada etapa foi intercalada com duas lavagens em PBS, por 5 minutos cada. Fez-se a incubação do anticorpo secundário (150µl diluído em BSA 2%) por 50 minutos. Após lavagens, adicionou-se DAPI (1:10.000), diluído em PBS, por 5 minutos à temperatura ambiente, e em seguida foi feita nova lavagem com PBS para posterior montagem com Prolong (Life Technologies/ P36930). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon 80i) em quatro campos diferentes.

Administração de células-tronco mesenquimais

Após confirmação da ceratoconjuntivite seca, diagnosticada a partir do teste da lágrima de Schirmer, os animais receberam por via tópica, células-tronco mesenquimais autólogas, derivadas de tecido adiposo.

Padronizou-se a utilização de 1×10^6 células em média no repique 2 (#2), diluídas em 0,1 mL de solução salina 0,9%, as quais foram instiladas em cada olho acometido pela CCS, com auxílio de uma seringa de 1 mL.

Foram realizadas três aplicações por via tópica, com intervalo de 30 dias, precedidas de colheita de sangue para análises clínicas. As células autólogas, foram

diretamente instiladas em cada olho, os quais eram avaliados semanalmente quanto a evolução clínica e a produção lacrimal, por meio do Teste de Schirmer.

Estatística

As análises estatísticas referentes as Análise de variância de medidas repetidas no tempo (ANOVA) ($p < 0,05$) foram avaliadas quanto aplicação, observação e a interação entre os animais e as observações, seguido de comparações com o controle (BL), usando o teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$).

As análises estatísticas referentes as Análise de variância não paramétricas que avaliaram secreção ocular, vascularização e opacidade da córnea, comparando o grupo controle (BL), as observações (dias 7, 14 e 21) foram realizadas pelo Teste de Friedman ($p < 0,05$).

Resultados

O teste da fluoresceína evidenciou ausência de úlceras de córnea, nos dois olhos, de todos os animais envolvidos no estudo. O teste de ameaça se apresentou reduzido no olho direito e negativo no olho esquerdo, para o animal CCS-1. Nos animais CCS-2 e CCS3, o mesmo teste apresentou sinais reduzidos em ambos os olhos. Já o animal CCS-4 apresentou-se positivo para o mesmo teste nos dois olhos.

Cultivo e viabilidade celular

Durante o processamento das células foi possível observar que após 24 horas poucas células haviam aderido à superfície plástica da garrafa de cultivo, podendo evidenciar uma população celular heterogênea. Com confluência de aproximadamente 90%. Após uma semana de expansão, as células apresentaram morfologia

fibroblastoide, constituindo-se uma população homogênea, mantendo este padrão até o repique, sendo utilizada em seguida para aplicação nos cães.

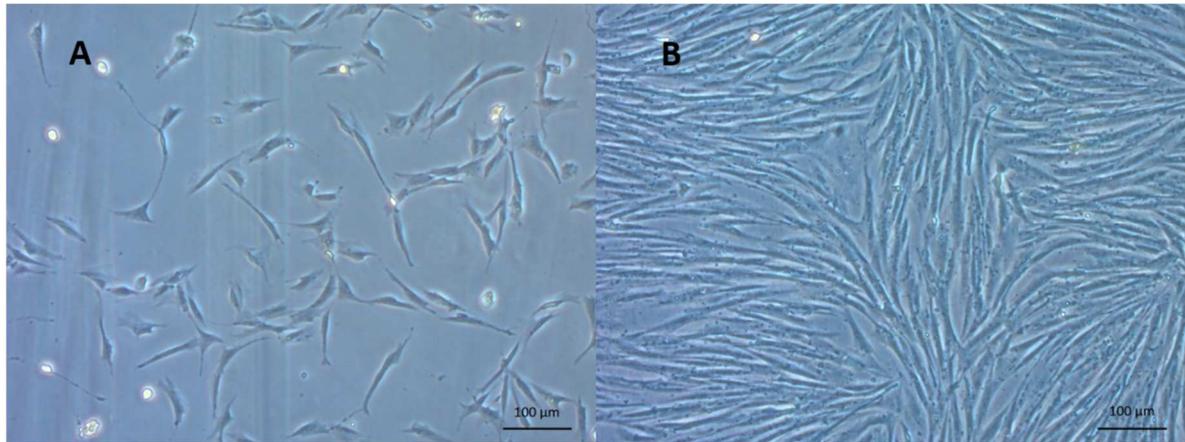


Figura 1: Fotomicrografia da cultura de *CTM-TA* de cão portador de ceratoconjuntivite seca (CCS) em #0 (A) e #2 (B). Barra de escala: 100 µm (5x).

Quanto ao teste de viabilidade, as células-tronco mesenquimais mostraram valor mínimo de 83,2% e máximo de 96,3%, mantendo uma média de 91,05% de viabilidade entre os repiques analisados, utilizando-se o segundo repique (#2) para aplicação nos cães portadores de CCS incluídos no experimento.

Diferenciação celular

Passados 14 dias de incubação em meio de indução osteogênica, houve a produção de matriz de cálcio extracelular identificada em vermelho pela coloração Alizarin Red (Fig. 2 A). Após incubação em meio adipogênico, as CTM tornaram-se arredondadas, e ao longo de 21 dias foi possível observar aumento gradual da presença de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas, observáveis em microscopia de luz, as quais posteriormente se agregavam formando pequenas gotas evidenciadas pela coloração Oil Red O (Fig. 2 B). Na diferenciação condrogênica, realizada em sistema de cultura em micromassa, após 21 dias de indução as células formaram um botão visível bem definido, então corado em azul pela coloração Alcian Blue, devido sua sensibilidade na detecção de proteoglicanos (Fig. 2 C).

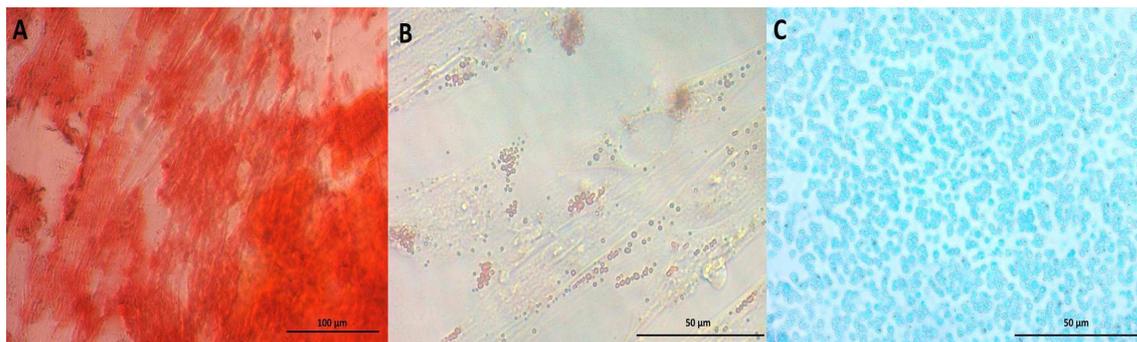


Figura 2: Diferenciação celular de CTM-TA de *cão*. (A) Osteogênica, demonstrando matriz de cálcio extracelular pela coloração Alizarin Red. (B) Adipogênica, demonstrando gotículas lipídicas pela coloração Oil Red O. (C) Condrogênica, demonstrando proteoglicanos corados em azul pelo Alcian Blue. Barra de escala: 100 µm em A, e 50 µm em B e C.

Imunofenotipagem

No estudo imunocitoquímico observou-se marcação positiva para marcadores de células mesenquimais CD73 (sc-14684), Vimentina (Santa Cruz), e CD105 (Abcam 53321) e negativas para marcadores de células hematopoiéticas CD34 e CD45, conforme o esperado.

Infusão de células-tronco mesenquimais

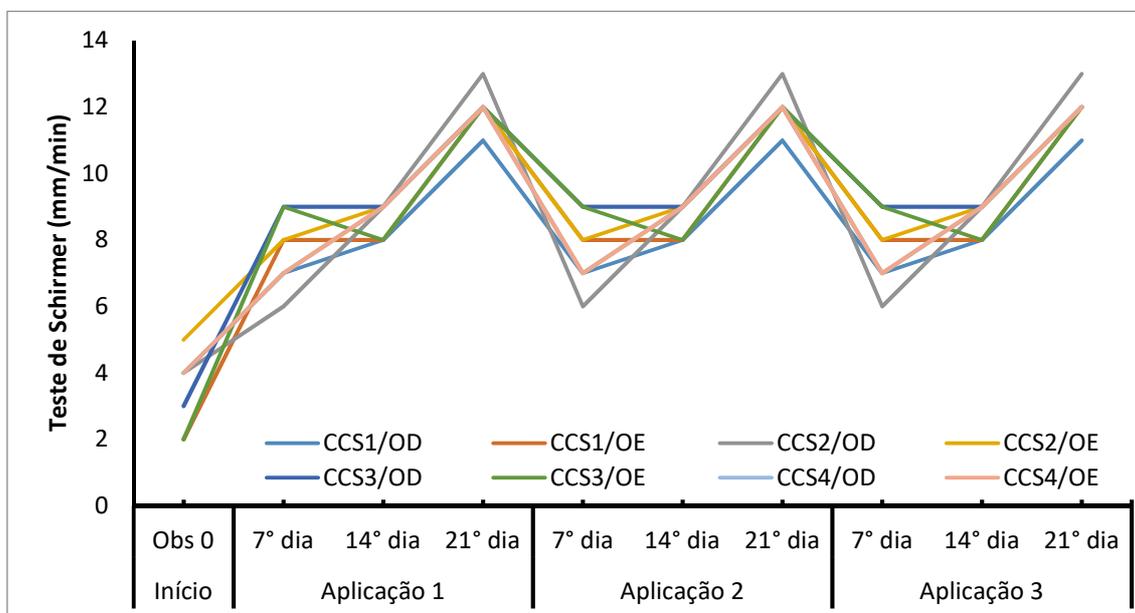
Inicialmente, antes de avaliar os resultados é importante destacar que houve uma intercorrência com o paciente CCS1, no 21º dia de avaliação da 2ª aplicação de células, que sofreu um trauma mecânico na córnea esquerda, gerando uma úlcera, a qual teve que ser tratada paralelamente de forma convencional, com antibiótico e anti-inflamatório local, durante 10 dias.

No que tange a produção de lágrimas nos animais avaliados, observamos que após as três aplicações de CTM, somente um paciente apresentou melhora significativa, porém, destacamos que esse mesmo animal já revelava pequena produção lacrimal antes do tratamento com CTM, inclusive o olho direito do referido cão era apenas portador da CCS, apresentando produção lacrimal de 8 mm/minuto antes do tratamento com células, enquanto que os demais animais não produziam lágrima. Todavia, ainda foi possível

observar que os demais pacientes, mesmo que de forma sutil, passaram a produzir lágrimas, ainda que de forma oscilante quanto aos intervalos de aplicações de CTM.

O paciente CCS3, apesar de demonstrar na primeira aplicação, uma quantidade de lágrima satisfatória crescente nos dois olhos, apresentou pequena queda de produção lacrimal nas aplicações seguintes, e mesmo com produção de lágrima maior quando comparado com os demais pacientes, ainda se considera insatisfatório do ponto de vista clínico, talvez por influência direta de fatores ambientais, os quais o paciente estava inserido (Gráfico 1).

Gráfico 1: Efeito das Células-tronco mesenquimais em cães diagnosticados com CCS por meio do Teste de Schirmer em mm/minuto



Quanto aos resultados estatísticos para valores de Teste Schirmer (STT) antes e depois da aplicação de CTM, foi observado que existe diferença entre o parâmetro inicial basal (BL), que é o grupo controle, com relação as observações, valores do STT nos dias 7, 14 e 21 (média \pm Erro padrão da média em mm / minutos) antes e depois da aplicação de CTM e também entre as unidades experimentais, já que os olhos CCS3/OD e CCS3/OE se destacam na produção de lágrimas com relação aos demais como observado na Tabela 1.

Tabela 1: Análises estatísticas para valores de STT (média \pm Erro padrão da média em mm / minutos) antes e depois da aplicação de CTM

Animais	Observações (dias)				Total
	0	7	14	21	
CCS1/OD	0,00(\pm 0,00)	0,33(\pm 0,58)	2,67(\pm 1,53)	1,33(\pm 0,58)	1,08(\pm 1,31)
CCS1/OE	0,00(\pm 0,00)	1,33(\pm 0,58)	2,67(\pm 1,53)	1,83(\pm 2,36)	1,45(\pm 1,59)
CCS2/OD	0,00(\pm 0,00)	4,00(\pm 3,00)	3,67(\pm 1,15)	4,33(\pm 1,53)	3,00(\pm 2,37)
CCS2/OE	0,00(\pm 0,00)	2,33(\pm 1,53)	3,00(\pm 2,00)	2,00(\pm 1,00)	1,83(\pm 1,64)
CCS3/OD	8,00(\pm 0,00)	11,33(\pm 0,58)	10,00(\pm 2,65)	12,00(\pm 7,21)	10,33**(\pm 3,65)
CCS3/OE	2,00(\pm 0,00)	9,33(\pm 5,77)	12,50(\pm 4,77)	11,00(\pm 2,65)	8,71**(\pm 5,40)
CCS4/OD	0,00(\pm 0,00)	1,67(\pm 1,15)	6,33(\pm 1,15)	4,66(\pm 0,58)	3,17(\pm 2,69)
CCS4/OE	0,00(\pm 0,00)	4,00(\pm 1,00)	5,66(\pm 1,53)	2,66(\pm 1,53)	3,08(\pm 2,39)
Total	1,25(\pm 2,70)	4,29*(\pm 4,31)	5,81*(\pm 4,02)	4,98*(\pm 4,72)	4,08(\pm 3,94)

*Comparação pelo Teste de Dunnett entre as observações 7, 14 e 21 com o grupo controle (BL) $p < 0,05$.

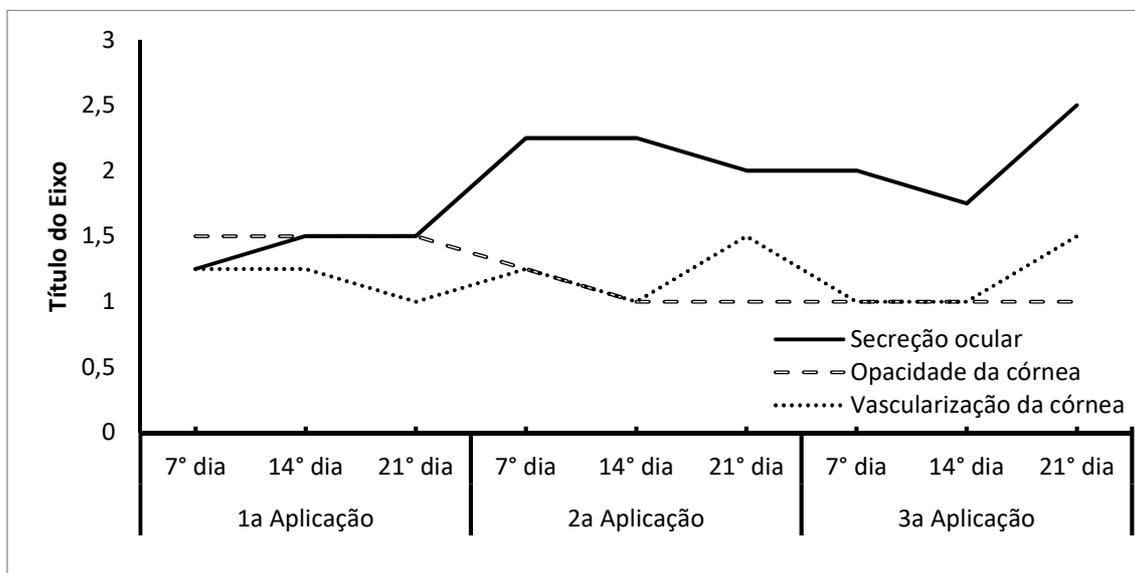
**Comparação pelo Teste de Tukey entre as unidades experimentais $p < 0,05$.

Quanto a secreção ocular (Gráfico 2), ao avaliarmos clinicamente o animal CCS1 observamos que houve diminuição considerável logo após a primeira aplicação de CTM, no entanto, após o trauma mecânico da córnea e conseqüente formação de úlcera, observamos que a secreção ocular aumentou, mantendo-se como no estágio inicial, sendo válido destacar que até antes do trauma houve melhora importante do processo inflamatório ocular em ambos os olhos do animal (Figura 3). Os animais CCS2 (Figura 4) e CCS4 apresentaram queda acentuada da secreção ocular, principalmente o animal CCS4 (Figura 6). Já o animal CCS3 (Figura 5), apesar da diminuição de secreção ocular no período da 1ª aplicação celular, provavelmente, em decorrência da exposição à poeira

oriunda da reforma da residência do proprietário, a secreção ocular voltou a aumentar consideravelmente, principalmente no período da 2ª aplicação

O Teste estatístico de Friedman usado para avaliação dos dados não paramétricos confirma o efeito significativo e a diminuição da secreção ocular dos animais avaliados quando comparamos a BL, quantidade de secreção antes da aplicação de CTM, com os dias 7, 14 e 21 após uso tópico de células-tronco.

Gráfico 2: Quantidade de secreção ocular, opacidade da córnea e vascularização da córnea, no decorrer do tratamento com células-tronco mesenquimais (Utilizando-se as médias dos valores encontrados para cada animal avaliado).



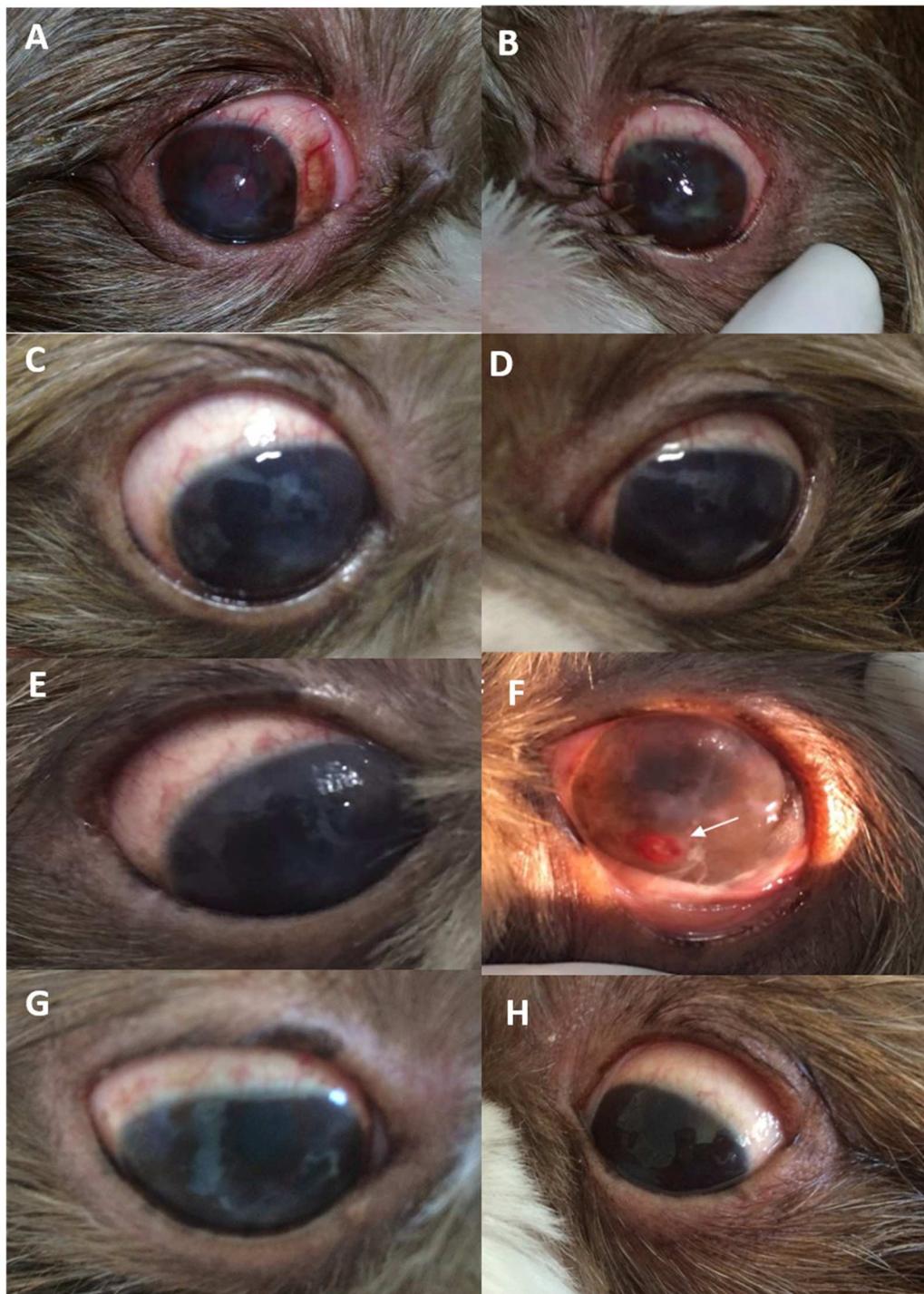


Figura 3: Animal CCS-1: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando vasos congestionados, hiperemia, ressecamento palpebral e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1° aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2° aplicação de células-tronco, na qual em F (seta) observa-se úlcera de córnea causada por trauma mecânico. (G e H) ambos após 3° aplicação de células-tronco.

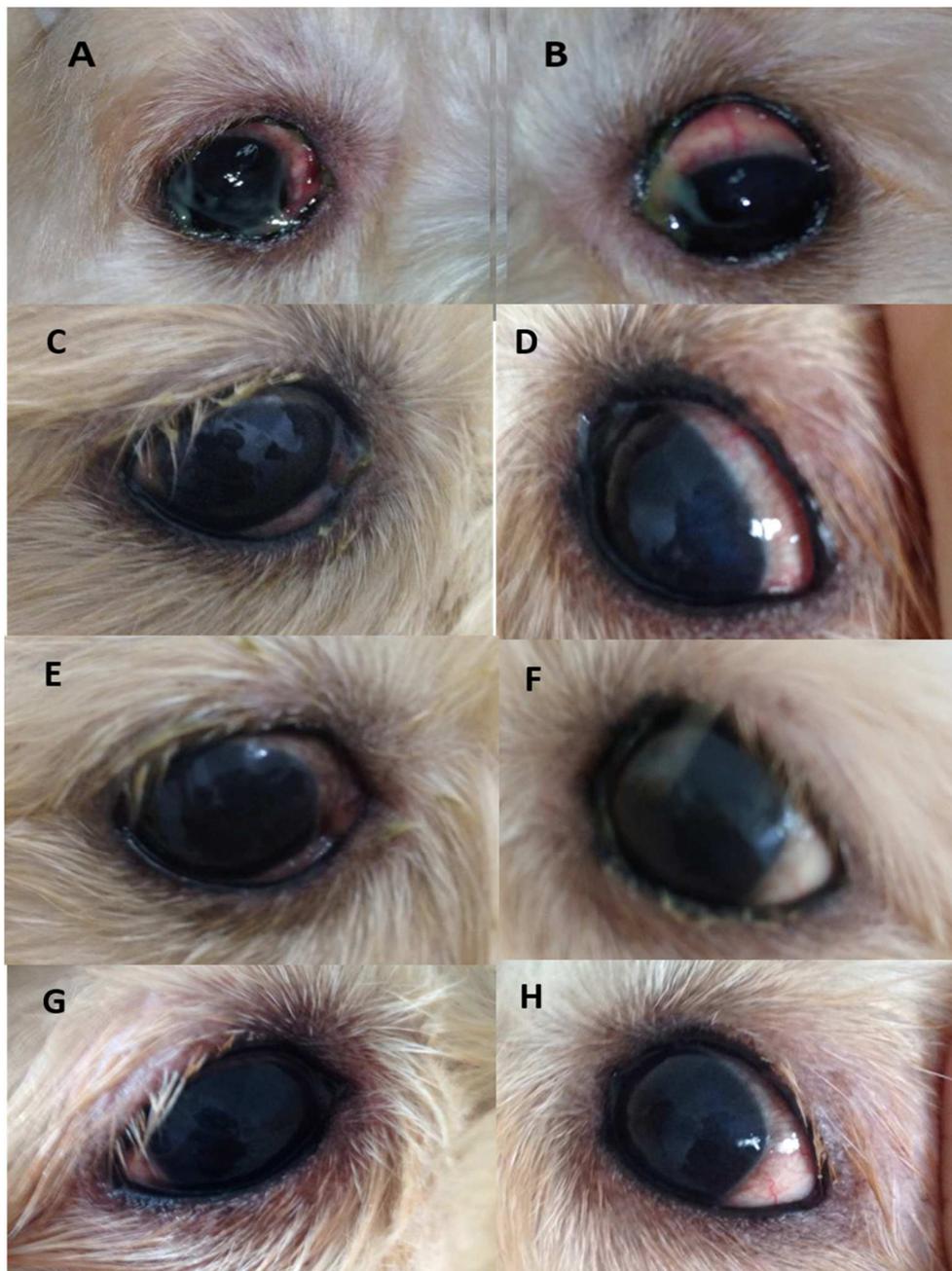


Figura 4: Animal CCS-2: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando vasos congestionados, hiperemia, secreção mucopurulenta e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1º aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2º aplicação de células-tronco. (G e H) ambos após 3º aplicação de células-tronco.

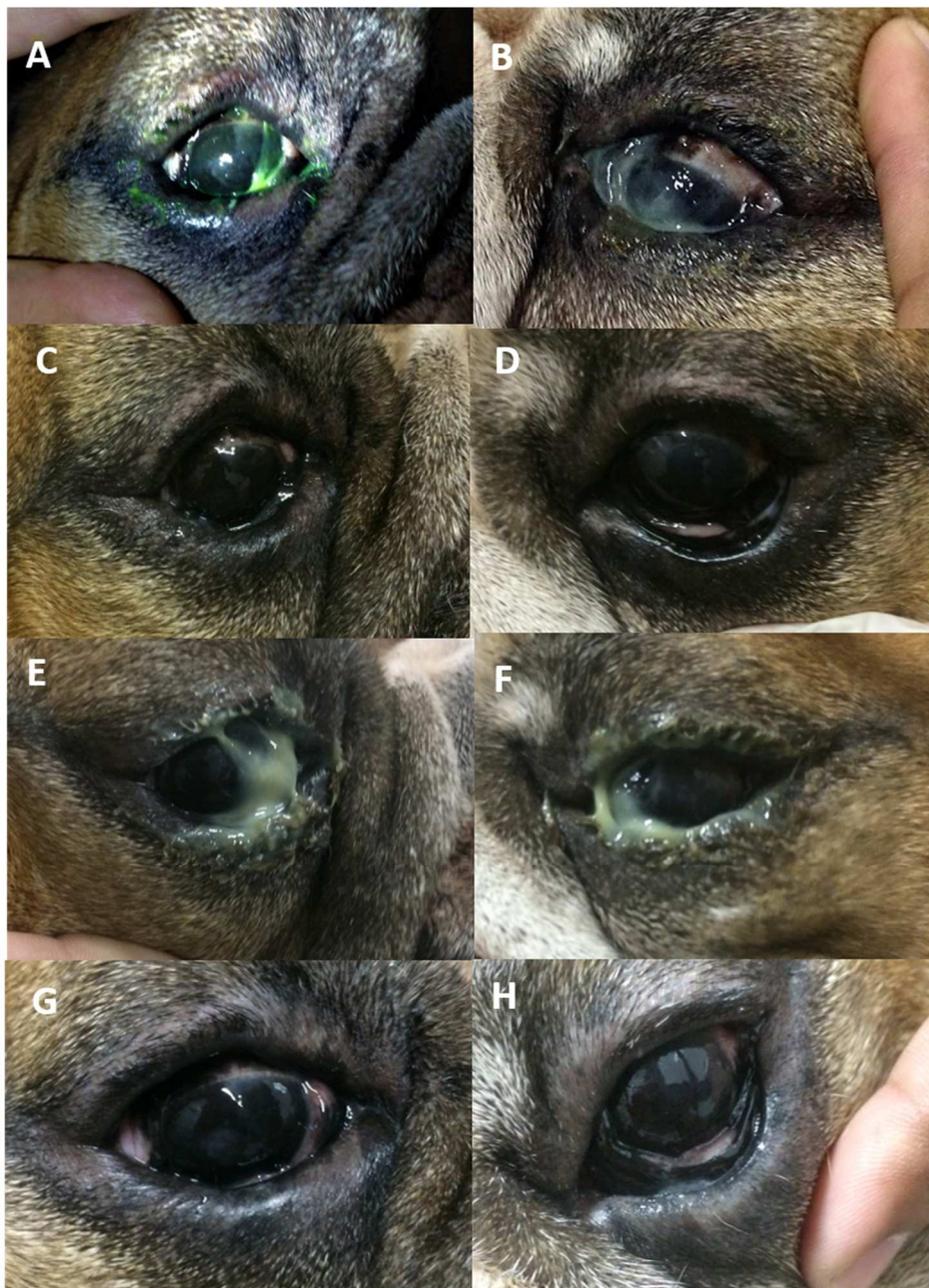


Figura 5: Animal CCS-3: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando hiperemia, secreção mucopurulenta e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1^o aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2^o aplicação de células-tronco, com grande quantidade de secreção mucopurulenta após início das obras. (G e H) ambos após 3^o aplicação de células-tronco.

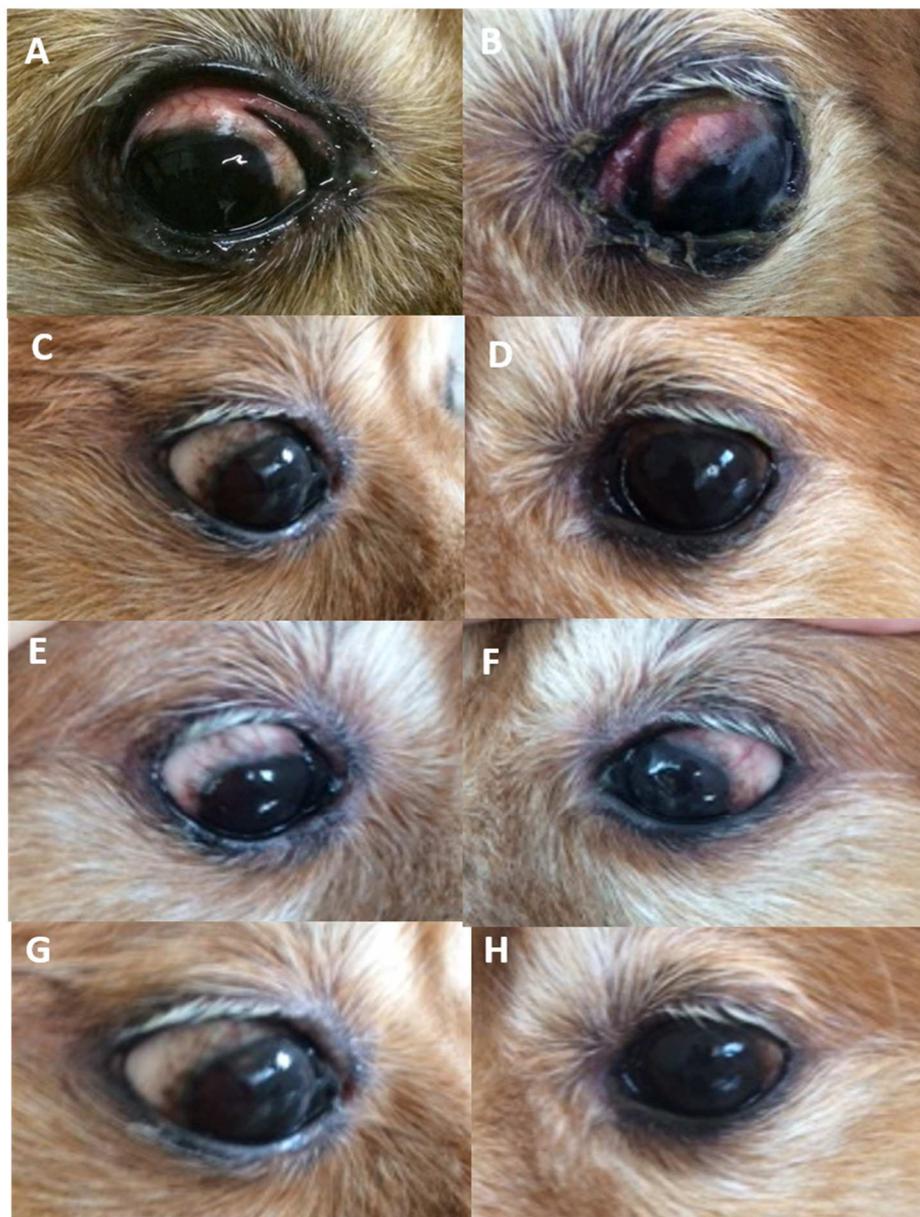


Figura 6: Animal CCS-4: (A, C, E e G) Olho direito e (B, D, F e H) Olho esquerdo, (A e B) ambos antes da aplicação de células-tronco evidenciando vasos congestionados, hiperemia, secreção mucopurulenta, ressecamento palpebral e processo inflamatório evidente. (C e D) ambos após 1^o aplicação de células-tronco mostrando processo inflamatório diminuído. (E e F) ambos após 2^o aplicação de células-tronco. (G e H) ambos após 3^o aplicação de células-tronco.

Quanto a opacidade e vascularização da córnea (Gráfico 2) em decorrência da CCS, todos os pacientes apresentaram melhora significativa durante todo o período de avaliação clínica, o que também foi confirmado pela análise de variância não paramétrica pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A escolha da utilização de tecido adiposo para obtenção de células-tronco mesenquimais se deu devido sua alta capacidade de proliferação e obtenção, além de ser abundante, apresenta possibilidade de se diferenciar em células com função secretora, parácrina, ação anti-inflamatória e imunomoduladora, como atestado por Kapur e Katz, (2013). Já a escolha de células autólogas e da via tópica para aplicação, se deu objetivando a praticidade e conseqüentemente a segurança do receptor, o qual teria os riscos de rejeição e de submissão a anestésicos reduzidos, já que por esta via não haveria necessidade de sedar o animal para aplicação das células, além do que as células instiladas seriam do próprio animal avaliado.

Para o transplante de células, foi padronizada a utilização de 1×10^6 células em média no repique 2 (#2), já que de acordo com estudos anteriores, a mesma possibilita a obtenção de uma quantidade de células-tronco derivadas de tecido adiposo suficiente, evitando subcultura adicional desnecessária, além de taxas de decaimento, esta média também diminui as instabilidades cromossômicas reforçando o descrito por REDAELLI et al, (2012) e BINATO et al, (2013).

No que concerne a produção lacrimal apenas o olho que era portador de CCS moderada apresentou melhora significativa, corroborando com descrito por Mottin et al, (2015), o qual refere que pacientes com menor grau de severidade da doença apresentam respostas melhores ao tratamento com células-tronco. No entanto, o mesmo autor relata que cães com idades mais avançadas e apresentando CCS grave, não respondem quanto ao aumento da produção lacrimal, o que destoia dos resultados encontrados no presente trabalho, já que mesmo que de maneira sutil e oscilante quanto aos intervalos de aplicações de CTM, animais com idade mais avançada e com ausência de produção lacrimal anterior, CCS grave, passaram a apresentar a referida produção.

Ratificando o observado em nosso estudo, Ramos (2016) mostra os benefícios das CTM aos cães com CCS, mesmo não havendo reversão do quadro crônico da doença, sugerindo a cronicidade como fator limitante dessa irreversibilidade, provavelmente devido ao fato de já haver formação de tecido fibrótico, o qual pode dificultar que existam células e tecidos viáveis a recuperação, evidenciando a necessidade de estudos com a utilização de estágios mais moderados e leves da enfermidade.

Quanto a secreção ocular, a qual representa uma característica importante relacionada ao processo inflamatório da doença, os animais que não sofreram influência de fatores externos apresentaram melhora significativa após aplicações de CTM, reforçando a ação anti-inflamatória e imunomoduladora destas células (BITTENCOURT, et al. 2016; e RAMOS, 2016). Já os animais que passaram por intercorrências como trauma mecânico e exposição a poeira excessiva, apresentaram melhora apenas até o momento das referidas perturbações ao curso normal do tratamento, o que sugere certa fragilidade do tratamento com células, permitindo questionamentos quanto à frequência de aplicações e aos intervalos de tempo em que elas acontecem.

Torna-se importante ressaltar ainda, que em cães, muitos casos de CCS são idiopáticos e apresentam níveis elevados de células inflamatórias as quais continuam se perpetuando e causando novas destruições teciduais, mesmo em áreas onde o tecido já estivesse passado por processo de regeneração anterior (Willians, 2008), o que talvez justificasse a não durabilidade da resposta ao tratamento da doença. Além disso, para que a ação inflamatória não se perpetue é preciso que haja o controle da ação inflamatória imunomediada (BEM-AMI et al., 2011; LI et al., 2013) e por mais que as células-tronco mesenquimais tenham esse papel contra as células T já conhecidos, os seus efeitos podem ser anulados com o passar dos dias (Zappia et al., 2005).

Com relação a vascularização e opacidade da córnea, todos os animais do experimento apresentaram melhora significativa, provavelmente devido fatores angiogênicos e de cicatrização que tornam a terapia celular bastante atraente para o tratamento de diversas enfermidades inclusive a CCS (STEED et al, 2008; PAROLINI, 2010), revelando melhora significativa na qualidade da superfície ocular dos animais avaliados (PEIXOTO, 2013).

O estudo mostra que o transplante autólogo de células-tronco derivadas de tecido adiposo é um procedimento seguro e bem tolerado pelos cães, induzindo aumento no teste de Schirmer, e não revelando a ocorrência de nenhum tipo de enfermidade associada com formação anormal de tecido, nem com incidência de tumor ou rejeição tecidual, não necessitando do uso de drogas imunossupressoras, assim como descrito por FONSECA, (2011), PEIXOTO (2013) e BITTENCOURT, et al. (2016).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados podemos inferir que o transplante autólogo de células-tronco derivadas de tecido adiposo é um procedimento seguro e bem tolerado por caninos. No entanto, o custo benefício do tratamento da CCS no que concerne o uso tópico de células-tronco mesenquimais precisa ser melhor avaliado, já que esse tratamento é bem mais oneroso do que o convencional estabelecido e segundo o presente trabalho, também é limitado quando se trata de animais com CCS grave, pois a produção lacrimal nesses animais é sutil e não afasta por completo os sintomas e incômodos causados pela doença, uma vez que não alcançam uma produção lacrimal adequada para tal, se fazendo necessário mais estudos utilizando estágios menores de cronicidade para avaliar reversão completa do quadro e solução para animais diagnosticados com CCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, K. C. Congenital keratoconjunctivitis sicca and ichthyosiform dermatosis in the Cavalier King Charles Spaniel. *Journal of Small Animal Practice*, v.47, p.524-528, 2006.

BARROS, P. S. M. Córnea em medicina veterinária. In: BELFORT, R.; KARA-JOSÉ, N. *Córnea Clínica-Cirúrgica*. Roca; p.603-607; 1997.

BEM-AMI, E.; AKNIN, S. B.; MILLER, A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*., v. 10, n. 7 p.410-415, 2011.

BERANCK, F. Keratoconjunctivitis sicca. Introduction and case reports. World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA. 2006.

BINATO, R.; FERNANDEZ, T. S.; LAZZAROTTO-SILVA, C. Estabilidade de células estaminais mesenquimais humanas durante a cultura in vitro: considerações para terapia celular. *Proliferação celular*, v. 46, n. 1, p. 10-22, 2013.

BITTENCOURT, M. K. W.; BARROS, M. A.; MARTINS, J. F. P.; VASCONCELLOS, J. P. C.; MORAIS, B. P.; POMPEIA, C.; BITTENCOURT, M. D.; EVANGELHO, K. S.; KERKIS, I.; WENCESLAU, C. V. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Medicine*, v. 8, p. 63–77, 2016.

BRITO, F. L. C. Et al. Microalterations in the third eyelid gland of dogs with keratoconjunctivitis sicca secondary to distemper. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.2, p.340-344, 2007.

FONSECA, S.A. Efeitos clínicos e histopatológicos da aplicação autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e cães. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 83p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). 2011.

HARTLEY C., WILLIAMS D.L. & ADAMS V.J. Effect of age, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*. v. 9, p. 53-57, 2006.

HERRERA, D. Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia. 1ª Ed, Editora Medvet, p.111-140, São Paulo, 2008

JAIN, N. Essentials of Veterinary Hematology. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 486 p. 2003.

KAPUR, S. K., e KATZ, A. J., Avaliação da haste adiposo derivado secretome celular. *Bioquímica*, vol. 95, no. 12, p. 2222-2228, 2013.

KLEINNER, J. A. Tratamento Cirúrgico da Epífora Crônica em Animais de Companhia. 2006. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Patologia Animal do Curso de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal do Paraná. 2006.

LAUS, J. L., ORIÁ, A. P. Doenças Corneanas em Pequenos Animais. *Revista de Educação continuada do CRMV-SP*. São Paulo, v. 2, nº 1, p. 26-33, 1999.

LAUS, J. L., GALERA, P. D., ORIÁ, A. P. Principais Afecções da Túnica Fibrosa. In: *Oftalmologia clínica em cães e gatos*. Ed. Rocca, Rio de Janeiro, cap. 4, p. 69-95, 2009.

LI, G.; YUAN, L.; REN, X.; NIAN, H.; ZHANG, L.; HAN, Z.C.; LI, .; ZHANG, X. The effect of mesenchymal stem cells on dynamic changes of T cell subsets in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clinical and experimental immunology*. Jan, 2013.

MOTTIN, I. B.; WITZ, M. I.; NARDI, N. Comparação clínica da produção lacrimal, em cães com Ceratoconjuntivite Seca, utilizando tratamento com células-tronco pela via tópica e periglandular. Anais Expoulbra. p. 20 – 22, Outubro, Canoas/RS, Brasil. 2015.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BERGWERF, I.; BORASCHI, D.; DE BARI, C.; DE WAELE, P. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. Stem Cells Development, v. 19, p. 1454, 2010.

PEIXOTO, R. V. R. Aplicação autóloga da fração de células mononucleares (fcm) da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra em cães com Ceratoconjuntivite Seca, e sua repercussão sobre a superfície ocular. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Brasília/DF. 2013.

PIGATTO, J. A. T.; PEREIRA, F. Q.; ALMEIDA, A. C. R.; REDAELI, R.; FAGANELLO, C. S.; FRANZEN, A. A. Ceratoconjuntivite seca em cães e gatos. Acta Scientiae Veterinariae. v. 35, n. Supl 2, p. 250-251, 2007.

PIGATTO, J. A. T.; PEREIRA, F. Q.; ALMEIDA, A. C. V. R.; REDAELLI, R.; ALBUQUERQUE, L. Ceratoconjuntivite seca em cães – revisão de literatutra. Veterinária em Foco, v.5, n.2, jan./jun. 2008.

RAMOS, D. S. Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-graduação em anatomia dos animais domésticos e silvestres da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP- São Paulo. 2016.

RADAELLI, S.; BENTIVEGNA, A.; FOUDAH, D. Fromcytogenomic para perfis epigenômicos: monitorização do comportamento biol[ogico in vitro de células estaminais mesenquimais da medula óssea humana cultivadas. Stem Cell Research and Therapy, v. 3, n. 6, artigo 47, 2012.

RIBEIRO, A.P., BRITO, F.L.C., MARTINS, B.C., MAMEDE, F., LAUS, J.L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. Ciencia Rural, v. 38, n.2, mar-abr; 2008.

STEED, D. L.; TRUMPOWER, C.; DUFFY, D.; SMITH, C.; MARSHALL, V.; RUPP, R. Amnionderived cellular cytokine solution: a physiological combination of cytokines for wound healing. Eplasty, v. 8, p. 18, 2008.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHAL, V. S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. v. 282, n. 5391, p. 1145-47, 1998.

VIANA, F. A. B. Guia Terapêutico Veterinário. Gráfica e Editora CEM Ltda, Belo Horizonte. 324p. 2003.

WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Veterinary Clinics Small Animal Practice.*, v.38, p.251-268, 2008.

ZAPPIA, E.; CASAZZA, S.; PEDEMONTE, E.; BENVENUTO, F.; BONANNI, I.; GERDONI, E.; GIUNTI, D.; CERAVOLO, A.; CAZZANTI, F.; FRASSONI, F.; MANCARDI, G.; UCCELLI, A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.*, v.6, n.5, p.1755-1761, 2005.

ZUTTON, M. S. S. R; WENCESLAU, C. V.; LEMOS, P. A.; TAKIMURA, C.; KERKIS, I. Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*; v. 21, n. 3, p. 281-7, 2013.

ANEXO 1**Parâmetros de referências para hemograma em canino:**

PARÂMETROS	CANINO
Hemácias (x 10 ⁶ /ul)	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/dl)	12 – 18
Hematócrito (%)	37 – 55
VGM (fl)	60 77
CHGM (%)	32 – 36
Plaquetas /mm ³	175.000 – 500.000
Leucócitos	6000 - 17000
Linfócitos	1000 – 4800
Monócitos	150 – 1350
Eusínófilos	100 – 1250
Basófilos	0
Segmentados	3000 - 11500

Fonte: JAIN, 2003

Parâmetros de referências para bioquímico em canino:

EXAME	REFERÊNCIAS
ALT(UI/L)	ATÉ 50
FA (UL/L)	ATÉ 70
UREIA (MG/dL)	até 40
Creatinina (MG/dL)	até 1,5

Fonte: VIANA, 2003.

ANEXO 2



Universidade Federal Rural da Amazônia
Instituto da Saúde e Produção Animal



Ficha de Avaliação Veterinária

Dados do Animal

Nome: Raça: Sexo:
Idade: Telefone: Grupo:
Proprietário:

Exame Clínico

Anamnese:

TRº: TC: TPC:

Pele e pelos:

Uso de medicamentos: () Sim () Não Quais:

Doenças preexistentes: () Sim () Não Quais:

Observações:

Exame Oftalmológico

Teste da Fluoresceína: () Positivo OD / OE () Negativo OD / OE

Teste de Schirmer: OD (_____) OE: (_____)

- Valores de referência:
 - entre 10 e 15 mm/minuto → suspeitos
 - inferiores a 10mm/minuto → portadores
 - inferiores a 5 mm/minuto → CCS grave

Grau de Inflamação e comprometimento ocular:

- Fotofobia: () Sim () Não
- Blefaroespasma: () Sim () Não
- Teste de Ameaça: () Positivo () Negativo () Reduzido
- Quantidade de secreção:
- Coloração da secreção:
- Pigmentação da córnea:
- Opacidade da córnea:
- Vascularização da córnea/esclera:
- Aspecto da glândula:
 - Valores de referência: Escala de intensidade variando de + a +++++

Observações:

Exames Laboratoriais de Triagem

Hemograma:

() Dentro dos padrões de normalidade correspondentes a espécie e idade

() Alterações Quais: _____

Uréia:

Creatinina:

ALT:

FA:

Médico(a) Veterinário(a) Responsável: