

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

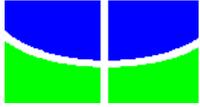
**APLICAÇÃO AUTÓLOGA DA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (FCM)
DA MEDULA ÓSSEA SOBRE A GLÂNDULA DA TERCEIRA PÁLPEBRA EM
CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA, E SUA REPERCUSSÃO SOBRE A
SUPERFÍCIE OCULAR.**

Mestrando: Rômulo Vitelli Rocha Peixoto

Dissertação de Mestrado em Saúde Animal

Brasília/DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**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.**

Rômulo Vitelli Rocha Peixoto

Orientadora: Profa. Dra. Paula Diniz Galera

Publicação 080/2013

Dissertação de Mestrado em Saúde Animal

Brasília/DF

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 72p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Peixoto, Rômulo Vitelli Rocha

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. / Rômulo Vitelli Rocha Peixoto orientação de Paula Diniz Galera – Brasília, 2013. 72p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Ceratoconjuntivite seca. 2. Cães. 3. Células-tronco. 4. Fração de células mononucleares. I. Galera, P.D. II. Título



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**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.**

Rômulo Vitelli Rocha Peixoto

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL
APROVADA POR:

Prof^ª. Dr^ª. Paula Diniz Galera (FAV/UnB)
(ORIENTADORA)

Prof. Dr José Luiz Laus (FCAV- UNESP - Jaboticabal)
(EXAMINADOR EXTERNO)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Regina Catai Chalita (FM/UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 15 de julho de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luis Antônio e Lygia, vocês são o meu espelho, a minha inspiração de força de vontade, trabalho, caráter e dedicação profissional e familiar. Sem vocês nunca poderia chegar aonde cheguei.

Dedico também a duas princesas lindas que caíram na minha vida, Eliana e Mariah. Vocês foram companheiras de todas as horas, minhas confidentes, minhas amigas, meus pilares. Você Eliana me apoiando, aguentando meu mau humor e nunca deixando de me amar. Já você minha pequena gorducha, desde cedo sendo minha companheira nas manhãs de estudos, chegou e mudou para sempre a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, ele que me guia e abres portas. Sem a sua ajuda não conseguimos chegar a lugar algum.

Agradeço a professora Dra. Paula Galera que mais uma vez confiou em mim, me apoiou e juntos realizamos mais um projeto. Assim chegamos a cinco anos de trabalhos, conquistas e graças a Deus muitas alegrias.

Agradeço as minhas irmãs Isabela e Rafaela que sempre me apoiam e comemoram junto comigo as conquistas.

Agradeço aos meus fiéis escudeiros: Adalberto, Preto, Xena, Jabuticaba, Safira, Paçoca, Magrelo, Ziggy, Boni, Magali, Lessie, Baldochi e Bolt, vocês são a razão do meu esforço e dedicação. Ter vocês como companheiros faz qualquer veterinário se sentir especial.

Agradeço aos meus familiares e amigos. Pessoas que me acompanham em todos os momentos, e que me ajudaram muito nesta caminhada do mestrado.

Agradeço ao Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília por fornecer toda a estrutura necessária para realização deste projeto.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar o projeto e acreditar na realização deste estudo (Edital Universal - 479526/2011-7).

Agradeço à todos os professores, médicos veterinários, residentes e funcionários do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília pela ajuda durante a condução dos estudo. Em especial a todas as meninas da equipe de Clínica Cirúrgica, pois sem a ajuda de vocês não teria como chegar tão longe.

Agradeço ao professor Dr. Luis Isamu Barros Kanzaki e aos seus alunos Anderson e Elisângela pela ajuda intelectual e disponibilização do Laboratório de Bioprospecção da Universidade de Brasília para realização do experimento.

Agradeço ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília, em especial ao professor Dr. Janildo Reis e a Médica Veterinária Letícia Batelli, pela ajuda e dedicação nos exames histopatológicos e disponibilização do laboratório.

Agradeço ao professor Dr. Vitor Gonçalves e a M.V.Msc Ana Lourdes Arrais pela colaboração nas análises dos resultados deste estudo.

Agradeço ao M.V. Msc Augusto Moscardini, meu primeiro mestre, quem me ensinou a olhar o mundo como Médico Veterinário.

Agradeço à profa. Dra. Maria Regina C. Chalita e ao prof. Dr. José Luiz Laus por participarem da banca e pelas sugestões para melhoria do trabalho.

E não poderia de deixar de fazer um agradecimento mais que especial aos proprietários que abraçaram o trabalho, os quais além de autorizar a realização do tratamento, se comprometeram e levaram seus animais semanalmente para as avaliações. Bem como dos pacientes que foram colaborativos e muito tolerantes com a realização das avaliações. Bart e Luciana; Duqueza e Sidarta; Lulu e José; Paloma e Sandra; Kareen e Marco Aurélio; Nico e Claudia; Spify e Elisângela; Fred e Maria; Babaloo e Valéria; July e César; Mel e Patrícia; Thor e Antônia; Bidu e Andrea; Nina e Rita; Bel Marques e Maria.

SUMÁRIO

Resumo	xii
Abstract	xiv
Capítulo I	16
Introdução	16
Referencial Teórico	17
Referências	28
Capítulo II	38
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.	
Introdução	38
Materiais e Métodos	40
Resultados	45
Discussão	53
Conclusões	60
Referências	60
Capítulo III	71
Considerações Finais	71
Anexos	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Amostra de medula óssea após a centrifugação com gradiente de densidade; notar halo central delimitando a FCM (seta preta). (B) imagem microscópica da FCM sobre a câmara de Neubauer para contagem celular. ----- 43

Gráfico 1: *Scatterplot* do TLS x tempo entre T0 e T6. Verifica-se que, apesar da tendência ao aumento do TLS, o valor final encontra-se dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, sem diferença estatística significativa dos valores iniciais.----- 46

Gráfico 2: *Scatterplot* do TLS x tempo entre T0 e T16. Ao final das avaliações a tendência da curva foi de diminuição do TLS, mas o valor final encontra-se dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, sem diferença estatística significativa dos valores iniciais. ----- 46

Gráfico 3: *Scatterplot* da avaliação clínica x tempo. Verifica-se uma média entre os valores iniciais e finais dentro do intervalo de confiança de 95%, não havendo diferença estatística significativa entre os dois momentos. ----- 47

Gráfico 4: *Scatterplot* entre lissamina verde x tempo. Verifica-se o valor final menor que o inicial, e este fora do intervalo de confiança de 95%, demonstrando que a alteração é estatisticamente significativa.. ----- 47

Gráfico 5: *Scatterplot* do tempo de ruptura do filme lacrimal x tempo. O valor final é maior do que os valores iniciais, cuja variação é estatisticamente significativa. ----- 48

Figura 2: Ilustração fotográfica dos olhos de cães com CCS submetidos à aplicação da FCM da MO. (A), (B) e (C) animal nº9 antes do tratamento, com 8 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento respectivamente. (D), (E) e (F) animal nº10 antes do tratamento, com 8 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento, respectivamente. (G), (H) e (I) animal nº1 antes do tratamento, com 6

semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento, respectivamente. (J), (K) e (L) animal nº13 antes do tratamento, com 5 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento, respectivamente. (M) animal com impregnação 0 de lissamina verde. (N) animal com impregnação +++ de lissamina verde. (O) animal após coleta da conjuntiva bulbar (seta). ----- 50

Figura 3: Ilustração fotográfica dos cortes histológicos da conjuntiva bulbar de cães, elucidando os graus de inflamação (1-5). (A): grau 1, com raros plasmócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta azul) no estroma da conjuntiva bulbar. (B): grau 2, com discreto infiltrado de plasmócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta azul) no estroma da conjuntiva bulbar. (C): grau 3, com infiltrado de plasmócitos moderado (seta vermelha) e linfócitos (seta azul) expandindo para o estroma da conjuntiva bulbar. (D): grau 4, com infiltrado composto por grande quantidade de plasmócitos (seta vermelha), linfócitos (seta azul) e raros neutrófilos invadindo o epitélio (seta verde) da conjuntiva bulbar. (E): grau 5, apresentando completa substituição e expansão do estroma por grande quantidade de plasmócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta azul), com alguns neutrófilos permeando o epitélio (seta verde) da conjuntiva bulbar, HE 200x. (F) inúmeras células caliciformes (seta laranja) compondo o epitélio da conjuntiva bulbar, PAS 100x. ----- 51

Figura 4: Ilustração fotográfica dos cortes histológicos da conjuntiva bulbar de cães. (A) Animal nº10, com inflamação grau 5 antes do tratamento. (B) Animal nº 10 com inflamação grau 3 na 16ª semana do tratamento, HE 200x. (C) Animal nº13 com inflamação grau 3 antes do tratamento. (D) Animal nº13 com inflamação grau 2 na 16ª semana do tratamento, HE 200x. (E) Animal nº8 apresentando densidade de células caliciformes de 0,3 células/campo antes do tratamento. (F) Animal nº8 apresentando densidade de células caliciformes de 25,2 células/campo, 16 semanas após o tratamento, PAS 400x. (G) Animal nº10 apresentando densidade de células caliciformes de 0,22 células/campo antes do tratamento. (H) Animal nº10 apresentando densidade de células caliciformes de 8,7 células/campo, 16 semanas após o tratamento, PAS 400x. -----52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS - ceratoconjuntivite seca

CT - células-tronco

CTH - células-tronco hematopoiéticas

CTM - células-tronco mesenquimais

FCM - fração de células mononucleares

FAV - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

FL – filme lacrimal

mL- mililitro

mm- milímetro

MO - medula óssea

MPA - medicação pré-anestésica

SRD - sem raça definida

UnB - Universidade de Brasília

TLS - Teste Lacrimal de Schirmer

TDP –Transposição de ducto parotídeo

TGSM - Transplante de glândulas salivares menores

Fig. - Figura

RESUMO

A ceratoconjuntivite seca em cães é uma afecção frequente na rotina clínica. Embora se verifiquem resultados satisfatórios no emprego de imunomoduladores, alguns pacientes não respondem positivamente ao uso desses fármacos, e a terapia celular pode se tornar uma alternativa ao tratamento convencional. Objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de fração autógena de células mononucleares (FCM) da medula óssea na região periglandular da terceira pálpebra, sobre a superfície ocular de cães com CCS. Foram selecionados 15 pacientes (25 olhos acometidos) provenientes do Serviço de Oftalmologia Veterinária da FAV/UnB, sendo nove machos e seis fêmeas, de dez raças distintas. Para inclusão neste estudo, os indivíduos apresentaram valores inferiores à 10mm/min ao teste lacrimal de Schirmer (TLS). Eles foram submetidos ao TLS, à tonometria de aplanção, à biomicroscopia com lâmpada em fenda, ao tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), ao teste da lissamina verde e ao teste da fluoresceína, semanalmente, durante 16 semanas consecutivas. Realizou-se, neste mesmo período, avaliação quanto à hiperemia e à secreção ocular, à quemose e à transparência corneal. A medula óssea foi coletada mediante punção pelo esterno, a FCM foi isolada por centrifugação e o *pellet* contendo a FCM foi aplicado na região periglandular da terceira pálpebra no dia inicial do estudo. Realizou-se biopsia da conjuntiva bulbar temporal superior para avaliação do grau de inflamação e quantificação das células calciformes no dia da aplicação da FCM e 16 semanas após a mesma. Os resultados obtidos foram avaliados empregando-se teste *t-Student* e descritos em um gráfico de pontos acompanhado de regressão linear. Verificou-se aumento dos valores do TLS até a sexta semana após o tratamento, seguindo-se diminuição do TLS, mas nos dois momentos não ocorreu diferença estatisticamente significativa dos valores iniciais. Quadro semelhante foi observado com a avaliação dos parâmetros clínicos. Entretanto, o TRFL aumentou ao término das avaliações, bem como a impregnação por lissamina verde foi menor do que a verificada previamente ao tratamento. A inflamação conjuntival foi classificada como inferior, estável e superior aos valores iniciais em 30%, 40% e 30% dos olhos, respectivamente. A média no número de células calciformes aumentou de 78,3 células/campo para 161

células/campo, verificando-se melhora em 50% dos olhos avaliados, estabilidade em 20% e piora em 30%. Diante das condições experimentais descritas, conclui-se que o uso da fração de células mononucleares da medula óssea aumentou a quantidade de células calciformes conjuntivais, além de melhorar parâmetros de avaliação da superfície ocular. Desta forma tornando-se uma opção promissora para o tratamento da CCS canina, conferindo melhora à superfície ocular dos pacientes acometidos pela ceratoconjuntivite seca. O efeito de plasticidade celular e a ação anti-inflamatória da FCM sobre a glândula da terceira pálpebra merecem maiores investigações.

Palavras-chave: cão, ceratoconjuntivite seca, superfície ocular, células-tronco, células mesenquimais.

ABSTRACT

The keratoconjunctivitis sicca in dogs is a common condition in clinical practice. While there are satisfactory results in the use of immunomodulators, some patients do not respond positively to these drugs, and cell therapy may become an alternative to conventional treatment. This study aimed to evaluate the effects of the application of autologous mononuclear cell fraction (MCF) bone marrow periglandular in the region of the third eyelid, on the ocular surface of dogs with CCS. We selected 15 patients (25 affected eyes) from the Department of Veterinary Ophthalmology FAV/UNB, nine males and six females, ten distinct breed. For inclusion in this study, subjects had values below the 10mm/min the Schirmer tear test (STT). They were submitted to TLS, the applanation tonometry, slit lamp examination with the slit lamp, the breakup time of the tear film (BUT), the test of lissamine green and fluorescein test weekly for 16 consecutive weeks. Took place in the same period, evaluation as to hyperemia and ocular discharge, the chemosis and corneal transparency. Bone marrow was collected by puncture of the sternum, MCF was isolated by centrifugation and the pellet containing the MCF was applied in the region of the third eyelid periglandular the initial day of the study. Held biopsy superior temporal bulbar conjunctiva for assessing the degree of inflammation and quantification of goblet cells on the day of application of MCF and 16 weeks thereafter. The results were analyzed employing Student's t test and described in a scatterplot accompanied by linear regression. An increase in the values of the TLS until six weeks after treatment, followed by reduction of the TLS, but the two moments not statistically significant difference from baseline. A similar picture was observed with assessment of clinical parameters. However, BUT increased at the end of the evaluations, as well as lissamine green impregnation was lower than that determined prior to treatment. The conjunctival inflammation was ranked lower, stable and superior to the initial values by 30%, 40% and 30% of eyes, respectively. The mean number of goblet cells increased from 78.3 cells / field to 161 cells / field, verifying an improvement in 50% of eyes evaluated, stability in 20% and worsened in 30%. Given the experimental conditions described, it is concluded that the use of the fraction of bone marrow mononuclear cells increased the amount of conjunctival goblet cells, and improve

evaluation parameters of the ocular surface. Thus making it a promising option for the treatment of canine CCS, giving improves the ocular surface of patients suffering from keratoconjunctivitis sicca. The effect of cellular plasticity and anti-inflammatory action of MCF on the gland of the third eyelid deserve further investigation.

Keywords: dog, keratoconjunctivitis sicca, ocular surface, stem cells, mesenchymal cells.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) tornaram-se alternativa terapêutica no tratamento de inúmeras doenças, mormente as de caráter degenerativo e imunomodulado, nos mais diversos órgãos. Acredita-se que células lesionadas possam ser substituídas por tecido saudável desenvolvido a partir de uma única célula mononuclear, melhorando significativamente prognósticos antes considerados desfavoráveis.

As CT possuem capacidade de proliferação indefinida, auto-renovação, produção de diferentes linhagens celulares e regeneração de tecidos. No cão, elas estão presentes principalmente no sangue do cordão umbilical e na medula óssea. A literatura evidencia a capacidade destas células em auxiliar no processo de cicatrização óssea após fraturas e no reparo de cardiomiócitos após lesões no miocárdio, repercutindo na melhoria da função contrátil e ejetora deste órgão. Em oftalmologia, elas têm sido empregadas para reparação corneal em ceratites ulcerativas e na busca pela formação de novos fotorreceptores da retina.

A ceratoconjuntivite seca (CCS), doença, às vezes, imunomediada de evolução crônica e sem cura estabelecida, suscita grande repercussão sobre a superfície ocular, resultando, em alguns casos, em perda da visão. A CCS, cuja principal causa é a reação inflamatória imunomediada associada à atrofia glandular, caracteriza-se, em cães, pela diminuição quantitativa da produção lacrimal.

O tratamento de eleição é o uso de imunomoduladores e de lacrimoestimulantes. No entanto, seu uso não repercute em cura, devido ao caráter imunomediado da doença. Além disto, a despeito dos bons resultados clínicos obtidos na maioria dos pacientes, alguns respondem de forma insatisfatória à terapêutica.

As células-tronco apresentam potencial imunomodulador que, associado à sua capacidade de plastia celular, podem se tornar importantes ferramentas no restabelecimento da função glandular, mormente nos casos mais severos e não responsivos aos tratamentos disponíveis. Em indivíduos acometidos verifica-se

fibrose e atrofia glandulares secundárias à inflamação na glândula da terceira pálpebra e na glândula lacrimal orbitária. Neste cenário, a terapia celular instiga investigações que visem ao tratamento e à cura da CCS.

REFERENCIAL TEÓRICO

A superfície ocular é composta pela córnea, conjuntiva, esclera e pelo filme lacrimal (FL). Cabe ao perfeito funcionamento destas estruturas a manutenção da transparência ocular (ROLANDO & ZIERHUT, 2001).

O filme lacrimal fornece o meio para a transferência de oxigênio atmosférico, glicose, eletrólitos, células inflamatórias, imunoglobulinas e água para a córnea, bem como remove seus metabólitos e material estranho do saco conjuntival. O FL também lubrifica a movimentação das pálpebras e da terceira pálpebra sobre a córnea, e fornece substâncias antibacterianas como imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas, atuando como uma barreira adaptada para a defesa contra agentes externos. Forma, ainda, uma superfície lisa à córnea, para ótima eficiência óptica (GUM et al., 1999; SLATTER, 2005; GIULIANO e MOORE, 2007; ROYLE et al., 2008).

Tradicionalmente descrito como um leito trilaminar, o FL é composto por uma fração aquosa, uma lipídica e outra mucosa (OFRI et al., 2007). A camada lipídica ou externa é proveniente das glândulas tarsais e de Zeis. Tem a função de limitar a evaporação da camada aquosa e de promover tensão superficial, a qual evita o extravasamento da lágrima (WARD & HENDRIX, 2003; SLATTER, 2005).

A camada intermediária, também denominada leito aquoso, é a camada mais espessa, medindo 7 μ m. Além de água, ela apresenta, em sua composição, eletrólitos, proteínas, fatores de crescimento, vitaminas, antimicrobianos, citocinas e imunoglobulinas (RIBEIRO et al., 2008). Esta porção do FL remove sujidades, lubrifica a superfície ocular e fornece nutrientes para a córnea (GRAHN & STOREY, 2004, SLATTER, 2005; RIBEIRO et al., 2008).

Em cães, a porção aquosa do FL é produzida pela glândula lacrimal orbitária, pela glândula da terceira pálpebra e pelas glândulas acessórias (GELATT et al.,

1975). Os percentuais produzidos por cada uma destas glândulas variam entre 23% – 70%; 29% – 60% e 3,1% respectivamente, (HELPER et al., 1974; GELATT et al., 1975; SAITO et al., 2001; WARD & HENDRIX, 2003; GRAHN & STOREY, 2004).

A camada mais interna, também denominada de camada mucóide interna, é constituída por glicoproteínas hidratadas derivadas das células caliciformes conjuntivais, as quais, no cão, apresentam maior densidade no *fórnix* conjuntival (MOORE et al., 1987). Acredita-se que as moléculas de mucoproteínas presentes nesta camada compensem as características hidrofílicas e lipofóbicas do filme lacrimal, permitindo a aderência do filme lacrimal ao epitélio corneal. A camada de mucina também preenche irregularidades da superfície da córnea, tornando-a opticamente lisa (WARD & HENDRIX, 2003; GRAHN & STOREY, 2004; SLATTER, 2005).

Anormalidades qualitativas, como a diminuição da produção de mucina, bem como anormalidades quantitativas, exemplificada pela diminuição da produção da porção aquosa do filme lacrimal, comprometem a função do filme lacrimal, desencadeando inflamação e infecções. Decorrentes da hipertonicidade e da desidratação do epitélio da córnea e da conjuntiva, de hipóxia do epitélio corneal, da lubrificação inadequada e do acúmulo de metabólitos tóxicos sobre a superfície ocular (GRAHN & STOREY, 2004; GIULIANO & MOORE, 2007).

A terceira pálpebra, também conhecida como membrana nictitante, é uma estrutura de proteção móvel, localizada na porção nasal do saco conjuntival inferior, entre a córnea e a pálpebra inferior. Faz parte de sua anatomia tecido conjuntivo em suas superfícies bulbar e palpebral, e tecido linfoide. Possui cartilagem hialina, em forma de “T”, a qual confere suporte para a movimentação da terceira pálpebra, e a glândula da terceira pálpebra, que secreta parte da fração aquosa do filme lacrimal (MOORE & CONSTANTINESCU, 1997; GELATT & GELATT, 2001; SLATTER, 2005; ALEXANDRE-PIRES et al., 2008; PETZNICK et al., 2012).

Histologicamente, a glândula da terceira pálpebra caracteriza-se por tecido conjuntivo e tecido epitelial glandular constituído de dutos, unidades tubuloacinares e ácinos disposto em torno dos segmentos tubulares (CABRAL et al., 2005).

A remoção da glândula da terceira pálpebra induz à repercussão negativa para a superfície ocular. Verifica-se diminuição da produção lacrimal e do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), aumento no pH da lágrima, além de alterações

como esfoliação celular, diminuição do número de células epiteliais vivas, desprendimento de hemidesmossomos da membrana basal e desprendimento das células epiteliais da camada superficial da córnea (HELPER et al., 1974; SAITO et al., 2001; SAITO et al., 2004)

Na terceira pálpebra podem ocorrer doenças como a eversão da cartilagem e a protrusão da glândula (SLATTER, 2005; PEIXOTO & GALERA, 2012), além de neoplasias (SLATTER, 2005; PEIXOTO et al., 2011). Qualquer doença que resulte em processo inflamatório e dano estrutural pode ocasionar perda de suas funções, desencadeando anormalidades quantitativas ou qualitativas no filme lacrimal (SLATTER, 2005).

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou “olho seco” é uma doença comum na rotina clínica, sendo sua prevalência variável em cães, cujos relatos oscilam entre 1% (GUILIANO & MOORE, 2007), 5,5% (BARROS et al., 1992), 11 a 14,7% (ANDRADE & LAUS, 1997), chegando a índices tão elevados quanto 35% (KASWAN et al., 1998). Geralmente acomete indivíduos com idade acima de seis anos (BARROS et al., 1992; SANCHEZ et al., 2007; FONSECA, 2011).

As raças Cocker Spaniel Inglês, Poodle, Lhasa Apso, Yorkshire Terrier, Cavalier King Charles Spaniel, West Highland White Terrier, Shih-tzu, Bulldog Inglês e mestiços (SRD) são consideradas predispostas (HELPER et al., 1976; MORGAN & ABRAMS, 1991; BARROS et al., 1992; HERRERA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007; FONSECA, 2011).

Há divergências quanto à influência hormonal na CCS canina. Alguns autores referem que alterações hormonais decorrentes da diminuição de testosterona estão associadas com a inflamação glandular e consequente diminuição da produção lacrimal, sendo as fêmeas as mais suscetíveis (KASWAN & SALISBURY, 1990; BARROS et al., 1992). Trabalhos recentes, entretanto, divergem da afirmativa (SANCHEZ et al., 2007; FONSECA, 2011).

Dentre as causas descritas para a CCS citam-se a hipoplasia congênita ou perda da inervação parassimpática da glândula lacrimal orbitária ou da terceira pálpebra (HERRERA et al., 2007; WESTERMEYER et al., 2009), blefaroconjuntivite crônica, uso local de sulfonamidas e atropina, doenças metabólicas, cinomose (BRITO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; MARTINS et al., 2009), leishmaniose (NARANJO et al., 2005), agentes anestésicos (MARGADANT et al., 2003), o uso por

via oral de etodolac (KLAUSS et al., 2007), e endocrinopatias, a exemplo do diabetes mellitus (CULLEN et al., 2005; WILLIAMS et al., 2007). A doença também pode ter causa iatrogênica, ou ser secundária à excisão da glândula da terceira pálpebra protruída (SAITO et al., 2001; ALMEIDA et al., 2004; BERDOULAY et al., 2005, GALERA et al., 2010). Contudo, em muitos casos a causa permanece não estabelecida (KASWAN & SALISBURY, 1990), assumindo-se ser decorrente de processo inflamatório imunomediado (MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991; BARROS et al., 1992).

Verifica-se resposta clínica ao tratamento com imunomoduladores (MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991; SANSOM et al., 1995; WILLIAMS et al., 2007), bem como observaram-se infiltrados inflamatórios multifocais de células mononucleares, com graus variáveis de fibrose e grandes áreas de ácinos não funcionais na glândula da terceira pálpebra de cães com CCS (KASWAN et al., 1984).

A CCS em cães tem sido comparada à síndrome de Sjogren's em humanos, por alguns autores. Trata-se, a segunda de doença sistêmica imunomediada caracterizada por CCS, xerostomia e linfadenite plasmocítica, também descrita em cães (SNYDER, 2003). Segundo Smith (2005), existe um mecanismo fisiológico de imunohomeostase regulado por andrógenos entre as proteínas das células epiteliais glandulares e os linfócitos T. Por motivo desconhecido, poderia ocorrer a diminuição desses andrógenos, alterando a homeostasia.

Em cães hípidos, a regulação funcional da glândula lacrimal é dependente do balanço entre as células T-supressoras e células *T-helper*, estando as primeiras em maior quantidade. Porém, nos cães com CCS imunomediada, as células *T-helper* tornam-se os linfócitos prevalentes. Segue-se desregulação no mecanismo de defesa glandular, e linfócitos prevalentes passam a atacar células da glândula lacrimal orbitária e da glândula da terceira pálpebra, desencadeando inflamação e diminuição da produção lacrimal (GAO et al., 1998).

Sugerem-se quatro mecanismos responsáveis pela diminuição da secreção lacrimal e pela inflamação. Acredita-se que linfócitos estejam associados com a citotoxicidade no tecido glandular; que ocorra apoptose severa em células epiteliais glandulares; que citocinas liberadas causem diminuição da produção lacrimal e, ainda, que células inflamatórias associadas a citocinas, ou a auto-anticorpos,

possam influenciar neurotransmissores na glândula lacrimal, inibindo a estimulação neurológica da produção lacrimal. Tratam-se de mecanismos que poderiam atuar de forma isolada ou em conjunto (WILLIAMS, 2008).

Cães com CCS podem apresentar sinais clínicos variados, sendo o principal, e mais marcante, a secreção seromucosa a mucopurulenta, prevalente em até 70% dos casos (SANCHEZ et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009). O acúmulo de secreção nas margens palpebrais culmina em blefarite e em dermatite, além de fornecer meio de cultura para microrganismos (KASWAN & SALISBURY, 1990).

A conjuntivite é caracterizada pela quemose, hiperemia e hipertrofia das conjuntivas bulbar, palpebral e da terceira pálpebra (KASWAN & SALISBURY, 1990). A CCS repercute negativamente sobre a córnea. Decorrem neovascularização e edema corneais, pigmentação, fibrose e ceratites ulcerativas (WILKIE, 1993; SANSOM et al., 1995; MOORE, 1999; KUNERT et al., 2002; SANCHEZ et al., 2007).

Em manifestações mais severas, verificam-se redução da acuidade visual e cegueira decorrente de opacidade corneana, da melanose ou à perfuração da córnea em úlceras complicadas (KASWAN & SALISBURY, 1990; BERDOULAY et al., 2005; SANCHEZ et al., 2007).

Embora a deficiência em qualquer um dos três constituintes lacrimais possa desencadear a CCS, apenas os dois leitões mais internos (mucoso e aquoso) são submetidos à avaliação rotineira (OFRI et al., 2007). Atribui-se, na maioria dos casos de CCS canina, alterações quantitativas do FL (GRAHN & STOREY, 2004; RIBEIRO et al., 2008; WILLIAMS, 2008; OFRI et al., 2009). A CCS qualitativa em cães hoje é melhor avaliada, diante da melhoria dos equipamentos e exames, bem como maior acurácia no diagnóstico (OFRI et al., 2007; BENZ et al., 2008).

A CCS quantitativa em cães é diagnosticada empregando-se teste lacrimal de Schirmer (TLS). A avaliação é feita com o auxílio de uma fita de papel poroso milimetrada colocada no saco conjuntival inferior, durante um minuto (KASWAN & SALISBURY, 1990; SLATTER, 2005; SERRUYA et al., 2009). A produção lacrimal normal de um cão varia entre 15 – 25 mm/min (SAITO et al., 2001; HARTLEY et al., 2006). Valores abaixo de 15 mm/min associados a sinais clínicos da CCS são considerados sugestivos, sendo mais evidentes quando os resultados são inferiores a 10 mm/min (KASWAN & SALISBURY, 1990; WILLIAMS, 2008).

A deficiência de mucina pode ser identificada ao teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), mediante o qual se avalia a estabilidade do FL sobre a superfície ocular (GIULIANO & MOORE, 2007; RORIG, 2009). Instila-se uma gota de fluoresceína no olho mantendo-se as pálpebras abertas manualmente. Registra-se o tempo a partir do último piscar, até o aparecimento do primeiro *spot* enegrecido, que surge como uma área escura no filme corado pela fluoresceína (MOORE et al., 1987). Considera-se que cães normais apresentam valores acima de 20 segundos para o TRFL, sendo que um tempo inferior a 15 segundos pode representar baixa qualidade do FL (HERRERA, 2008). Valores inferiores a 20 segundos podem ser sugestivos de CCS, quando associados a sinais clínicos da doença (BARABINO et al., 2004). A deficiência de mucina pode levar à ruptura do FL em tempos inferiores a 5 segundos (GELLAT, 2003; HERRERA, 2008).

Para avaliação da densidade das células caliciformes, deve-se realizar a biopsia ou a citologia conjuntival (MOORE et al., 2001, BOLZAN et al., 2005).

Preconizam-se entre muitas substâncias, o uso de lacrimoestimulantes para o tratamento da CCS canina (KASWAN & SALISBURY, 1990; RIBEIRO et al., 2008). A primeira medicação utilizada na oftalmologia veterinária, com grande impacto sobre a afecção foi a ciclosporina A (CsA) (MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991).

A CsA é um undecapeptídeo isolado a partir da cultura do fungo *Tolyocladium inflatum gams* (GILGER & ALLEN, 1998). A CsA age de forma seletiva na supressão das células *T-helper* via inibição da calcineurina. A sua eficácia no controle da CCS é demonstrada em inúmeros trabalhos, apresentando resultados positivos nas concentrações de 0,2%; 1% e 2% (KASWAN & SALISBURY, 1990; MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991; GRAHN & STOREY, 2004). Cães com TLS acima de 2 mm/min e submetidos à aplicação de CsA apresentam melhora na produção lacrimal aquosa em mais de 75% dos casos. Entretanto, quando a produção lacrimal encontra-se em valores iguais ou abaixo de 2mm/min, o sucesso da terapia pode ser inferior a 60% (MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991; WILLIAMS, 2008).

Izci et al. (2002) avaliaram a glândula da terceira pálpebra de cães com CCS, histologicamente, após 30 dias de tratamento com CsA 2%, verificando diminuição na quantidade de linfócitos e do processo inflamatório desta estrutura.

De emprego mais recente, o tacrolimus é um macrolídeo isolado do *Streptomyces tsukubaensis*. Seu mecanismo de ação assemelha-se ao da CsA; no entanto, *in vitro*, ele se mostrou de dez a 100 vezes mais potente que a CsA. Berdoulay et al. (2005) utilizaram tacrolimus na concentração de 0,02% para o tratamento de CCS e comprovaram a eficácia deste medicamento em 83% dos pacientes, nos casos onde o tacrolimus foi utilizado como a primeira medicação. Nos casos não responsivos ao tratamento com CsA, o tacrolimus apresentou melhora em 51% deles.

O pimecrolimus, substância produzida pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus*, um agente com capacidade anti-inflamatória que age seletivamente em mastócitos e em linfócitos T, inibindo a formação de citocinas inflamatórias, com resultados superiores ao da CsA no tratamento da CCS canina (OFRI et al., 2009). Atribuem-se aos resultados positivos a alta potência intrínseca do fármaco e a sua maior penetração nos tecidos, decorrentes de seu baixo peso molecular (NELL et al., 2005). Formulações contendo 1% de pimecrolimus oferecem resultados satisfatórios, quanto ao aumento da produção lacrimal, e à redução da inflamação, suscitando melhora em casos não responsivos à CsA (NELL et al., 2005). Na concentração de 0,5%, o pimecrolimus alterou a produção lacrimal de cães portadores de CCS, cuja média inicial era de $3,31 \pm 4,82$ mm/min, para $16,28 \pm 7,14$ mm/min (RORIG, 2009).

Além de lacrimoestimulantes, outras medicações podem ser utilizadas como adjuvantes no tratamento da CCS, a exemplo dos lacrimomiméticos, dos antibióticos e dos anti-inflamatórios (SLATTER, 2005). Popularmente conhecidos como “lágrima artificial”, os lacrimomiméticos ajudam a manter a umidade da superfície ocular. Tem-se as formulações à base de polímeros lineares como o dextran e a polivinilpirrolidona e as substâncias viscoelásticas como o hialuronato de sódio, sulfato de condroitina e metilcelulose (GRAHN & STOREY, 2004; RIBEIRO et al., 2008).

Os anti-inflamatórios podem ser utilizados no controle da inflamação de forma mais rápida que os imunomoduladores, controlando a hiperemia, a quemose, o desconforto e o blefarospasmo (MOORE, 1999; SLATTER, 2005; RIBEIRO et al., 2008). Antibióticos são utilizados para combater infecções presentes ou

profilaticamente, haja vista que a flora bacteriana de cães com CCS se altera (SALISBURY et al., 1995).

A utilização de pilocarpina, um fármaco parassimpatomimético, encontra indicação em casos de CCS neurogênica, atuando de forma não específica sobre o sistema nervoso parassimpático, sendo administrada por via oral (MATHEIS et al., 2012).

Casos não responsivos ao tratamento clínico podem se beneficiar de opções cirúrgicas. A transposição do ducto parotídeo (TDP) foi pela primeira vez descrita em veterinária no ano de 1966 (LAVINGETTE, 1966). Com o advento da ciclosporina e do tacrolimus, a sua utilização diminuiu drasticamente. A técnica, recentemente reavaliada por Rhodes et al. (2012) em estudo retrospectivo de 92 olhos não responsivos ao tratamento com lacrimoestimulantes e submetidos à TDP, mostrou êxito em 92% dos casos.

O transplante de glândulas salivares menores (TGSM), primeiramente descrito em humanos (SOARES & FRANÇA, 2005), foi reproduzido em cães. Angélico et al. (2011) realizaram a cirurgia em 16 cães da raça Cocker Spaniel com quadro severo de CCS e não responsivos ao tratamento clínico. Houve melhora significativa no TLS em 56% dos pacientes, aos 60 dias da cirurgia.

A literatura reporta, ainda, a tarsorrafia parcial e o uso de *plugs* na obstrução das punctas lacrimais (WILLIAMS, 2002; GUILIANO & MOORE, 2007; SILVEIRO et al., 2010).

A despeito das diversas terapias propostas, ainda não se tem um tratamento curativo. Apesar dos avanços decorrentes do advento dos imunomoduladores, o tratamento da CCS deve ser realizado diariamente e por toda a vida do paciente, e se depara, não raro, com casos não responsivos (MORGAN & ABRANS, 1991; BERDOULAY et al., 2005; NELL et al., 2005).

A terapia celular é uma nova opção de tratamento, empregando células precursoras capazes de se diferenciar em vários tecidos e de substituir células lesionadas, por células funcionais (KLÖRBLING et al., 2003; CASTANHEIRA et al., 2008). Os estudos com esta nova terapia abordam órgãos diversos (ANDERSON et al., 2005; BRUNELLI et al., 2007; ZAMPROGNO, 2007; OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009).

A célula-tronco (CT) possui capacidade de proliferação indefinida, auto-renovação, produção de diferentes linhagens celulares e de regeneração de tecidos (OLIVEIRA, 2008). No cão, elas estão presentes, principalmente, no sangue do cordão umbilical e na medula óssea (NAKAGE & SANTANA, 2006).

A medula óssea (MO) autógena é a principal fonte para obtenção de células-tronco. É de fácil acesso e não implica em controvérsias, quanto a questões de ordem éticas, quando comparada com células-tronco embrionárias (GUARITA-SOUZA et al., 2005; OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009; FONSECA, 2011).

As células da medula óssea são classificadas em células mononucleares (indiferenciadas) e em multinucleares (KÖRBLING et al., 2003; ROMANOV et al., 2003). As mononucleares podem ser de linhagem hematopoética (CTH), que originarão células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e as de origem mesenquimal (CTM), precursoras de miócitos, de hepatócitos, de osteócito, de tecido adiposo, de condrócitos e de estroma. A não diferenciação destes dois tipos celulares é denominada fração de células mononucleares (FCM) (GUARITA-SOUZA et al., 2005).

O sistema hematopoético é uma rede integrada de células que inicia o ciclo contínuo de diferenciação a partir de uma pequena população de CTH. São células pluripotentes, que originam todas as células heterogêneas funcionais do sangue e do sistema imune. No entanto, a plasticidade das células-tronco hematopoéticas faz com que elas se diferenciem em células não hematopoéticas, incluindo células do fígado, do sistema nervoso central, dos rins, do pâncreas, dos pulmões, da pele, do trato gastrointestinal, do coração e do músculo esquelético (NAKAGE & SANTANA, 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTM) fornecem alta capacidade de regeneração e habilidade em se diferenciarem em linhagens celulares de origem mesenquimal (LIMA et al., 2012). Elas são encontradas em uma variedade de tecidos, principalmente, na medula óssea de indivíduos adultos (TORQUETTI et al., 2007). Estas células podem ser aspiradas diretamente da crista ilíaca (GUARITA-SOUZA et al., 2005), do úmero (LIMA et al., 2012), do fêmur e da tíbia (CASTANHEIRA et al., 2008). São facilmente isoladas, expandidas em cultura e estimuladas para se diferenciar em osteoblastos (LIMA et al., 2012), em condrócitos

(JOHNSTONE et al, 1998), em miócitos (SAMPAOLESI et al., 2005), em cardiomiócitos (GUARITA-SOUZA et al., 2005) e em hepatócitos (LEE et al., 2004).

O transplante de CTH para o tratamento de doenças hematológicas é amplamente difundido na Medicina (SILVA & MACEDO, 2006). Entretanto, o uso de células provenientes da medula óssea na terapia celular ainda encontra várias incógnitas. Uma delas é que, até o momento, não se sabe ao certo qual fração celular apresenta maior plasticidade, já que não se encontra diferença entre a utilização da FCM ou o uso isolado da CTM (GUARITA-SOUZA et al., 2005). Desta forma, em muitos trabalhos sugere-se a utilização da FCM ao invés de um tipo específicos de células-tronco (VILAS-BOAS et al., 2004; OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009).

A fração de células mononucleares é obtida após processo de isolamento mais simples que o requerido para aquisição das células-tronco mesenquimais, pois necessita apenas passar por centrifugação no gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (BOYUM, 1968), ao passo que as células mesenquimais são submetidas ainda, à cultura e expansão celular durante 14 a 16 dias. Este processo implica em maior custo e risco de contaminação (SILVA et al., 2009; MÜLLER, 2010; LIMA et al., 2012).

Para a coleta das células-tronco da medula óssea utiliza-se a via intraóssea. Em cães, a medula óssea pode ser obtida na epífise dos ossos longos (fêmur, úmero e tíbia), no esterno, e nas regiões do íleo, como crista ilíaca ou borda acetabular utilizando-se agulhas como a Silverman, Jamshidi, Osgood, Steiss, Rosenthal. Entretanto, nada impede que se utilizem agulhas hipodérmicas de calibre 40x12mm ou de 40x16mm (CASTANIA & VOLPON, 2007; MÜLLER et al., 2009; FONSECA, 2011).

A partir da medula óssea pode-se obter a fração de células mononucleares fazendo-se uso da centrifugação (VILAS-BOAS et al., 2004; DOHMANN et al., 2005). O protocolo mais utilizado é o descrito por Boyum (1968) (GUARITA-SOUZA et al., 2005; OLSSON et al., 2009; MÜLLER, 2010). Para a utilização terapêutica da FCM recomenda-se a obtenção de um mínimo de 2×10^6 células mononucleares (TOGNOLI, 2008; FONSECA, 2011).

Outro ponto a ser considerado na terapia celular é a via de administração. Admite-se que a intravenosa e a intralesional sejam as mais vantajosas. A via

intravenosa é de fácil execução e envolve menos riscos aos pacientes, porém suas principais desvantagens são o efeito de primeira passagem trans-pulmonar e a necessidade de várias passagens circulatórias até que as células entrem em contato com a área lesionada; isto reduz a quantidade celular no tecido alvo implicando, portanto, em menor resposta clínica (STRAUER & KORNOWSKI, 2003; VAQUERO et al., 2006). A via intralesional tem sido muito empregada na terapia celular em diversos órgãos e em estruturas, na administração de fração de células mononucleares e de células-tronco mesenquimais (VILAS-BOAS et al., 2004; GUARITA-SOUZA et al., 2005; CASTANHEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2009; MÜLLER, 2010; FONSECA, 2011).

Com relação às células-tronco na oftalmologia, Brunelli et al. (2007) utilizaram o auto transplante de limbo em cães, com bons resultados no restabelecimento da transparência corneal. Em outro estudo, a FCM extraída da medula óssea de cães foi aplicada por via subconjuntival em olhos com ceratite ulcerativa induzida por NaOH. Empregando-se nanocristais, comprovou-se a migração das CT para a córnea, mas, o seu papel na cicatrização não foi elucidado (TOGNOLI et al., 2009).

A injeção de intravítrea de células-tronco mesenquimais permitiu que as células migrassem e incorporassem na retina neural, notadamente nas camadas nucleares externa e interna e na de células ganglionares. Verificou-se, à imunoistoquímica, que a maioria das células injetadas expressou rodopsina (marcador para fotorreceptores), parvalbumina (marcador para células bipolares e amácrinas) e GFAP (marcador de células gliais) (CASTANHEIRA et al., 2008).

A fração de células mononucleares autógena extraída da medula óssea, foi injetada na região periglandular da terceira pálpebra de cães hípidos, a fim de se investigar segurança, quanto ao procedimento, bem como de se verificar a sua participação na produção lacrimal. O procedimento mostrou-se seguro e induziu o aumento significativo do TLS, comparativamente a um grupo controle, aos 60 dias da aplicação (FONSECA, 2011; FONSECA et al., 2011).

REFERENCIAS

- ANDRADE, A.L.; LAUS, J.L. Enfermidades da córnea de pequenos animais. *Clínica Veterinária.*, n.12, p.34-39, 1997.
- ALEXANDRE-PIRES, G.; ALGUERO, M.C.; MENDES-JORGE, L.; TRINDADE, H.; CORREIA, M.; ESPERANÇA, J.A.P. Immunophenotyping of lymphocyte subsets in the third eyelid tissue in dogs (*Canis familiaris*): morphological, microvascular and secretory aspects of this ocular adnexa. *Microscopy Research and Technology*, v.71, p.521-528, 2008.
- ALMEIDA, D.E.; MAMEDE, F.V.; ORTIZ, J.P.D.; LAUS, J.L. Iatrogenic keratoconjunctivitis sicca in a dog. *Ciência Rural.*, v.34, n.3, p.921-924, 2004.
- ALMEIDA, D.E.; ROVERATTI, C.; BRITO, F.L.C.; GODOY, G.S.; DUQUE, J.C.M.; BECHARA, G.H.; LAUS, J.L. Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology.*, v.12, n.4, p.211–215, 2009.
- ANDERSON, D.G.; RISBUD, M.V.; SHAPIRO, I.M.; VACCARO, A.R.; ALBERT, T.J. Cell-based therapy for disc repair. *The Spine Journal.*, v.5, p.297-303, 2005.
- ANGÉLICO, G.T.; RANZANI, J.J.T.; BRANDÃO, C.V.S.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R.; SERENO, M.G.; CREMONINI, D.N. Transplante de glândulas salivares menores no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.63, n.5, p.1087-1092, 2011.
- BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M.R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Experimental Eye Research.*,v.79, n.5, p.613-621, 2004.
- BARROS, P.S.M; SAFATLE, A.V.M; ALVARENGA, J.; STOPIGLIA, A.J. Aspectos clínicos da ceratoconjuntivite seca me cães: estudo retrospectivo de 223 casos. *ARS Veterinária*, v.8, n.1, p.6-14, 1992.
- BENZ, P.; TICHY, A.; NELL, B. Review of the measuring precision of the new Meibometer® MB550 through repeated measurements in dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, v.11, n.6, p.368–374, 2008.

- BERDOULAY, A.; ENGLISH, R.V.; NADELSTEIN, B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology.*, v.8, n.4, p.225-232, 2005.
- BOLZAN, A.A.; BRUNELLI, A.T.J.; CASTRO, M.B.; SOUZA, M.A.; SOUZA, J.L.; LAUS, J.L. Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, v.8, n.6, p.401-405, 2005.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scandinavian Journal and Laboratory Investigation*, v.97, p.77-89, 1968.
- BRITO, F.L.C.; SILVA JÚNIOR, V.A.; MAIA, F.C.L.; PEREIRA JUNIOR, J.R.; LAUS, J.L. 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 v.59, n.2, p.340-344, 2007.
- BRUNELLI, A.T.J.; VICENTE, F.A.M.; CHAHUD, F.; ORIÁ, A.P.; BOLZAN, A.A.; CAMPOS, C.F.; DORIA NETO, F.A.; LAUS, J.L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.59, n.5, p.1194-1204, 2007.
- CABRAL, P.V.; LAUS, J.L; DAGLI, M.L.Z.; PEREIRA, G.T.; TALIETI, I.C.; MOTEIRO, E.R.; MAMEDE, F.V. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands macroscopic and morphometric characteristics. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.391-397, 2005.
- CASTANIA, V.A.; VOLPON, J.B. Integração do enxerto ósseo corticoesponjoso homólogo, tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno: estudo em cães. *Revista Brasileira de Ortopedia.*, v.42, n.6, p.173-180, 2007.
- CASTANHEIRA, P.; TORQUETTI, L.; NEHEMY, M.B.; GOES, A.M. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.* v.71, n.5, p.644-650, 2008.
- CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; McCARVILLE, C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. *Veterinary Ophthalmology.*v.4, p.215-225, 2005.
- DOHMANN, H.F.R.; PERIN, E.C.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUZA, A.L.S.; SILVA, G.V.; ASSAD, J.A.R.; ROSSI, M.I.D.; MESQUITA, C.T.; DOHMANN,

H.J. Melhora sintomática e da capacidade de exercício após o transplante autólogo, transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sustentada até o sexto mês de evolução. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.*, v.84, n.5, 2005.

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, 2011, 83p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal).

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, 2011, Hilton Head., v. 14. p.606-622.

GALERA, P.D.; YASUNAGA, K.L.; PEIXOTO, R.V.R. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação.* v.8, n.25, p.456-459, 2010.

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 cyclosporine A therapy. *Cornea*, v.17, n.6, p.654-663, 1998.

GELATT, K.N.; PEIFFER, R.L.; ERICKSON, J.L.; GUM, G.G. Evaluation of tear formation in the dog using a modification of Schirmer tear test. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, v.166, n.4, p.368-370, 1975.

GELATT, K.N. & GELATT, J.P. Surgery of nasolacrimal apparatus and tear systems. In:_____. *Small animal ophthalmic surgery: practical techniques for the veterinarian.* Oxford: Butterworth & Heinemann, 2001. p.125-141.

GILGER, B.C.; ALLEN, J.B. Cyclosporin A in veterinary ophthalmology. *Veterinary Ophthalmology*, v.1, p.81-197, 1998.

GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology.* Oxford: Blackwell Publishing, 4ª ed., 2007. v.2, Cap.3, 633-661p.

GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. Lacrimomimetics and Lacrimostimulants. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.*, v.34, n.3, p.739-753, 2004.

- GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J.R.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Brazilian Journal Cardiovascular Surgery.*, v.20, n.3, p.270-278, 2005.
- GUM, G.G.; GELATT, K.N.; OFRI, R. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. ch.3, p.151-181.
- HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, v.9, n.1, p.53-57, 2006.
- HELPEER, L. C., MAGRANE, W.G., KOEHM, J.; JOHNSON, R. Surgical induction of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, v. 165, n.2, p.172–174, 1974.
- HELPER, L.C. Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Symposium Diseases of Unknown Etiology.*, v.81, p.624-628, 1976.
- HERRERA, H.D.; WEICHSLER, N.; GÓMEZ, J.R.; JALÓN, J.A.G. Severe, unilateral keratoconjunctivitis sicca in 16 juvenile Yorkshire Terriers. *Veterinary Ophthalmology.*, v.10, p.285-288, 2007.
- HERRERA, D. Afecções da Córnea. In: _____ *Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia* 1ª ed. São Paulo: MedVet, 2008, cap. 7, p. 117-122.
- IZCI, C.; CELIK, I.; ALKAN, F.; OGURTAN, Z.; CEYLAN, C.; SUR, E.; OSKAN, Y. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *American Journal of Veterinary Research.*, v.63, p.688-693, 2002.
- JOHNSTONE, B.; HERING, T.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M.; YOO, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.*, v.238, n.1, p.265 – 272, 1998.
- KASWAN, R.L.; MARTIN, C.L.; CHAPMAN, W.L. Keratoconjunctivitis sicca: Histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28

- canine cases. *American Journal of Veterinary Research.*, v.45, p.112-118, 1984.
- KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A. A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca treatment with ophthalmic cyclosporine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.*, v. 20, n. 3, 1990.
- KASWAN, R.; PAPPAS, C.J.R.; WALL, K.; HIRSH, S.G. Survey of canine tear deficiency in veterinary practice. *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, v.438, p.931 – 939, 1998.
- KLAUSS, G.; GIULIANO, E.A.; MOORE, G.P.; STUHR, C.M.; MARTIN, S.L.; TYLER, J.W.; FITZGERALD, K.E.; CRAWFORD, D.A. Keratoconjunctivitis sicca associated with administration of etodolac in dogs: 211 cases (1992-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association.*, v.230, n.4, p.541-547, 2007.
- KÖRBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplantation.*, v.32, p.23-24, 2003.
- KUNERT, K.S.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Archives of Ophthalmology.*, v.120, n.3, p.330-337, 2002.
- LAVINGETTE, A.N. Keratoconjunctivitis sicca in a dog treated by transposition of the parotid salivary duct. *Journal of the American Veterinary Medicine Association.*, v.148, p.778-786, 1966.
- LIMA, S.A.F; WODEWOTZKY, T.I.; LIMA-NETO, J.F.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; ALVARENGA, F.C.L. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, v.32, n.5, p.463 - 469, 2012.
- LEE, K.D.; KUO, T.K.; WHANG-PENG, J.; CHUNG, Y.F.; LIN, C.T.; CHOU, S.H.; CHEN, J.R.; CHEN, Y.P.; LEE, O.K. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.*, v.40, n.6, p.1275-1284, 2004.
- MARGADANT, D.L.; KIRKBY, K.; GELLAT, A.; GELLAT, K.N. Effect of topical tropicamide on tear production as measured by Schimer's tear test in normal dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology*, v.6, p.315-320, 2003.
- MARTINS, D.B.; LOPES, S.T.A.; FRANÇA, R.T. Cinomose Canina – Revisão de Literatura. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, n.2, p.68-76, 2009.

- MATHEIS, F.L.; WALSER-REINHARDT, L.; SPIESS, B.M. Canine neurogenic Keratoconjunctivitis sicca: 11 cases (2006–2010). *Veterinary Ophthalmology.*, v.15, n. 4, p.288-290, 2012.
- MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V.; MAJORS, L.J.; COLLIER, L.L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, v.28, p.1925-1932, 1987.
- MOORE, C. P.; CONSTATINESCU, G. M. Surgery of The Adnexa. *Surgical Management of ocular disease. In: Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Vol. 27 n. 5, p. 1011-1067, 1997.*
- MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3ª ed. 1999. 583-608p.*
- MOORE, C.P.; MCHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. Effect of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, v.42, n.3, p.653-659, 2001.
- MORGAN, R. V.; ABRAMS, K. L. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association.*, vol.199, n.8, p.1043-1046, 1991.
- MÜLLER, D.C.M.; PIPPI, N.L.; BASSOI, P.C.; OLSSON, D.C.; JUNIOR, E.B.S.; GUERRA, A.C.O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. *Ciência Rural.*, v.39, n.7, 2009.
- MÜLLER, D.C.M. **Correção de ruptura de ligamento cruzado em cães com implante de polipropileno associado à fração total de células mononucleares.** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2010. 120p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).
- NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoéticas em cães. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.36, n.1, P. 325-329, 2006.
- NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology.*, v.133, n.1, p. 37-47, 2005.
- NELL, B.; WALDE, I.; BILLICH, A.; VIT, P.; MEINGASSNER, J.G. The effect of pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in

- dogs: results from a exploratory study. *Veterinary Ophthalmology*, v. 8, n.1, p.39-46, 2005.
- OFRI, R.; ORGAD, K.; KASS, P.H; DIKSTEIN, S. Canine meibometry: establishing baseline values for meibomian gland secretion in dogs. *Veterinary Journal.*, v. 174, n.3, p.536-540, 2007.
- OFRI, R.; LAMBROU, G.N.; ALLGOEWER, I.; GRAENITZ, U.; PENA, T.M.; SPIESS, B.M.; LATOUR, E. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: A comparison with cyclosporine A. *The Veterinary Journal.*, v.179, p.70–77, 2009.
- OLIVEIRA, G.K. **Células – tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão.** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- OLIVERO, D.K; DAVIDSON, M.G.; ENGLISH, R.V.; NASISSE, M.P.; JAMIESON, V.E; GERIG, T.M. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 199, p. 1039-1042, 1991.
- OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; MARTINS, D.B.; TOGNOLI, G.K.; JÚNIOR, E.B.S.; MÜLLER, D.C.; LOPES, S.T.A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P.D.; TEIXEIRA, L.V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. *Ciência Rural*, v.39, n.1, 2009.
- PEIXOTO, R.V.R.; FARIAS, E.; GALERA, P.D. Hemangiossarcoma na terceira pálpebra de cão. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação.*, v.9, n.29, p.280 – 283, 2011.
- PEIXOTO, R.V.R.; GALERA, P.D. Avaliação de 67 casos de protrusão da glândula da terceira pálpebra em cães (2005-2010). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.64, n.5, p.1151-1155, 2012.
- PETZNICK, A.; EVANS, M.D.M.; MADIGAN, M.C.; GARRETT, Q.; SWEENEY, D.F. A preliminary study of changes in tear film proteins in the feline eye following nictitating membrane removal. *Veterinary Ophthalmology.*, v.15, n.3, p.164–171, 2012.
- RHODES, M.; HEINRICH, C.; FEATHERSTONE, H.; BRAUS, B.; MANNING, S.; CRIPPS, P.J.; RENWICK, P. Parotid duct transposition in dogs: a retrospective

- review of 92 eyes from 1999 to 2009. *Veterinary Ophthalmology.*, v.15, n.4, p.213-222, 2012.
- RIBEIRO, A.P.; BRITO, F.L.V.; MARTINS, B.C.; MAMEMDE, F.; LAUS, J.L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.568-575, 2008.
- ROLANDO, M; ZIERHUT, M. The ocular surface and Tear Film and their dysfunction in dry eye disease. *Survey of Ophthalmology.*, v.45, n.2, p.203-210, 2001.
- ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, n.21, p.105-110, 2003.
- RORIG, M.C.L. **Uso de pimecrolimus 0,5% no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães.** Curitiba: UFP, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2009. 72p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- ROYLE, L.; MATTHEWS, E.; CORFIELD, A.; BERRY, M.; RUDD, P.M.; DWEK, R.A.; CARRINGTON, S.D. Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. *Glycoconjugate Journal.*, v. 25, p.763-773, 2008.
- SAITO, A.; IZUMISAWA, Y.; YAMASHITA, K.; KOTANI, T. The effect of third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, v.4, n.1, p.13-18, 2001.
- SAITO, A.; WATANABE, Y.; KOTANI, T. Morphologic changes of the anterior corneal epithelium caused by third eyelid removal in dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, vol.7, n.2, p.113-119, 2004.
- SALISBURY, M.A.; KASWAN, R.L.; BROWN, J. Microorganisms isolated from the corneal surface before and during topical cyclosporine treatment in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *American journal of veterinary research.*v.56, n.7, p.880-884, 1995.
- SAMPAOLESI M.; BIRESSI S.; TONLORENZI R.; INNOCENZI A.; DRAGHICI E.; CUSELLA DE ANGELIS, M.G.; COSSU, G. Cell therapy of primary myopathies. *Archives Italiennes de Biologie.*, v.143, p.235-242, 2005.
- SANCHEZ, R.F.; INNOCENT, G.; MOULD, J.; BILLSON, F.M. Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases. *Journal of Small Animal Practice.*, v.48, p.211-217, 2007.

- SANSOM, J.; BARNETT, K.C.; NEUMANN, W.; SCHULTE-NEUMANN, A.; CLERC, B.; JEGOU, J.P.; HAAS, V.; WEINGARTEN, A. Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical Field Trial. *Veterinary Record*, v.137, n.11, p.504-507, 1995.
- SERRUYA, L.G.; NOGUEIRA, D.C.; HIDA, R.Y. Schirmer Test performed with open and closed eyes: variations in normal individuals. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.72, n.1, p.65-67, 2009.
- SILVA, R.L.; MACEDO, M.C.M.A. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas sem uso de hemocomponentes. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia.*, v.28, n.2, p.153 – 156, 2006.
- SILVA, C.C.; BAPTISTA, L.S.; CARIAS, R.B.V.; NETO, H.C.M.; BOROJEVIC, R. Cultura autóloga de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para o tratamento de ríides faciais. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.*, v.36, n.4, p.288 – 291, 2009.
- SILVERIO, J.; FERREIRA, P.D.V.; PAULINO, L.V.; NETO, V.V; REHDER, J.R.C.L. Implante de plug lacrimal termosensível para tratamento da síndrome da disfunção lacrimal. *Revista Brasileira de Oftalmologia.*, v.69, n.4, p.217-221, 2010.
- SMITH, R. E. Tear Film Complex: Pathogenesis and Emerging Therapies. *Córnea.*, v.24, n.1, p.1-7, 2005.
- SNYDER, P. W. Síndrome de Sjögren. In: TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. *Consulta Veterinária em 5 Minutos*. São Paulo: Manole, 2003. p.1198-1199.
- SLATTER, D. In:_____. *Fundamentos da Oftalmologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo:Roca, 2005, 671 p.
- SOARES, E.J.C.; FRANÇA, F.P. Transplante de glândulas salivares labiais no tratamento do olho seco grave. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia.*, v.68, p.481- 489, 2005.
- STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation.*, v. 107, p. 929-934, 2003.
- TOGNOLI, G.K. **Autotransplante da fração mononuclear da medula óssea em úlcera corneana por hidróxido de sódio experimental em cães**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

- TOGNOLI, G.K.; OLSSON, D.C., MARTINS, D.B., JÚNIOR, E.B.S., SALBEGO, F.Z., OLIVEIRA, G.K., BRAGA, F.V.A., RAISER, A.G., DEZENGRINI, R., CRUZ, F.S.F., CASTRO, M.B., ROSA, M.C., CARREGARO, A.B., PIPPI, N.L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. *Ciência Rural*, v.39, n.1, p.148-155, 2009.
- TORQUETTI, L.; CASTANHEIRA, P.; GÓES, A.M.; NEHEMY, M. Stem cells: potential source for retinal repair and regeneration. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.*, v.70, n.2, p.371-375, 2007.
- VAQUERO, J.; ZURITA, M.; OYA, S.; SANTOS, M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats. Systemic or local administration? *Neuroscience Letters.*, v.398, p.129-134, 2006.
- VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P.; PINHO-FILHO, J.A.; MOTA, A.; ALMEIDA, A.J.G.; CARVALHO, C.; CARVALHO, H.G.; OLIVEIRA, A.D.; SANTO, R.R. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária á doença de Chagas. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia.*, v.82, n.2, p. 181 - 184, 2004.
- WARD, D. A.; HENDRIX, D. V. H. Doenças e Cirurgias dos Sistemas Lacrimal e Nasolacrimal no Cão In: GELATT, K. N. *Manual de Oftalmologia Veterinária*. 3ªEd. Barueri-SP: Manole, 2003, cap. 4, p. 76-87.
- WESTERMEYER, H.D.; WARD, D.A.; ABRAMS, K. Breed predisposition to congenital alacrima in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.12, n.1, p.1-5, 2009.
- WILLIAMS, D. L. Use of punctal occlusion in the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Journal of Small Animal Practice.*, v.43, p.478-481, 2002.
- WILLIAMS, D.L.; PIERCE, V.; MELLOR, P.; HEATH, M.F. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *Journal of Small Animal Preactice.*, v.48, n.5, p.252-256, 2007.
- WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Veterinary Clinics Small Animal Practice.*, v.38, p.251-268, 2008.
- WILKIE, D.A. Management of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Continuing Education for the Practicing Veterinary*, p.58-63, 1993.
- ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Scientiae Veterinariae.*, v.35 (Supl 2), p.289 - 290, 2007.

CAPÍTULO II

TÍTULO

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.

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou “olho seco” é doença comum na rotina clínica, cuja incidência varia entre 1% a 35% (ANDRADE & LAUS, 1997; KASWAN et al., 1998; GUILIANO & MOORE, 2007). Algumas raças apresentam predisposição, como o Cocker Spaniel Inglês, Bulldog Inglês, Lhasa Apso, Shih Tzu, Schnauzer, West Highland White Terrier e Yorkshire Terrier (HERRERA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007; WESTERMEYER et al., 2009). Ela acomete, principalmente, indivíduos com mais de seis anos de idade (SANCHEZ et al., 2007; FONSECA, 2011).

Incrimina-se como fatores causais, a hipoplasia congênita e a perda da inervação parassimpática das glândulas lacrimais, blefaroconjuntivite crônica, uso local de sulfonamidas e de atropina, a cinomose, a leishmaniose, endocrinopatias e a iatrogenia (ALMEIDA et al., 2004; CULLEN et al., 2005; NARANJO et al., 2005; BRITO et al., 2007; HERRERA, 2007; WILLIAMS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; MARTINS et al., 2009; WESTERMEYER et al., 2009; GALERA et al., 2010). Na maioria das vezes, contudo, as causas podem não ser estabelecidas. Nesses casos, assume-se que a doença seja de origem imunomediada, pois cães portadores de CCS apresentam infiltrado mononuclear com variável grau de fibrose glandular, além de grandes áreas de ácinos não funcionais nas glândulas da terceira pálpebra e lacrimal orbitária (KASWAN et al., 1984). Acresce-se resposta clínica satisfatória

com o emprego de imunomoduladores (MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991; SANSOM et al., 1995; WILLIAMS et al., 2007).

A base para o tratamento da CCS é a utilização de lacrimoestimulantes, substâncias capazes de estimular a produção lacrimal, como a CsA, o tacrolimus e o pimecrolimus (BERDOULAY et al., 2005; RORIG, 2009; THOMAS et al., 2009; RAO, 2010; SAHLI et al., 2010). Não obstante os bons resultados obtidos com a terapêutica, nem todos os pacientes responderão ao tratamento. De forma adjutória, procedimentos cirúrgicos, como a transposição do ducto parotídeo, o transplante de glândulas salivares menores e a oclusão das punctas lacrimais podem ser considerados (WILLIAMS, 2002; SCOTTI et al., 2007; ANGÉLICO et al., 2011).

Recente alternativa terapêutica em doenças crônicas e imunomediadas é a terapia celular. As células-tronco (CT) são classificadas em células mononucleares (indiferenciadas) e em multinucleares (KÖRBLING et al., 2003; ROMANOV et al., 2003). As mononucleares dividem-se em hematopoética (CTH), as quais originarão células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e em mesenquimais (CTM), precursoras de miócitos, hepatócitos, osteócito, adipócitos, condrócitos e de estroma. A não diferenciação destes dois tipos celulares é denominada fração de células mononucleares (FCM) (GUARITA-SOUZA et al., 2005).

A terapia celular tem sido empregada para doenças cardíacas, osteoarticulares, oftálmicas e do sistema nervoso central (VILAS-BOAS et al., 2004; DOHMANN et al., 2005; CASTANHEIRA et al., 2008; OLIVEIRA, 2008; OTERO et al., 2009; MÜLLER, 2010).

Como exemplos de utilização em oftalmologia têm-se os transplantes esclerocorneais de limbo (BRUNELLI et al., 2007), emprego na cicatrização de ceratites ulcerativas (TOGNOLI et al., 2009) e, mais recentemente, utilização de FCM periglandular da terceira pálpebra em cães hígidos, em que decorreu aumento da produção lacrimal (FONSECA, 2011; FONSECA et al., 2011).

Diante das muitas assertivas, quanto às células-tronco e à sua utilização em oftalmologia, como modalidade terapêutica, objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos da aplicação autógena da FCM na região periglandular da terceira pálpebra de cães acometidos por CCS relativamente à produção lacrimal, sobre a quantidade

de células caliciformes conjuntivais, e quanto repercussões muitas sobre a superfície ocular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo experimental

Foram selecionados 15 cães, sendo nove machos e seis fêmeas, com a idade entre quatro e 13 anos (idade média de oito anos) e peso entre 5,9 e 26,8 Kg (média 14 Kg), domiciliados, cujos respectivos proprietários leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Estes cães compreenderam nove raças distintas: Basset Hound, Bulldog Inglês, Cocker Spaniel Inglês, Cocker Spaniel Americano, Chow-Chow, Lhasa Apso, Pinscher, Poodle, Shih Tzu e mestiço (sem raça definida).

Os pacientes foram selecionados do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV/UnB), com diagnóstico prévio de ceratoconjuntivite seca e sob tratamento com ciclosporina A 0,2%, por período entre seis e 56 meses. Apenas um paciente não recebeu o tratamento clínico com lacrimoestimulantes previamente ao estudo. Destes animais, dez apresentavam a doença de forma bilateral e cinco manifestavam a CCS unilateralmente, perfazendo 25 olhos tratados.

No momento de inclusão dos indivíduos no estudo, suspendeu-se a administração local da CsA. Todos os cães foram submetidos à semiotécnica oftálmica 15 dias antes da aplicação das células-tronco, utilizando-se o teste Lágrimal de Schirmer¹(TLS), a tonometria de aplanção², biomicroscopia com lâmpada em fenda³, teste de lissamina verde⁴, tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) e teste de fluoresceína⁵.

1 - Teste de Schirmer®- Ophthalmos – São Paulo – Brasil

2 – Tono Pen® XL – Medtronic – Flórida - EUA

3 - Portable Slit lamp SL-15® – Kowa – Califórnia – EUA

4 - Lissamina Verde Strips®- Ophthalmos – São Paulo – Brasil

5 - Fluoresceína Strips® - Ophthalmos – São Paulo – Brasil

Os pacientes foram submetidos ao exame clínico, realização de hemograma e análise bioquímica (ureia, creatinina, ALT, fosfatase alcalina, proteína total e albumina), a fim de se excluírem afecções concomitantes e de se avaliarem os pacientes para os procedimentos em anestesia. Foram incluídos cães com os sinais clínicos da CCS e cujo TLS era menor que 10mm/min.

Os cães foram novamente submetidos ao exame oftálmico, momentos antes da aplicação das CT (D0), bem como aos 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 70, 84, 98 e 112 dias após a aplicação, totalizando 16 semanas de avaliação. Visando-se à padronização de condutas, todas as avaliações foram realizadas por um único profissional.

Avaliaram-se a presença de secreção, hiperemia conjuntival, quemose, transparência corneana e área de opacidade na córnea. Secreção ocular e hiperemia conjuntival foram classificadas em 0, 1, 2 ou 3 (ausente, leve, moderada e severa, respectivamente); a quemose em 0, 1, 2, 3 e 4 (normal, edema acima do normal, edema com desalinhamento da aproximação palpebral, edema com eversão parcial das pálpebras e eversão da pálpebra superior pronunciada respectivamente); a transparência corneana em 0, 1, 2, 3 e 4 (normal, perda de alguma transparência, perda moderada da transparência, envolvimento de toda a espessura estromal e opacificação total não sendo possível visualização da estruturas intraoculares, respectivamente); área de opacidade 0, 1, 2, 3, 4 (normal, < que 25%, < que 50%, < que 75% e maior que 75% respectivamente). Esta avaliação segue o Sistema de Pontuação McDonald-Shadduck Modificado como escala com uso de Lâmpada em Fenda para marcar irritação ocular.

Mediante a soma dos valores obtidos nas avaliações, a doença ocular foi classificada como ausentes (0-2), leve (3-6), moderada (7-10), grave (11-14) e muito grave (15-18), segundo pontuação estabelecida pelo autor.

O teste de Lissamina Verde foi avaliado em grau 0, +, ++ e +++ conforme o grau de impregnação do corante na córnea e conjuntiva. O TRFL foi marcado do tempo zero até o aparecimento do primeiro *spot* enegrecido, tendo o tempo máximo de 20 segundos.

Por algumas vezes, a avaliação clínica no período após o tratamento não foi realizada em todos os animais, por motivos os mais diversos.

Coleta da Medula Óssea

Procedeu-se à tricotomia da região do esterno. Realizou-se neuroleptoanalgesia com cloridrato de xilazina⁶ (0,3mg/kg) e citrato de fentanila⁷ (10µg/kg), administrados por via intra muscular.

Decorridos 15 minutos da aplicação da medicação, os pacientes foram posicionados em decúbito esternal e submetidos à anti-sepsia para coleta da medula óssea com PVPI degermante, PVPI tópico e álcool 70%. Em ato contínuo, procedeu-se à punção percutânea do esterno com agulha calibre 40x12mm⁸ e seringa de 10mL⁹ heparinizada (0,5mL de heparina¹⁰ diluída em 1,5 mL de soro fisiológico), sendo a quantidade de medula óssea coletada padronizada em 4 mL. A analgesia pós coleta foi realizada com aplicação única de meloxicam¹¹ na dose 0,1 mg/Kg por via intra muscular.

Isolamento da fração de células mononucleares

O isolamento da FCM foi realizado no Laboratório de Bioprospecção da Universidade de Brasília. Amostras de MO foram acondicionadas em seringas em isopor com gelo, até a separação da FCM. Para isolamento da FCM, utilizou-se a técnica de Boyum (1968) modificada por Tognoli et al. (2007).

Em capela de fluxo laminar previamente higienizada com álcool 70% e exposta à luz ultravioleta a medula óssea foi transferida para tubos Falcon de 15mL, contendo gradiente de densidade de 1,077g/dL¹², na proporção 1:1 de sangue:gradiente. Os tubos foram centrifugados a 680G por 30 minutos, à temperatura ambiente. Ao final do processo, observou-se separação das células mononucleares, visíveis na forma de um halo na suspensão (figura 1A).

6 - Calmiun® - Agener União - São Paulo - Brasil

7 - Fentanest® - Cristália - São Paulo - Brasil

8 - Agulha 40x12 - Solidor - Anhui - China

9 - Seringa 10mL - BD - Curitiba - Brasil

10 - Hepamax-S - usiegel - São Paulo - Bras

11 - Maxicam® - o Fino - São Paulo - Brasi

12 - Histopaque®-1077 - Sigma-Aldrich - Steinheim - Germany

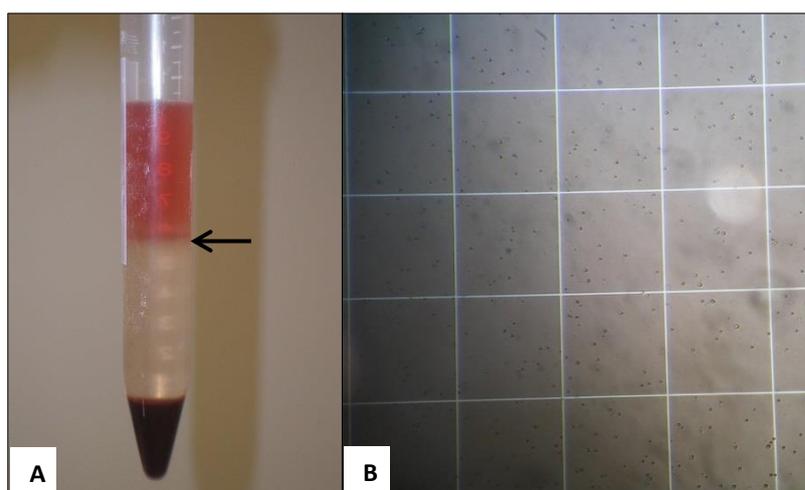


Figura 1: (A) Amostra de medula óssea após a centrifugação com gradiente de densidade; notar halo central delimitando a FCM (seta preta). (B) imagem microscópica da FCM sobre a câmara de Neubauer para contagem celular.

O halo contendo a FCM foi aspirado com uma pipeta automática e submetido a duas centrifugações consecutivas com DMEM¹³ e soro fetal bovino¹⁴, a 680G por 10 minutos, com o objetivo de se remover o gradiente de densidade. Obteve-se um *pellet* uniforme no fundo do tubo, contendo a fração de células mononucleares da medula óssea. O *pellet* foi ressuspensão em NaCl 0,9%, totalizando um volume final de 0,6mL.

Ao término da incubação, retirou-se uma alíquota de 100µL da solução para quantificação celular e teste de viabilidade. Adicionou-se 100µL de azul de trypan 0,4%¹⁵ aos 100µL da FCM, homogeneizando-os. Com o auxílio de pipeta automática, a amostra foi transferida para câmara de Neubauer para contagem celular e avaliação da viabilidade celular (figura 1B). Só foram aceitas amostras com quantidade celular maior que 2×10^6 células/mL e viabilidade superior a 70%.

A contagem celular no aspirado de medula óssea demonstrou média de $8,26 \times 10^6$ células por animal (amplitude $2,1 \times 10^6$ – $24,68 \times 10^6$) apresentando de viabilidade celular média de 99,3% (amplitude 94,78% - 100%).

Administração da fração de células mononucleares

Para a administração da FCM, a superfície ocular foi submetida a anti-sepsia com solução de PVPI 0,1%. Em ato contínuo, instilou-se uma gota de colírio anestésico¹⁶ sobre a conjuntiva palpebral da terceira pálpebra, seguindo-se a aplicação da FCM na região periglandular da mesma, empregando-se pinça de

Graeff e agulha de calibre 13x4,5mm, acoplada em seringa de 1mL. Os pacientes acometidos bilateralmente receberam 0,25mL em cada olho, já os de acometimento unilateral receberam 0,5mL da FCM no olho acometido.

Coleta da Conjuntiva Bulbar

A conjuntiva foi coletada em dois momentos, sendo o primeiro logo após a punção da medula óssea e o segundo no dia da última avaliação clínica. Em ambos os procedimentos, empregou-se o mesmo método: anti-sepsia com solução de PVPI 0,1%, seguida a instilação de uma gota de colírio anestésico¹⁶. Decorridos cinco minutos da instilação, a conjuntiva bulbar foi seccionada na região temporal superior, empregando-se pinça anatômica e tesoura de conjuntiva.

Histologia

As amostras foram acondicionadas em frascos identificados contendo formalina tamponada 10% e, posteriormente, preparadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília – LPV-UnB. Depois de fixadas foram incluídas em parafina e submetidas a cortes histológicos em micrótomo manual à espessura de 5µm. Uma lâmina de cada fragmento foi confeccionada e corada com hematoxilina/eosina e outra por *Periodic Acid Schiff* (PAS)¹⁷.

Para quantificação da conjuntivite à microscopia, utilizou-se gradação: 1, infiltrado mínimo; 2 infiltrado leve; 3 infiltrado moderado; 4 infiltrado acentuado e 5 infiltrado acentuado difuso.

A contagem de células calciformes foi estabelecida pela média entre o total de células visibilizadas e o número de campos contados, em maior aumento (400x), sendo contados no máximo, dez campos. A contagem não foi realizada em campos aleatórios devido ao tamanho da amostra. Iniciou-se na borda da incisão seguindo o epitélio conjuntival de forma contínua.

13 - DulbeccosModifiedEagleMedium (DMEM) – Gibco –Nova Iorque – EUA

14 - Fetal BovineSerum– Gibco –Nova Iorque – EUA

15 - Trypan Blue Solution 0,4% - Sigma Aldrich - Steinheim– Germany

16 - Oxinest® - Latinofarma – São Paulo – Brasil

17 -Ácido Periódico Schiff (PAS) – Easy Path – São Paulo – Brasil

Análise estatística

A evolução de cada parâmetro ao longo do tempo foi descrita em um gráfico de pontos (*scatterplot*), acompanhado de uma regressão linear para visualização de tendências. Os valores do TLS, da avaliação clínica, da impregnação por lissamina verde e o TRFL no período prévio ao tratamento e durante as 16 avaliações foram submetidos ao teste *t-Student* (considerando diferença estatística com $p=0,05$). Para as avaliações foi utilizado o *software* STATA 12® (Statacorp, 2011).

Comitê de Ética

O experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, por estar de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (UnBDOC nº 61728/2012, 05 de julho de 2012, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera).

RESULTADOS

Avaliando-se os valores do TLS, a regressão linear demonstrou aumento da produção lacrimal até a sexta semana (42 dias após a aplicação da CT) (gráfico 1). Após este período, a linha de regressão demonstrou diminuição dos valores, ocorrendo na avaliação geral uma diminuição do TLS (gráfico 2). No entanto em nenhum momento o teste *t-Student* mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,135$).

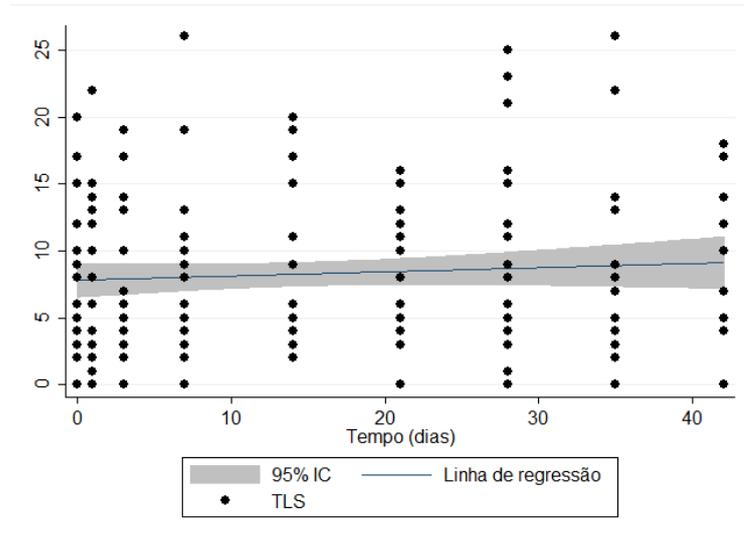


Gráfico 1: *Scatterplot* do TLS x tempo entre T0 e T6. Verifica-se que, apesar da tendência ao aumento do TLS, o valor final encontra-se dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, sem diferença estatística significativa dos valores iniciais.

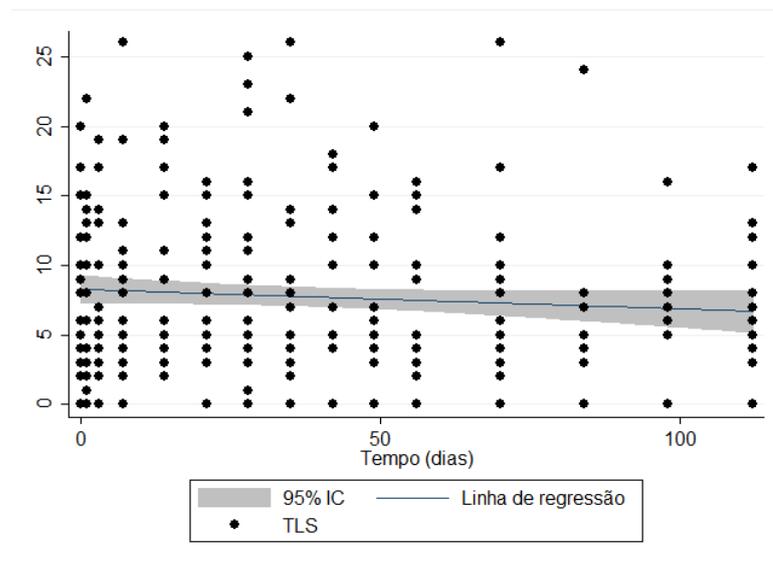


Gráfico2: *Scatterplot* do TLS x tempo entre T0 e T16. Ao final das avaliações a tendência da curva foi de diminuição do TLS, mas o valor final encontra-se dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, sem diferença estatística significativa dos valores iniciais.

O teste *t-Student* não foi estatisticamente significativo ($p=0,633$) para a avaliação clínica geral, expressando que o coeficiente de regressão para esta variável não é estatisticamente diferente de zero. Há melhora dos parâmetros clínicos com o tempo. Mas não pode-se afirmar com 95% de confiança que os

valores são estatisticamente diferentes daqueles do início (t0) da pesquisa (gráfico 3).

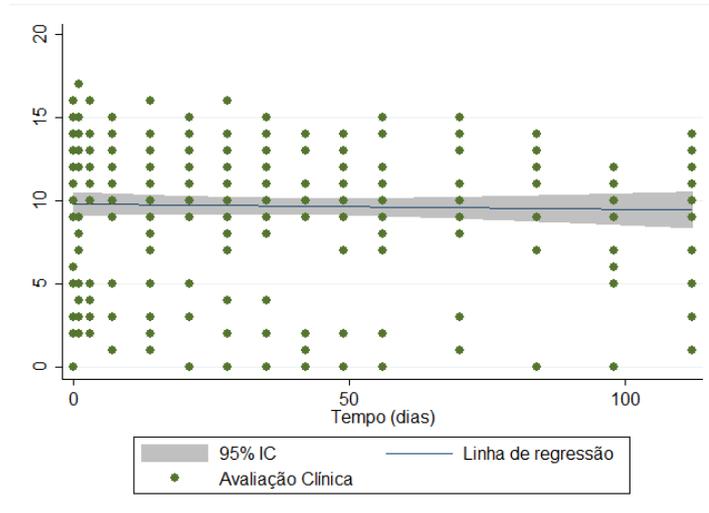


Gráfico 3: *Scatterplot* da avaliação clínica x tempo. Verifica-se uma média entre os valores iniciais e finais dentro do intervalo de confiança de 95%, não havendo diferença estatística significativa entre os dois momentos.

A avaliação pelo teste de lissamina relata ao teste *t-Student* diminuição estatisticamente significativa ($P < 0,000$) da impregnação do corante na córnea dos pacientes entre os valores iniciais T0 e à 16^o semana de avaliação (gráfico 4).

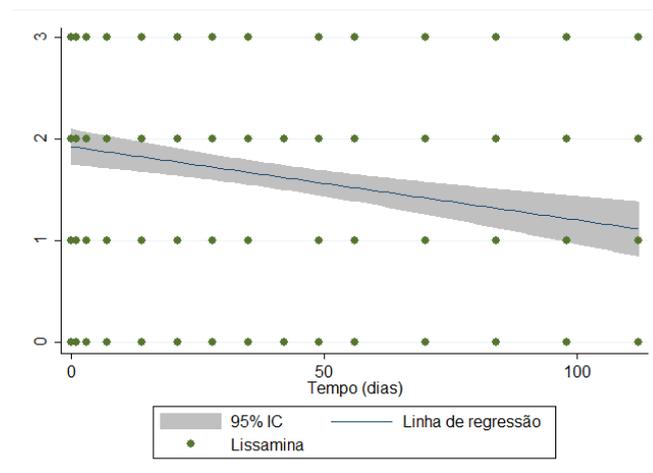


Gráfico 4: *Scatterplot* entre lissamina verde x tempo. Verifica-se o valor final menor que o inicial, e este fora do intervalo de confiança de 95%, demonstrando que a alteração é estatisticamente significativa.

O tempo de ruptura do filme lacrimal apresentou aumento estatisticamente significativo ao teste *t-Student* ($P=0,03$) entre os valores iniciais (T0) e os valores à 16^o semanas da avaliação T16 (gráfico 5).

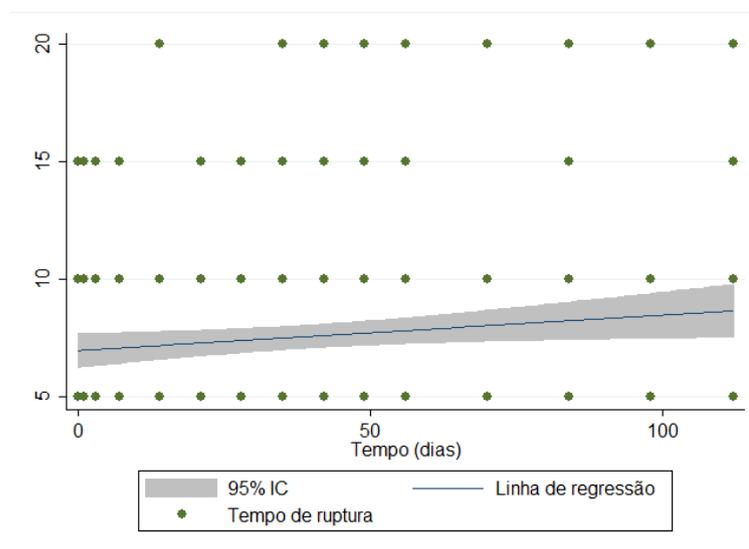


Gráfico 5: *Scatterplot* do tempo de ruptura do filme lacrimal x tempo. O valor final é maior do que os valores iniciais, cuja variação é estatisticamente significativa.

O paciente número 1, Cocker, macho de 14 anos, foi o único animal do estudo não previamente tratado com lacrimoestimulante. Este paciente apresentou melhora na produção lacrimal assumindo valores acima da normalidade (15 mm/min) e com ausência total de secreção e hiperemia conjuntival até o final das avaliações.

A análise histológica da conjuntiva bulbar demonstrou diminuição do grau inflamatório em 30% das conjuntivas avaliadas; 40% mantiveram o quadro estável e 30% apresentaram avaliação inflamatória superior aos valores iniciais. A maioria dos infiltrados visibilizados em ambas as coletas foi linfo-plasmocítico e, em 37% das amostras, evidenciaram-se, também, neutrófilos.

Na contagem de células calciformes, os valores iniciais foram, em média, 78,3 células/campo, aumentando para 161 células/campo após o tratamento. Em 50% dos pacientes ocorreu aumento na quantidade de células calciformes, 20% mantiveram a mesma quantidade do início do tratamento e em 30% dos casos verificou-se diminuição na quantidade das células.

Tabela 1: TLS dos olhos tratados com FCM durante as 16 semanas de avaliação.

Animal	TLS inicial	TLS 3d	TLS 1 ^a s	TLS 2 ^a s	TLS 3 ^a s	TLS 4 ^a s	TLS 5 ^a s	TLS 6 ^a s	TLS 7 ^a s	TLS 8 ^a s	TLS 10 ^a s	TLS 12 ^a s	TLS 14 ^a s	TLS 16 ^a s
Bart (01)	9	14	9	11	10	23	-	14	15	16	-	-	16	17
Duquesa (02)	4	0	0	3	3	0	5	7	5	3	3	5	5	6
Lulu (03)	0	7	3	5	4	0	0	4	0	5	4	3	0	0
Lulu (03)	3	13	8	9	11	4	8	5	3	10	4	0	6	3
Paloma (04)	2	3	2	6	5	3	2	-	4	5	5	-	6	4
Paloma (04)	4	10	4	3	4	12	4	-	6	5	17	-	6	5
Kareen (05)	8	-	8	6	12	11	9	18	-	9	-	-	9	8
Kareen (05)	10	-	3	11	13	6	5	12	-	10	-	-	10	10
Nico (06)	8	5	2	3	6	16	3	-	3	3	2	5	5	6
Spify (07)	5	-	9	11	5	6	5	5	-	3	3	-	-	4
Fred (08)	6	19	-	15	-	21	14	17	-	-	-	-	-	12
Fred (08)	10	17	-	19	-	25	26	18	-	-	-	-	-	17
Babaloo (09)	8	10	13	-	-	-	9	-	-	5	5	7	-	0
Babaloo (09)	10	19	26	-	-	-	22	-	-	14	17	24	-	13
July (10)	0	6	11	-	8	8	7	5	10	5	12	8	-	7
July (10)	5	13	10	-	6	9	13	10	7	10	12	7	-	7
Mel (11)	3	2	2	4	10	5	5	-	5	3	6	4	7	5
Mel (11)	10	6	6	6	16	8	8	-	12	9	10	7	8	10
Thor (12)	2	5	4	5	8	5	4	7	4	2	9	5	0	5
Bidu (13)	3	0	3	2	10	1	-	-	3	0	0	-	5	5
Bidu (13)	10	10	19	20	16	15	-	-	20	15	26	-	7	5
Nina (14)	4	5	8	-	8	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Nina (14)	2	4	5	-	6	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Bel (15)	0	0	0	4	0	0	-	0	3	3	5	0	0	5
Bel (15)	9	10	11	17	15	16	-	10	5	10	8	7	8	7

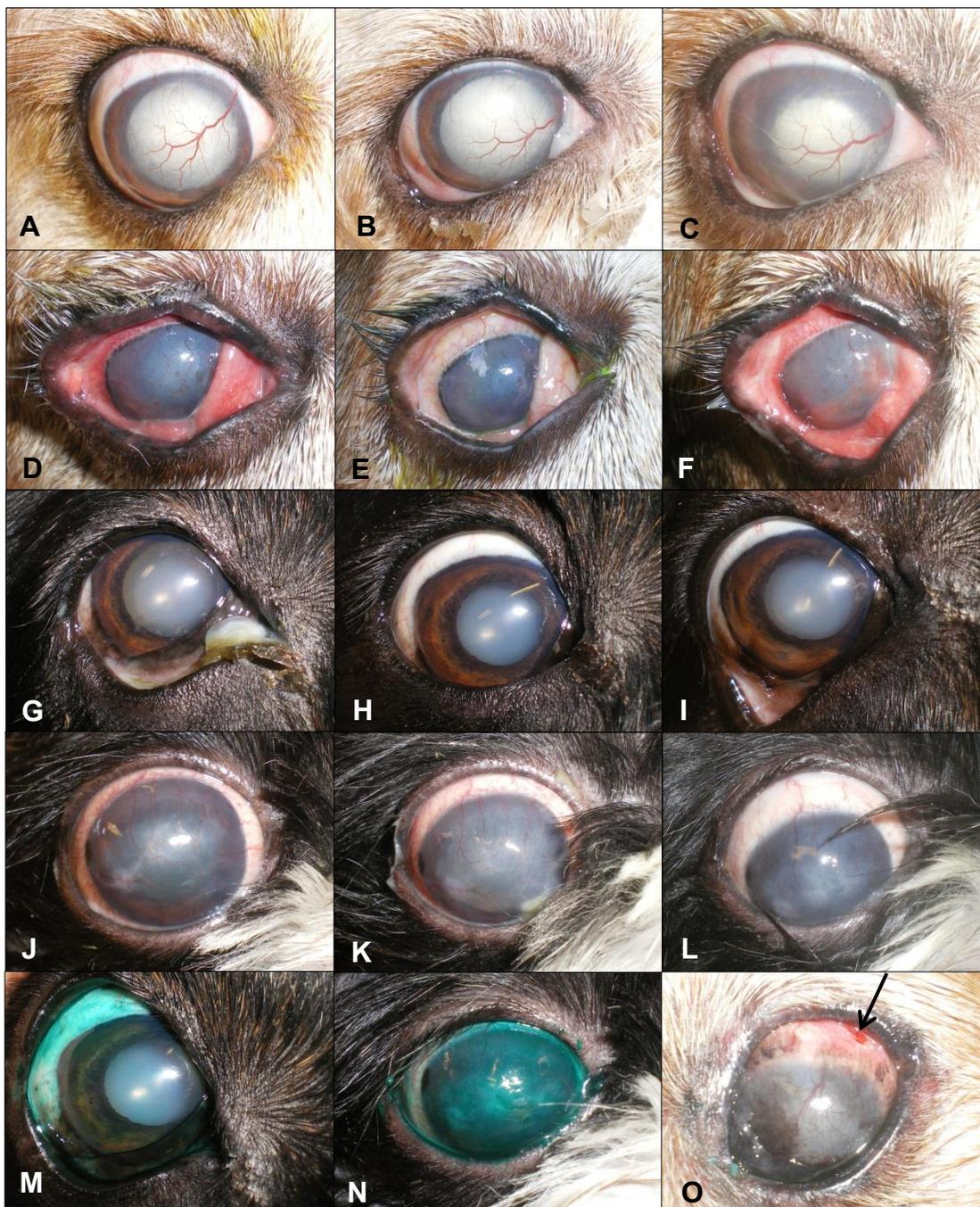


Figura 2: Ilustração fotográfica dos olhos de cães com CCS submetidos à aplicação da FCM da MO. (A), (B) e (C) animal n°9 antes do tratamento, com 8 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento respectivamente. (D), (E) e (F) animal n°10 antes do tratamento, com 8 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento, respectivamente. (G), (H) e (I) animal n°1 antes do tratamento, com 6 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento, respectivamente. (J), (K) e (L) animal n°13 antes do tratamento, com 5 semanas de tratamento e com 16 semanas de tratamento, respectivamente. (M) animal com impregnação 0 de lissamina verde. (N) animal com impregnação +++ de lissamina verde. (O) animal após coleta da conjuntiva bulbar (seta).

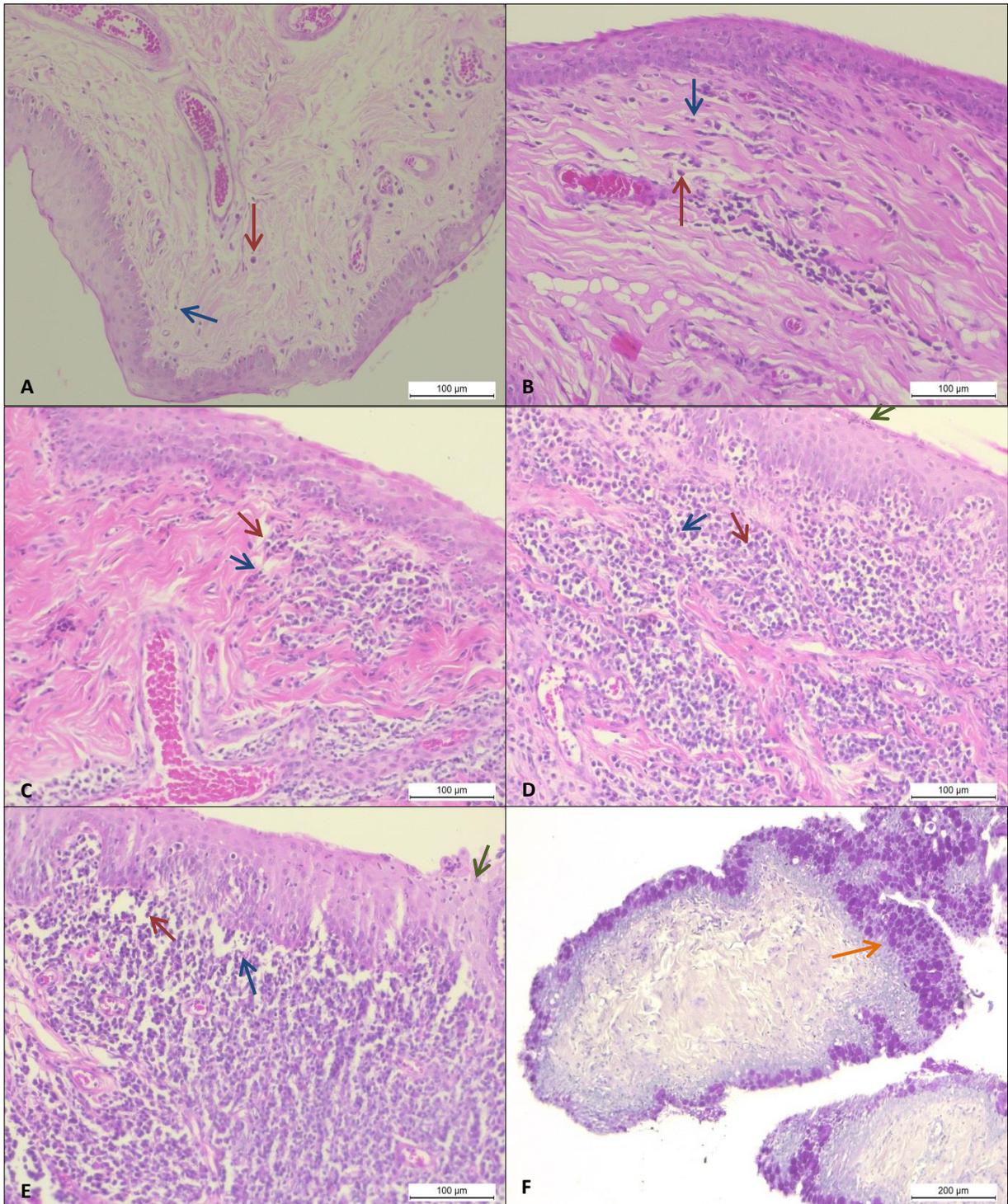


Figura 3: Ilustração fotográfica dos cortes histológicos da conjuntiva bulbar de cães, elucidando os graus de inflamação (1-5). (A): grau 1, com raros plasmócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta azul) no estroma da conjuntiva bulbar. (B): grau 2, com discreto infiltrado de plasmócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta azul) no estroma da conjuntiva bulbar. (C): grau 3, com infiltrado de plasmócitos moderado (seta vermelha) e linfócitos (seta azul) expandindo para o estroma da conjuntiva bulbar. (D): grau 4, com infiltrado composto por grande quantidade de plasmócitos (seta vermelha), linfócitos (seta azul) e raros neutrófilos invadindo o epitélio (seta verde) da conjuntiva bulbar. (E): grau 5, apresentando completa substituição e expansão do estroma por grande quantidade de plasmócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta azul), com alguns neutrófilos permeando o epitélio (seta verde) da conjuntiva bulbar, HE 200x. (F) inúmeras células caliciformes (seta laranja) compondo o epitélio da conjuntiva bulbar, PAS 100x.

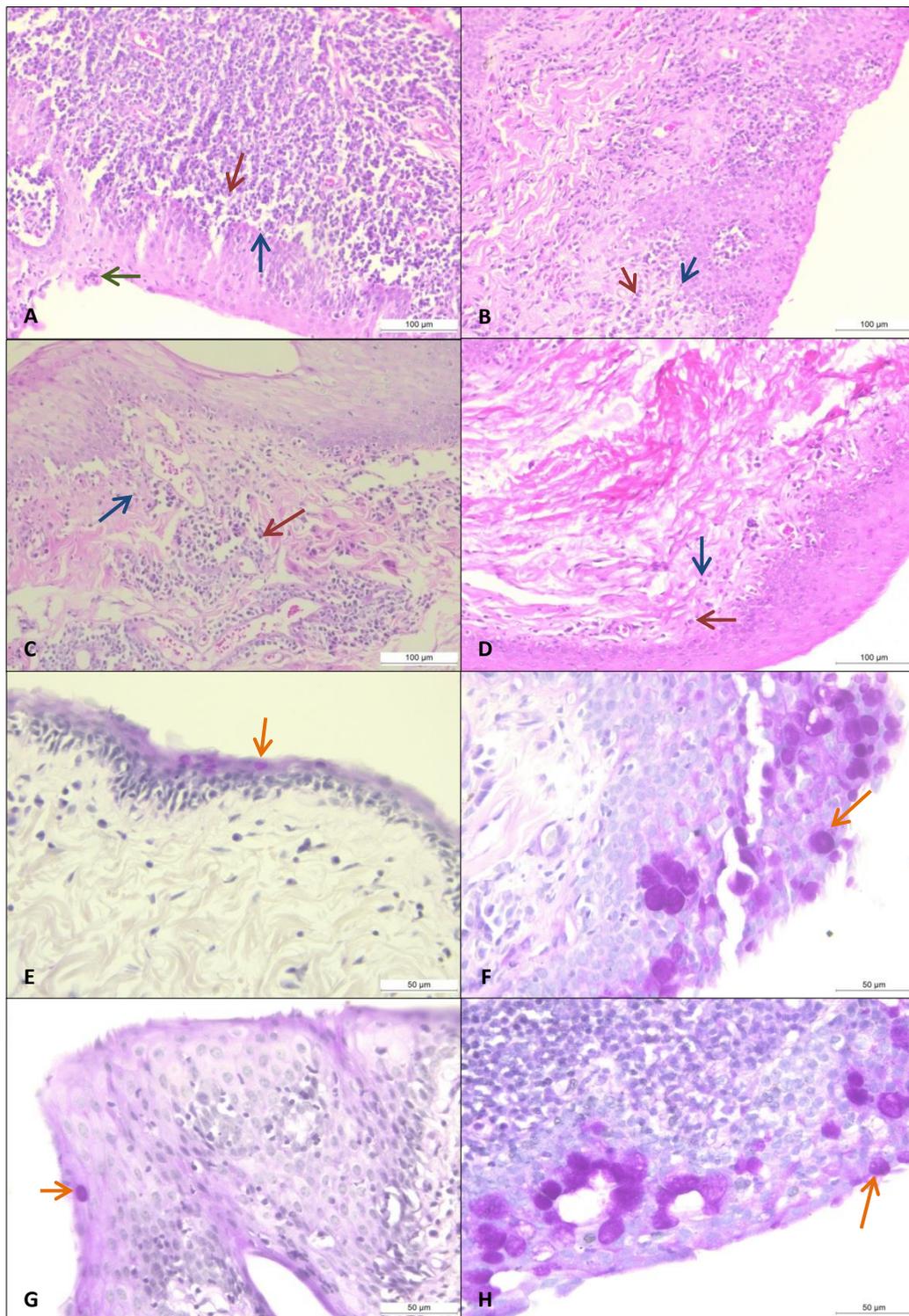


Figura 4: Ilustração fotográfica dos cortes histológicos da conjuntiva bulbar de cães. (A) Animal nº10, com inflamação grau 5 antes do tratamento. (B) Animal nº 10 com inflamação grau 3 na 16ª semana do tratamento, HE 200x. (C) Animal nº13 com inflamação grau 3 antes do tratamento. (D) Animal nº13 com inflamação grau 2 na 16ª semana do tratamento, HE 200x. (E) Animal nº8 apresentando densidade de células caliciformes de 0,3 células/campo antes do tratamento. (F) Animal nº8 apresentando densidade de células caliciformes de 25,2 células/campo, 16 semanas após o tratamento, PAS 400x. (G) Animal nº10 apresentando densidade de células caliciformes de 0,22 células/campo antes do tratamento. (H) Animal nº10 apresentando densidade de células caliciformes de 8,7 células/campo, 16 semanas após o tratamento, PAS 400x.

DISCUSSÃO

Observar as consequências deletérias da CCS sobre a saúde ocular, bem como acompanhar proprietários, quanto ao manejo terapêutico e às limitações financeiras, faz pensar em possibilidades e em investigações que levem à cura desta afecção. As células-tronco aparecem neste cenário, ofertando opções de cura para pacientes com enfermidades de prognóstico desfavorável.

A escolha pela utilização da fração de células mononucleares (FCM), e não pelo uso das células-tronco mesenquimais (CTM), decorreu da facilidade de obtenção das primeiras (GUARITA-SOUZA, et al., 2005), além de resultados promissores de estudos conduzidos por esta equipe (FONSECA et al., 2011). Além disto, a utilização da FCM, amplamente difundida, oferece bons resultados (VILAS-BOAS et al., 2004; DOHMANN et al., 2005; OLIVEIRA, 2008; SALBEGO, 2010; TREICHEL, 2010).

O método de separação celular descrito por Boyum (1968) utiliza gradiente de densidade de 1,077g/dL que, após centrifugação, separa a fração de células mononucleares da medula óssea total. A técnica é amplamente utilizada e suscita bons resultados, quanto à quantidade e à viabilidade das células obtidas (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLLI, 2009; MÜLLER, 2010; FONSECA, 2011).

Oliveira (2008) obteve $4,86 \times 10^8$ células, com viabilidade de 95,25%, realizando punção da crista ilíaca e da fossa trocantérica com agulha de Steis, coletando 10mL/kg de medula óssea. Tognoli (2009) obteve $5,7 \times 10^7$ células com viabilidade de 95,3%, realizando punção na fossa trocantérica com agulha de Steis em quantidade de 15mL/kg de medula óssea e Müller (2010), $2,34 \times 10^6$ células com viabilidade de 95,7% utilizando agulha de Steis e coletando 10mL/kg de medula óssea, em locais diferentes de um mesmo indivíduo (fêmur e úmero). Estes três experimentos propiciam quantidade e viabilidade celular desejadas, mas implicam em submeter o paciente à anestesia geral e, à transfusão sanguínea autóloga posteriormente à coleta, para viabilizar a obtenção de grande quantidade de medula óssea.

Embora a punção da medula óssea tendo, como sítio de colheita o osso esterno, tenha sido pouco utilizada em experimentos, Massumoto et al. (1997)

utilizaram-na em seres humanos, afirmando ser local satisfatório para a obtenção de células em quantitativo desejado, além de ser isento de complicações. Fonseca et al. (2011) utilizaram o esterno, em cães, obtendo média de $3,59 \times 10^7$ células, com viabilidade média de 98,13%, valores estes acima do limite mínimo de 2×10^6 células, preconizado como padrão de enxertia de medula óssea (GENGOZIAN, 2000; TOGNOLI, 2008).

Agulhas hipodérmicas de calibre 40x12mm são utilizadas com sucesso para obtenção de medula óssea de cães (CASTANIA & VOLPON, 2007; FONSECA, 2011). Como grande vantagem estas agulhas oferecem um custo mais baixo que as agulhas específicas para a punção da medula óssea, além de serem facilmente encontradas comercialmente.

A quantidade de células obtidas por Fonseca (2011), Oliveira (2008), Tognoli (2009) e Müller (2010), foi semelhante. Entretanto, diferentemente dos demais experimentos, a coleta de Fonseca (2011) foi realizada com neuroleptoanalgesia e não com anestesia geral, utilizaram-se agulhas hipodérmicas e dada a quantidade de medula óssea coletada, não foi necessária a transfusão sanguínea autóloga. Estes fatores implicaram em menores riscos aos animais e na aceitação dos proprietários em submeter seus cães a tal procedimento. Tão logo a neuroleptoanalgesia com cloridrato de xilazina e citrato de fentanila não apresentou efeitos adversos, bem como propiciou boa coleta do material. O uso de dose única de meloxicam no período pós-coleta foi suficiente para controle analgésico e anti-inflamatório, haja vista que não foram identificados pacientes com debilidade analgésica e não foi necessária a suplementação com analgésicos.

No presente estudo, a quantidade de células da fração de células mononucleares obtida após a centrifugação da medula óssea foi menor que a descrita por Fonseca (2011), mas em todas as amostras encontrou-se a quantidade mínima de células necessária à terapia celular (2×10^6) (GENGOZIAN, 2000), além de apresentar viabilidade celular superior à 90%, validando o emprego da agulha hipodérmica 40x12mm. Esta variação no número celular é considerada normal, mesmo quando utilizado o mesmo protocolo de obtenção da FCM (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI, 2009; OLSSON, 2009; MÜLLER, 2010).

O grande trunfo da terapia celular é a plasticidade das células-tronco, ou seja, a capacidade destas células em adquirir o fenótipo de um tecido diferente do seu

tecido de origem (GROVE et al., 2004). As CT mesenquimais tem a capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, células musculares, osteócitos, hepatócitos e tecido glandular (GROVE et al., 2004; GUARITA-SOUZA, et al., 2005; GORJUP et al., 2009; SHENG et al, 2009). Todavia, nem sempre esta diferenciação confere a capacidade desta nova célula em exercer a função da célula substituída (KÖRBLING et al., 2003; HOWS, 2005).

Clinicamente, tem-se a FCM levando à melhora sintomática e maior capacidade de exercício em pacientes com cardiopatia isquêmica grave (DOHMANN et al., 2005). Guarita-Souza et al. (2005) relataram estabilização de infarto do miocárdio e melhora da fração de ejeção, em ratos tratados com fração de células mononucleares e células tronco mesenquimais. Vaquero et al. (2006) aplicaram células-tronco da medula óssea em ratos com paraplegia crônica induzida e verificaram melhora funcional, aumento da massa muscular nos membros inferiores e imagens histológicas sugestivas de diferenciação neuronal e reconstrução da medula espinhal.

A plasticidade completa ocorre quando a diferenciação celular se associa ao restabelecimento da função, levando à melhora clínica (KÖRBLING et al., 2003; HOWS, 2005). Sheng et al. (2009) induziram diferenciação no fenótipo das CT mesenquimais em células das glândulas sudoríparas, administrando-as em pacientes com queimaduras profundas e déficit na transpiração. O tratamento resultou em melhora da transpiração, e semelhança entre os fluídos produzidos em áreas com e sem o enxerto.

O presente estudo selecionou casos clínicos de CCS não responsivos aos tratamentos padronizados. Em casos avançados de CCS, os pacientes apresentam grau II ou III de adenite crônica, quando grande parte do tecido glandular é substituído por tecido fibroso, com atrofia glandular (KASWAN et al.,1984), resultando em um TLS reduzido. Hipotetizou-se que a terapia celular empregada neste estudo pudesse regenerar o tecido glandular em estágios avançados de fibrose e, conseqüentemente, aumentar a produção lacrimal. Além disto, buscou-se a associação com o efeito imunomodulador encontrado nas células-tronco mesenquimais, haja vista que a CCS é uma doença que apresenta como principal ator causal a inflamação imunomediada (KASWAN & SALISBURY, 1990; RIBEIRO et al., 2008; WILLIANS, 2008).

A ação imunomoduladora das células-tronco mesenquimais não está totalmente elucidada; no entanto, assume-se que as CTM atuam na supressão da proliferação das células T, com ação sobre as células *T-helper*, (ZAPPIA et al., 2005; NAUTA & FIBBE, 2007; BEM-AMI et al., 2011; LI et al., 2013). Uma vez que o aumento na quantidade das células *T-helper* implicada na origem da CCS imunomediada (GAO et al., 1998; IZCI et al., 2002; SMITH, 2005), poder-se-ia supor que a aplicação das células-tronco mesenquimais interromperia este mecanismo.

Até o quadragésimo segundo dia observa-se melhora da produção lacrimal, provavelmente creditada aos efeitos imunomoduladores da CTM, e, talvez, à plasticidade celular, com regeneração tecidual, embora esta variável não tivesse sido objeto de estudo para presente pesquisa (DOHMANN et al., 2005; SHENG et al., 2009).

Após o 42^o dia, os pacientes proporcionaram diminuição do TLS, mas sem diferença estatística dos valores iniciais. Deste modo, presumisse que as células-tronco proporcionaram efeito na manutenção da produção lacrimal, seja na sua ação imunomoduladora ou na melhora histológica dos ácinos, pois os pacientes não apresentaram piora do quadro mesmo ficando mais de 100 dias sem tratamento com lacrimoestimulantes.

Entretanto, por não fazer uso de imunomoduladores, a fim de que eles não interferissem com os resultados da pesquisa, mesmo que tenha ocorrido regeneração glandular de forma parcial nos animais deste estudo, é provável que a perpetuação do ciclo inflamatório da doença tenha causado nova destruição tecidual. Uma vez que cães com CCS idiopática apresentam índices elevados de células inflamatórias na glândula da terceira pálpebra (WILLIANS, 2008), que podem ser reduzidas com o emprego da ciclosporina (IZCI et al., 2002).

Um fato adicional deste estudo, e que não está presente nos relatos de melhora em doenças crônicas (DOHMANN et al., 2005; VAQUERO et al., 2006; SHENG et al., 2009) é que, na CCS, diferentemente da cardiopatia isquêmica, da paraplegia traumática e da queimadura profunda, a atividade imunomediada se faz presente. Se o processo inflamatório imunomediado não for inibido, provavelmente haverá perpetuação da ação inflamatória, e subsequente dano aos ácinos produtores do filme lacrimal (KASWAN & SALISBURY, 1990; MORGAN & ABRAMS, 1991; IZCI et al., 2002; WILLIANS, 2008). Deste modo inferimos que a não

continuação na melhora da produção lacrimal possa ter decorrido da ausência de controle da ação inflamatória imunomediada. Embora as CTM tenham ação contra as células T (NAUTA & FIBBE, 2007; BEM-AMI et al., 2011; LI et al., 2013), os seus efeitos podem ser anulada com o passar dos dias (ZAPPIA et al., 2005).

A diferenciação celular depende, também, do contato das células enxertadas com células sadias (ORLIC et al., 2001). Como a maioria dos pacientes deste estudo eram portadores de CCS crônica e não responsiva ao tratamento com CsA, não se pode descartar a possibilidade de hipoplasia e fibrose das glândulas da terceira pálpebra (KASWAN et al., 1984), dificultando o processo de plasticidade.

O paciente número 1 teve seu tratamento iniciado mediante diagnóstico precoce, sem instalação dos sinais clínicos crônicos da afecção, podendo-se inferir que apresentasse o primeiro estágio de adenite (KASWAN et al., 1984). Verificou-se, neste caso, uma resposta terapêutica extremamente satisfatória à enxertia da FCM, de forma mais evidente e persistente que nos demais, todos com CCS crônica. Observou-se, neste paciente melhora na produção lacrimal, atingindo valores considerados normais, e ausência dos sinais clínicos da doença, como secreção e hiperemia ocular até o término das avaliações.

A melhora rápida de doenças utilizando as CT pode ocorrer precocemente, com apenas 15 dias de aplicação, (VAQUERO et al., 2006), corroborando com o verificado nesta pesquisa. Além da plasticidade e ação imunomoduladora, as CT agem de forma adjuvante em processos inflamatórios, como na diminuição da COX-2 (OTERO et al., 2009; TYNDALL & UCCELLI, 2009; RYU et al., 2012).

Ainda não há um consenso sobre a melhor via de administração das CT. Alguns trabalhos apontam para a utilização da via sistêmica, pois o tecido lesionado libera citocinas, como a SDF-1 (*stromaderived factor 1*), atraindo células-tronco (NAGAYA et al., 2004; OTERO et al., 2009; ZHUO et al., 2013)

Neste estudo, optou-se pela via intralesional, dados os muitos relatos de administração da fração de células mononucleares ou das células-tronco mesenquimais diretamente em tecidos e órgãos (VILAS-BOAS et al., 2004; DOHMANN et al., 2005; BABER et al., 2007; ZAMPROGNO, 2007; CASTANHEIRA et al., 2008; TOGNOLI et al., 2009; TREICHEL, 2010; SOUSA et al., 2011; KANG et al., 2012; RYU et al., 2012). Além disto, há referências de efeito superior da aplicação intralesional à aplicação intravenosa (VAQUERO et al., 2006).

Deve-se considerar, ainda, que a melhora clínica com a terapia celular pode estar associada à quantidade de células que chegam ao local da lesão, ou seja, a resposta é dose dependente, conforme demonstrado por Mahmood et al. (2003), que verificaram correlação positiva entre a quantidade de células aplicadas e a resposta clínica dos pacientes. Contrariamente, Zhuo et al. (2013) não constataram diferença significativa na resposta clínica de pacientes com insuficiência renal quando a dose das células-tronco foi aumentada. Otero et al., (2009) afirmaram que “nem sempre mais é melhor”. Seguindo o raciocínio que aumentando a quantidade de células os efeitos melhoram infere-se que uma segunda aplicação de CTM na região periglandular da terceira pálpebra possa ter efeitos aditivos à manutenção da melhora clínica, questão a ser respondida em estudos posteriores.

A determinação da localização das células-tronco enxertadas é possível mediante técnicas de marcação, tanto da fração de células mononucleares como das células-tronco mesenquimias, em análises histológicas, imunoistoquímicas ou de imunofluorescência (BABER et al., 2007; CASTANHEIRA et al., 2008; TOGNOLI et al., 2009; RYU et al., 2012; WOOD et al., 2012). Entretanto, as análises exigem remoção de fragmento tecidual, procedimento descartado neste estudo, dada a importância da glândula da terceira pálpebra sobre a qualidade de vida dos cães (MILJANOVIC´ et al., 2007), e pelo grupo experimental ter sido formado por animais domiciliados.

Os resultados das análises histológicas da conjuntiva bulbar seguiram para a mesma tendência da avaliação clínica, não sendo observadas diferenças entre os achados (melhora, estável e piora). Pelos resultados, observa-se melhora até a sexta semana, depois, piora do quadro. Infere-se, mais uma vez, que a piora possa ter decorrido da inflamação não controlada pela ação anti-inflamatória da célula-tronco. Soma-se a tal a inflamação, que se perpetua na CCS quando não tratada (WILLIANS, 2008), destruindo as células glandulares (NAUTA & FIBBE, 2007; WILLIANS, 2008). Desta forma, pressupõe-se que a análise da conjuntiva no período de melhora, talvez expressasse resultados mais positivos na análise histológica.

O *Periodic Acid Schiff* (PAS) é o corante utilizado para a marcação de muco (MOORE et al., 1987; RIVAS et al., 1992). Verificou-se aumento na quantidade de células caliciformes da conjuntiva tanto na média, que aumentou de 78,3 para 161

células/campo, quanto na porcentagem de pacientes que apresentaram tal aumento, no curso do tratamento (50%). As células calciformes da conjuntiva são importantes indicadores da severidade da doença ocular, sendo a diminuição na hidratação da conjuntiva e o processo inflamatório no olho seco as causas apontadas para esta alteração (RIVAS et al., 1992). Sabe-se que, a diminuição de sua densidade está frequentemente associada à síndrome do olho seco em humanos e à CCS em cães (MOORE et al., 1987; RIVAS et al., 1992; MOORE et al., 2001).

Moore et al (2001) relataram a CCS como causa da diminuição das células calciformes em cães, reportando que o tratamento com CsA 2% resultou no aumento destas células, igualmente ao observado na aplicação das células tronco.

O local de eleição para quantificação de células calciformes é o fórnix conjuntival inferior, sabidamente o local de maior concentração destas células (MOORE et al., 1987; MOORE et al., 2001). Todavia pelo difícil acesso para a coleta em pacientes não submetidos à anestesia geral, optou-se pela coleta na região temporal da conjuntiva bulbar superior, que requer apenas anestesia tópica (BOLZAN et al., 2005).

O tempo de ruptura do filme lacrimal é utilizado para a avaliação funcional da mucina (MOORE et al., 1987; SAITO et al., 2001; BARABINO et al., 2004). Verificou-se, neste estudo, melhora significativa ao final das avaliações (112 dias), dado este associado à melhora significativa na quantidade de células calciformes e maior produção de mucina (MOORE et al., 1987; RIVAS et al., 1992; MOORE et al., 2001). Infere-se, também, que a maior densidade de células calciformes corroborou com a melhora no grau de impregnação da lissamina verde. Utilizando-se o padrão de avaliação descrito por Rivas et al. (1992) para o teste Rosa Bengala com a gradação em cruces (+, ++ e +++) observou-se o valor médio final inferior ao médio inicial. Como a lissamina cora células epiteliais desprovidas de mucina ou glicocálice, bem como células com a membrana lesionada, a sua menor impregnação indica menor quantidade de células desvitalizadas e melhor qualidade das células, associadas à maior produção de mucina, aspectos desejáveis e buscados no tratamento do olho seco (BARABINO et al., 2004; HAMRAH et al., 2011).

Por implicações éticas, não realizou-se procedimentos como a marcação das células-tronco e não foi feito uso de grupos controle, que necessitaria impor restrição medicamentosa a animais que apresentam sofrimento da superfície ocular.

Ademais, estudo anterior realizado por esta equipe avaliou os efeitos da aplicação das CTM provenientes da MO em animais hígidos, comprovando sua segurança e inocuidade.

CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos conclui-se que a terapia celular com o uso de fração de células mononucleares autógenas colaborou de forma benéfica e inédita no tratamento da ceratoconjuntivite seca canina. Se não trouxe melhora significativa nos resultados do teste lacrimal de Schirmer ao final do experimento, repercutiu em aumento do mesmo em alguns momentos avaliados. Este fato não fora ainda descrito em pacientes não responsivos aos imunomoduladores. No entanto a aplicação da fração de células mononucleares culminou em melhora considerável na quantidade de células calciformes conjuntivais, melhora no tempo de ruptura do filme lacrimal e melhora na qualidade da superfície ocular. Cabe ressaltar que houve um período significativo de melhora clínica, em pacientes com CCS crônica e os quais não faziam uso de lacrimoestimulantes, o que certamente é alentador nesta afecção. Sugere-se estudar a reaplicação do tratamento antes de seu declínio, em estudos futuros.

Desta forma, a FCM mostra-se uma opção promissora para o tratamento da CCS, que se instituída em quadros mais iniciais ou associada com terapia medicamentosa para o controle da ação imunomediada da doença, obtenha resultados superiores aos descritos neste estudo.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.L.; LAUS. J.L. Enfermidades da córnea de pequenos animais. Clínica Veterinária., n.12, p.34-39, 1997.

- ALMEIDA, D.E.; MAMEDE, F.V.; ORTIZ, J.P.D.; LAUS, J.L. Iatrogenic keratoconjunctivitis sicca in a dog. *Ciência Rural.*, v.34, n.3, p.921-924, 2004.
- ALMEIDA, D.E.; ROVERATTI, C.; BRITO, F.L.C.; GODOY, G.S.; DUQUE, J.C.M.; BECHARA, G.H.; LAUS, J.L. Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology.*, v.12, n.4, p.211–215, 2009.
- ANGÉLICO, G.T.; RANZANI, J.J.T.; BRANDÃO, C.V.S.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R.; SERENO, M.G.; CREMONINI, D.N. Transplante de glândulas salivares menores no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.63, n.5, p.1087-1092, 2011.
- BABER, S.R.; DENG, W.; MASTER, R.G.; BUNNELL, B.A.; TAYLOR, B.K.; MURTHY, S.N.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology.*, v.292, p.1120–1128, 2007.
- BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M.R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Experimental Eye Research.*, v.79, n.5, p.613-621, 2004.
- 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.
- BERDOULAY, A.; ENGLISH, R.V.; NADELSTEIN, B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology.*, v.8, n.4, p.225-232, 2005.
- BOLZAN, A.A.; BRUNELLI, A.T.J.; CASTRO, M.B.; SOUZA, M.A.; SOUZA, J.L.; LAUS, J.L. Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, v.8, n.6, p.401 – 405, 2005.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scandinavian Journal and Laboratory Investigation*, v.97, p.77-89, 1968.

- BRITO, F.L.C.; SILVA JÚNIOR, V.A.; MAIA, F.C.L.; PEREIRA JUNIOR, J.R.; LAUS, J.L. 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.
- BRUNELLI, A.T.J.; VICENTE, F.A.M.; CHAHUD, F.; ORIÁ, A.P.; BOLZAN, A.A.; CAMPOS, C.F.; DORIA NETO, F.A.; LAUS, J.L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.59, n.5, p.1194-1204, 2007.
- CASTANIA, V.A.; VOLPON, J.B. Integração do enxerto ósseo corticoesponjoso homólogo, tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno: estudo em cães. *Revista Brasileira de Ortopedia.*, v.42, n.6, p.173-180, 2007.
- CASTANHEIRA, P.; TORQUETTI, L.; NEHEMY, M.B.; GOES, A.M. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.*, v.71, n.5, p.644-650, 2008.
- CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; McCARVILLE, C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.4, p.215-225, 2005.
- DOHMANN, H.F.R.; PERIN, E.C.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUZA, A.L.S.; SILVA, G.V.; ASSAD, J.A.R.; ROSSI, M.I.D.; MESQUITA, C.T.; DOHMANN, H.J. Melhora sintomática e da capacidade de exercício após o transplante autólogo, transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sustentada até o sexto mês de evolução. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.*, v.84, n.5, p.360-366, 2005.
- 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, 2011, 83p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal).
- 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, 2011, Hilton Head., v. 14. p.606-622.

- GALERA, P.D.; YASUNAGA, K.L.; PEIXOTO, R.V.R. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação.*, v.8, n.25, p.456 – 459, 2010.
- 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 cyclosporine A therapy. *Cornea*, v.17, n.6, p.654-663, 1998.
- GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hematopoietic progenitors. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*, Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap.16, 91-96p.
- GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Oxford: Blackwell Publishing, 4ª ed., 2007. V.2, Cap.3, 633-661p.
- GORJUP, E.; DANNER, S.; ROTTER, N.; HABERMANN, J.; BRASSAT, U.; BRUMMENDORF, T.H.; WIEN, S.; MEYERHANS, A.; WOLLENBERG, B.; KRUSE, C.; BRIESEN, H. Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *European Journal of Cell Biology.*, v.88, p.409–421, 2009.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow–derived stem cells. *Stem Cells.*, v.22, p.487–500, 2004.
- GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J.R.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Brazilian Journal Cardiovascular Surgery.*, v.20, n.3, p.270 – 278, 2005.
- HAMRAH, P.; ALIPOUR, F.; JIANG, S.; SOHN, J.H.; FOULKES, G.N. Optimizing evaluation of Lissamine Green parameters for ocular surface Staining. *Eye.*, v.25, p.1429–1434, 2011.
- HERRERA, H.D.; WEICHSLER, N.; GÓMEZ, J.R.; JALÓN, J.A.G. Severe, unilateral keratoconjunctivitis sicca in 16 juvenile Yorkshire Terriers. *Veterinary Ophthalmology.*, v.10, p.285-288, 2007.
- HOWS, J. Adult stem cell therapy beyond haematopoietic stem cell transplantation? An update. *Transplant Immunology*, v.14, p.221-223, 2005.

- IZCI, C.; CELIK, I.; ALKAN, F.; OGURTAN, Z.; CEYLAN, C.; SUR, E.; OSKAN, Y. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *American Journal of Veterinary Research.*, v.63, p.688-693, 2002.
- KANG, B.J.; RYU, H.H.; PARK, S.S.; KOYAMA, Y.; KIKUCHI, M.; WOO, H.M.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science.*, v.13, n.3, p.299-310, 2012.
- KASWAN, R.L.; MARTIN, C.L.; CHAPMAN, W.L. Keratoconjunctivitis sicca: Histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28 canine cases. *American Journal of Veterinary Research.*, v.45, p.112-118, 1984.
- KASWAN, R.; PAPPAS, C. JR.; WALL, K.; HIRSH, S.G. Survey of canine tear deficiency in veterinary practice. *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, v.438, p.931 – 939, 1998.
- KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A. A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca treatment with ophthalmic cyclosporine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.*, v. 20, n. 3, 1990.
- KÖRBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplantation.*, v.32, p.23-24, 2003.
- 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.
- MAHMOOD, A.M.D.; LU, D.; LU, M.; CHOPP, M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with Intravenous Administration of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Neurosurgery.*, v.53, n.3, p.697-703, 2003.
- MARTINS, D.B.; LOPES, S.T.A.; FRANÇA, R.T. Cinomose Canina – Revisão de Literatura. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, n.2, p.68-76, 2009.
- MASSUMOTO, C.M.; MIZUKAMI, S.; CAMPOS, M.F.; SILVA, L.A.G.; MENDRONE JR., A.; SAKASHITA, A.; ZAMBON, E.; OSTRONOFF, M.; MACEDO, M.C.A.;

- MEDEIROS, R.; DORLHIAC, P.; CHAMONE, D.; DULLEY, F. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. *Revista da Associação Médica Brasileira.*, v.43, n.2, p.93-98, 1997.
- MILJANOVIC, B.; DANA, R.; SULLIVAN, D.A.; SCHAUMBERG, D.A. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of live. *American Journal of Ophthalmology.*, v.143, p.409-415, 2007.
- MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V.; MAJORS, L.J.; COLLIER, L.L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, v.28, p.1925-1932, 1987.
- MOORE, C.P.; MCHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. Effect of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, v.42, n.3, p.653-659, 2001.
- MORGAN, R. V.; ABRAMS, K. L. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association.*, v.199, n.8, p.1043-1046, 1991.
- MÜLLER, D.C.M. **Correção de ruptura de ligamento cruzado em cães com implante de polipropileno associado à fração total de células mononucleares.** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2010. 120p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).
- NAGAYA, N.; FUJII, T.; IWASE, T.; OHGUSHI, H.; ITOH, T.; UEMATSU, M.; YAMAGISHI, M.; MORI, H.; KANGAWA, K.; KITAMURA, S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, v.287, p.2670-2676, 2004.
- NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology.*, v.133, n.1, p. 37-47, 2005.
- NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.*, v.110, n.10, p.3499-3506, 2007.

- OLIVERO, D.K; DAVIDSON, M.G.; ENGLISH, R.V.; NASISSE, M.P.; JAMIESON, V.E; GERIG, T.M. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 199, p. 1039-1042, 1991.
- OLIVEIRA, G.K. **Células – tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; MARTINS, D.B.; TOGNOLI, G.K.; JÚNIOR, E.B.S.; MÜLLER, D.C.; LOPES, S.T.A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P.D.; TEIXEIRA, L.V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. *Ciência Rural*, v.39, n.1, 2009.
- ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, N.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. v. 410, p.701 – 705, 2001.
- OTERO, R.M.; GUIMARÃES, A.G.; COELHO, P.M.P.; FREITAS, G.R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.*, v.31(Supl. 1), p.99 – 103, 2009.
- RAO, S.N. Topical Cyclosporine 0,05% for the prevention of dry eye disease progression. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v.26, n.2, 2010.
- RIBEIRO, A.P.; BRITO, F.L.V.; MARTINS, B.C.; MAMEMDE, F.; LAUS, J.L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.568-575, 2008.
- RIVAS, L.; OROZA, M.A.; ANTONIO PEREZ-ESTEBAN, A.; MURUBE-DEL-CASTILLO, J. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.*, v.230, p.329-334, 1992.
- ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, n.21, p.105-110, 2003.

- RORIG, M.C.L. **Uso de pimecrolimus 0,5% no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães.** Curitiba: UFP, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2009. 72p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- RYU, H.H.; KANG, B.J.; PARK, S.S.; KIM, Y.; SUNG, G.J.; WOO, H.M.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science.*, v.74, n.12, p.1617-1630, 2012.
- SAHLI, E.; HOSAL, B.M.; ZILELIOGLU, G.; GÜLBAHÇE, R.; ÜSTÜN, H. The effect of topical Cyclosporine A on clinical findings and cytological grade of the disease in patients with dry eye. *Cornea*, v.29, n.12, 2010.
- SAITO, A.; IZUMISAWA, Y.; YAMASHITA, K.; KOTANI, T. The effect of third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs. *Veterinary Ophthalmology.*, v.4, n.1, p.13-18, 2001.
- SALBEGO, F.Z. **Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea.** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2010. 211p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).
- SANCHEZ, R.F.; INNOCENT, G.; MOULD, J.; BILLSON, F.M. Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases. *Journal of Small Animal Practice.*, v.48, p.211-217, 2007.
- SANSOM, J.; BARNETT, K.C.; NEUMANN, W.; SCHULTE-NEUMANN, A.; CLERC, B.; JEGOU, J.P.; HAAS, V.; WEINGARTEN, A. Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical Field Trial. *Veterinary Record*, v.137, n.11, p.504-507, 1995.
- SCOTTI, S.; KLEIN, A.; VANORE, M.; HIDALGO, A.; FAYOLLE, P.; MOISSONNIER, P. A new surgical method for the control of the epiphora in dogs: modified parotid duct transposition. *Journal of Small Animal Practice.*, v.48, n.5, p. 279 – 282, 2007.
- SHENG, Z.; FU, X.; CAI, S.; LEI, Y.; SUN, T.; BAI, X.; CHEN, M. Regeneration of functional sweat gland-like structures by transplanted differentiated bone

- marrow mesenchymal stem cells. *Wound Repair and Regeneration.*, v.17, p. 427–435, 2009.
- SMITH, R. E. Tear Film Complex: Pathogenesis and Emerging Therapies. *Córnea.*, v.24, n.1, p.1-7, 2005.
- SOUSA, M.G.; PAULINO-JUNIOR, D.; PASCON, J.P.E.; PEREIRA-NETO, G.B.; CARARETO, R.; CHAMPION, T.; CAMACHO, A.A. Cardiac function in dogs with chronic Chagas cardiomyopathy undergoing autologous stem cell transplantation into the coronary arteries. *The Canadian Veterinary Journal.*, v.52, p.869-874, 2011.
- THOMAS, P.B.; SAMANT, D.M.; ZHU, Z.; SELVAM, S.; STEVENSON, D.; WANG, Y.; SONG, S.W.; MIRCHEFF, A.K.; SCHECHTER, J.E.; YIU, S.C.; TROUSDALE, M.D. Long-term topical cyclosporine treatment improves tear production and reduces keratoconjunctivitis in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v.25, n.3, p.285-291, 2009.
- TOGNOLI, G.K.; OLSSON, D.C., MARTINS, D.B., JÚNIOR, E.B.S., SALBEGO, F.Z., OLIVEIRA, G.K., BRAGA, F.V.A., RAISER, A.G., DEZENGRINI, R., CRUZ, F.S.F., CASTRO, M.B., ROSA, M.C., CARREGARO, A.B., PIPPI, N.L. Isolamento, quantificação e viabilidade da fração total de células mononucleares da medulla óssea em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 28, 2007, Florianópolis. Anais... Porto Alegre: Acta Scientiae Veterinariae, 2007. V.35, p.228-230.
- TOGNOLI, G.K. **Autotransplante da fração mononuclear da medula óssea em úlcera corneana por hidróxido de sódio experimental em cães.** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- TOGNOLI, G.K.; OLSSON, D.C., MARTINS, D.B., JÚNIOR, E.B.S., SALBEGO, F.Z., OLIVEIRA, G.K., BRAGA, F.V.A., RAISER, A.G., DEZENGRINI, R., CRUZ, F.S.F., CASTRO, M.B., ROSA, M.C., CARREGARO, A.B., PIPPI, N.L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. *Ciência Rural*, v.39, n.1, p.148-155, 2009.
- TREICHEL, T.L.E. **Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas**

cutâneas experimentais de coelhos. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2010 66p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária).

- TYNDALL, A.; UCCELLI, A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplantation.*, v.43, p.821–828, 2009.
- VAQUERO, J.; ZURITA, M.; OYA, S.; SANTOS, M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats. Systemic or local administration? *Neuroscience Letters*, v.398, p.129-134, 2006.
- VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P.; PINHO-FILHO, J.A.; MOTA, A.; ALMEIDA, A.J.G.; CARVALHO, C.; CARVALHO, H.G.; OLIVEIRA, A.D.; SANTO, R.R. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária á doença de Chagas. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia.*, v.82, n.2, p. 181 - 184, 2004.
- WESTERMEYER, H.D.; WARD, D.A.; ABRAMS, K. Breed predisposition to congenital alacrima in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.12, n.1, p.1-5, 2009.
- WILLIAMS, D. L. Use of punctal occlusion in the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Journal of Small Animal Practice.*, v.43, p.478 – 481, 2002.
- WILLIAMS, D.L.; PIERCE, V.; MELLOR, P.; HEATH, M.F. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *Journal of Small Animal Preactice.*, v.48, n.5, p.252-256, 2007.
- WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Veterinary Clinics Small Animal Practice.*, v.38, p.251-268, 2008.
- WOOD, J.A.; CHUNG, D.J.; PARK, S.A.; ZWINGENBERGER, A.L.; REILLY, C.M.; LY, I.; WALKER, N.J.; VERNAU, W.; HAYASHI, K.; WISNER, E.R.; CANNON, M.S.; KASS, P.H.; CHERRY, S.R.; BORJESSON, D.L.; RUSSELL, P.R.; MURPHY, C.J. Periocular and intra-articular injection of canine adipose-derived mesenchymal stem cells: an in vivo imaging and migration study. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics.*, v.28, n.3,p.307-317, 2012.
- ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Scientiae Veterinariae.*, v.35 (Supl 2), p.289 - 290, 2007.

- 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.
- ZHUO, W.; LIAO, L.; FU, Y.; XU, T.; WU, W.; YANG, S.; TAN, J. Efficiency of endovenous versus arterial administration of mesenchymal stem cells for ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *Transplantation Proceedings.*, v.45, n.2, p.503-510, 2013.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos recentes ainda não conseguiram estabelecer um tratamento efetivo para ceratoconjuntivite seca canina. Apesar do grande avanço alcançado com a introdução dos imunomoduladores, não raro apresentam-se animais não responsivos a este tratamento. A utilização da terapia celular vem crescendo a cada dia, impulsionada pelos resultados encorajadores em várias doenças.

Não obstante valendo-se dos seus efeitos imunomoduladores e de reparação tecidual, a CCS canina tem na terapia celular uma alternativa promissora. Mediante os resultados encontrados neste estudo verifica-se o efeito positivo da enxertia da fração de células mononucleares na região periglandular, repercutindo sobre melhora em parâmetros clínicos como o tempo de ruptura do filme lacrimal e o teste de lissamina verde. Além do aumento na quantidade média de células caliciformes conjuntivais.

Mais estudos são necessários, abordando aspectos como novas enxertias em pacientes crônicos; a utilização da terapia com fração de células mononucleares em mais casos com a CCS no início das manifestações clínicas; a utilização de células-tronco mesenquimais cultivadas e expandidas ou das células-tronco mesenquimais diferenciadas em tecido glandular. Estes questionamentos já fazem parte do direcionamento de estudos futuros.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A ceratoconjuntivite seca é uma doença caracterizada pela diminuição da produção lacrimal. Os principais sinais clínicos relacionados a doença são: hiperemia conjuntival, secreção ocular de mucosa a purulenta, desconforto ocular, fotofobia, pigmentação corneal, edema de córnea, ceratite ulcerativa dentre outras. Em casos severos a CCS pode levar a perda da visão.

O seu tratamento é realizado com lacrimoestimulantes, medicamentos utilizados para a melhoria da produção lacrimal, fazem parte deste grupo o tacrolimus e a ciclosporina; lacrimomiméticos, medicamentos que mimetizam a lágrima sendo chamados de lágrimas artificiais; anti-inflamatórios e antibióticos.

O tratamento com lacrimoestimulantes é o único tratamento reconhecido pela Food and Drug Administration como capaz de aumentar a produção lacrimal. No entanto, o tratamento é apenas paliativo, ou seja, a doença não apresenta cura, a utilização da medicação é realizada visando à melhora dos sinais clínicos e conforto ao paciente.

Há paciente onde a doença apresenta-se em estado muito avançado, fato este que causa severos danos a estrutura das glândulas produtoras de lágrima; sendo assim, a utilização da medicação lacrimoestimulante não apresentará os efeitos desejados.

A utilização das células - tronco vem ganhando espaço na medicina humana e veterinária. A sua utilização para a CCS não encontra restrições e em estudos prévios não foram encontrados quaisquer efeitos colaterais decorrentes da obtenção das células - tronco através da punção da medula óssea no osso esterno, bem como da sua aplicação na glândula da terceira pálpebra.

Diante de tais esclarecimentos eu _____
_____, portador do CPF _____, autorizo o meu cão (cadela) _____ da raça _____ a participar do experimento de mestrado do aluno Rômulo Vitelli Rocha Peixoto do programa de Saúde Animal (FAV-UnB). Estou ciente e autorizo eventual sedação/anestesia para obtenção das células - tronco mediante punção de medula óssea e posterior aplicação na terceira pálpebra.

Brasília, _____ de _____ de 2012