

SILVIA DANIELA RAMOS

**Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa
para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães**

São Paulo
2016

SILVIA DANIELA RAMOS

Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Dra. Graciela Conceição Pignatari

São Paulo
2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3260
FMVZ

Ramos, Sílvia Daniela
Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães / Sílvia Daniela Ramos. -- 2016.
53 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dra. Graciela Conceição Pignatari.

1. KCS. 2. Ceratoconjuntivite seca. 3. Cães. 4. Células-tronco. 5. Membrana amniótica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães", protocolado sob o nº 3122/2013, utilizando 2 (dois) cães, sob a responsabilidade da Dra. Graciela Conceição Pignatari, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Cell therapy using amniotic membrane stem cell in the treatment of Keratoconjunctivitis Sicca in dogs", protocol number 3122/2013, utilizing 2 (two) dog, under the responsibility Dra. Graciela Conceição Pignatari, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 19 de maio de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904/8359
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RAMOS, Silvia Daniela

Título: Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os animais que já passaram pela minha vida, aos que ainda não chegaram, aqueles que passarão e aos que jamais eu tenha visto, agradeço pelo maravilhoso fato de existirem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Coordenadores do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade cedida para participar deste seleto grupo de estudantes.

Agradeço a Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga por ter me aceito junto a seus orientados.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia pela paciência e ajuda.

A toda direção desta distinta faculdade.

A todos os dedicados funcionários desta faculdade, onde recebi excelente e atencioso tratamento.

Aos colegas de Pós-Graduação, que junto a mim trilharam esse caminho.

Em especial, agradeço a Dra. Graciela Conceição Pignatari, minha Orientadora, que mesmo sem me conhecer, esteve disposta a me guiar desde o começo, compartilhando sua experiência e mostrando muita paciência para comigo.

“As pessoas esquecerão o que você disse, as pessoas esquecerão o que você fez...mas elas nunca esquecerão...como você as fez sentir.”

Chico Xavier

RESUMO

RAMOS, S. D. **Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães.** [Cell Therapy using amniotic membrane stem cell to treat keratoconjunctivitis sicca in Dogs]. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A Ceratoconjuntivite Seca (KCS – *Keratoconjunctivitis Sicca*) é uma desordem imunomediada e resulta de alterações do componente aquoso do filme lacrimal e da deficiência dos componentes lipídicos e mucoso. Seu diagnóstico é baseado no Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) e no Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) e tem como sinais clínicos: secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, blefaroespasmos, fotofobia, incômodo, dor, vascularização, opacidade corneana e pigmentação, além de cegueira em casos avançados. O tratamento convencional consiste em aplicações diárias de Ciclosporina 0,2% ou Tacrolimus 0,03% (pomada ou colírio oftálmicos), que apesar de controlar a doença, são custosos, não curativos e exigem alto comprometimento da interação paciente-proprietário. A terapia celular usando células-tronco (CT) traz uma nova esperança para doenças sem tratamento efetivo. Neste trabalho utilizamos CT mesenquimais (CTM) obtidas a partir de membrana amniótica (CTMA) de cães obtidas a partir do descarte destes tecidos em campanhas de castrações em diferentes tempos gestacionais, sem formação tumoral quando submetidas ao teste tumorigênico durante 60 dias. Dois animais com KCS crônica foram tratados com duas injeções de CTMA com intervalo de 30 dias, sendo a primeira de $0,5 \times 10^6$ células e a segunda de 1×10^6 células em cada glândula. Na segunda semana após a terapia foi observado aumento da TLS sugerindo um benefício da terapia que foi diminuindo com o passar das semanas. O TRFL oscilou durante os testes e não apresentou diferenças significativas. A terapia celular utilizando CTMA de cães melhorou a condição ocular nos dois casos em momentos e parâmetros variados, com repercussão na melhoria da superfície, mas não houve regressão do quadro clínico. Investigações futuras em estágios menos avançados da doença podem ajudar a elucidar os mecanismos pelos quais esse efeito foi obtido.

Palavras-chave: KCS. Ceratoconjuntivite seca. Cães. Células-tronco. Membrana amniótica.

ABSTRACT

RAMOS, S. D. **Cell therapy using amniotic membrane stem cell to treat keratoconjunctivitis sicca in dogs.** [Células-tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães.]. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Keratoconjunctivitis Sicca (KCS) is an immune-mediated disorder and results from changes in the aqueous component of the tear film and also from the impairment of lipid and mucous components. Diagnosis is based on Lacrimal Schirmer Test (LST) and Tear Film Break Test (TFBT) and its clinical signs: purulent discharge, conjunctival hyperemia, blefaroespasm, photophobia, discomfort, pain, vascularization, corneal opacity and pigmentation, addition of blindness in advanced cases. The standard treatment consists of daily applications of 0.2% cyclosporin or tacrolimus 0.03% (ophthalmic ointment or drops), that in spite of controlling the disease are expensive, require the patient does not curative and and require greater involvement of the patient-owner interaction. Cell therapy using stem cells (SC) brings new hope for diseases without effective treatment. In this work we used CT mesenchymal cells (MSCs) obtained from dog's amniotic membrane (AMSC) in the capanhas of castration at different times gestacionai without tumor formation tumorigenic when subjected to the test during 60 days. Two animals with chronic KCS were treated with two injections of CTMA with 30-day intervals, the first of which 0,5x10⁶ cells and the second of 1x10⁶ cells in each gland. In the second week after therapy was an increase in LST that has been decreasing over the weeks. The BTTF fluctuated during testing and no significant differences. Cell therapy using AMSC dogs improved the eye condition in both cases at times and different parameters, with consequent improvement in ocular surface but there was no regression of the clinical picture. Future research in less advanced stages of the disease may help to elucidate the mechanisms by which this effect was obtained.

Keywords: KCS. Keratoconjunctivitis sicca. Dogs. Stem cells. Amniotic membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do sistema lacrimal do cão.....	15
Figura 2 - Esquema ilustrativo do Filme Lacrimal Pré-corneal.....	19
Figura 3 - Esquema simplificado do processo inflamatório na KCS.	22
Figura 4 - Imagem fotográfica dos olhos das caninas 1 e 2 antes da injeção de células-tronco de membrana amniótica.....	36
Figura 5 - Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas testados com lissamina verde 7 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.....	37
Figura 6 - Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas 14 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica	38
Figura 7 - Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas 21 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.....	39
Figura 8 - Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas lavados e testados com fluoresceína (TRFL) 30 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica	40
Figura 9 - Imagem fotográfica do olho direito da canina 1 e esquerdo da canina 2 após 7 dias da segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica	41
Figura 10 - Imagem fotográfica da canina 1 após 40 dias da segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica	43
Figura 11 - Imagem fotográfica da canina 2 após 40 dias da segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Avaliação oftálmica das caninas antes da primeira injeção de células-tronco de membrana amniótica.....	35
Quadro 2 - Avaliação oftálmica das caninas 7 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.....	37
Quadro 3 - Avaliação oftálmica das caninas 14 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.....	38
Quadro 4 - Avaliação oftálmica das caninas 21 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.....	39
Quadro 5 - Avaliação oftálmica das caninas 30 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.....	40
Quadro 6 - Avaliação oftálmica das caninas 7 dias após segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica.....	41
Quadro 7 - Avaliação oftálmica das caninas 40 dias após segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA LACRIMAL DO CÃO	15
2.1.1	Filme Lacrimal Pré-corneal (FLP).....	17
2.2	CERATOCONJUNTIVITE SECA - KCS	19
2.2.1	Patogênese e fisiopatologia	21
2.2.2	Sinais Clínicos	23
2.2.3	Diagnóstico	24
2.2.4	Tratamento	26
2.3	CÉLULAS -TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA.....	28
3.	OBJETIVOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	ANIMAIS.....	32
4.2	CÉLULAS -TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA EM CÃES.....	33
4.3	TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NOS CÃES COM KCS	34
4.4	AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NOS CÃES COM KCS.....	34
5	RESULTADOS.....	35
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A Ceratoconjuntivite seca (KCS - *Keratoconjunctivitis Sicca*) é uma doença frequente e importante em cães caracterizada por inflamação crônica das glândulas lacrimais e definida habitualmente como uma diminuição na produção de lágrima (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Esta condição resulta geralmente de alterações quantitativas do componente aquoso do filme lacrimal, podendo ainda decorrer de deficiência dos componentes lipídicos e mucoso (LAUS, 2007). Na maioria das vezes, as causas podem não ser estabelecidas assumindo então, um caráter imunomediado (KASWAN et al., 1984; LAUS, 2007; FONSECA, 2011; GELLAT, 2013).

Há uma predisposição racial da KCS para Cocker, Bulldog inglês, West Highland, Pug, Yorkshire Terrier, Lhasa Apso, Schnauzer miniatura e ShihTzu, onde animais com mais de 6 anos de idade são os mais acometidos (GELATT, 2003; HERRERA, 2008; PEIXOTO, 2013).

Os sinais clínicos da KCS incluem: hiperemia conjuntival, blefaroespasmos, fotofobia, dor, opacidade da córnea acompanhada ou não de úlceras, perda do brilho da superfície da córnea, secreção mucopurulenta, vascularização e pigmentação variando com o grau de severidade (SANSOM et al., 1995; LAUS, 2007; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

O diagnóstico da KCS é baseado principalmente no TLS (Teste Lacrimal de Schirmer), mas outro teste como o TRFL podem complementar o diagnóstico.

Os sinais clínicos estão mais evidentes em animais com TLS abaixo de 10mm/minuto (WILLIAMS, 2008).

A terapia atual para controle da doença, pois ainda não há um tratamento curativo, consiste na utilização de imunomoduladores sendo os mais utilizados, a Ciclosporina A (CsA) (GELATT, 2003) e o Tacrolimus (WILLIAMS, 2008; GELATT, 2013). Alguns medicamentos como anti-inflamatórios, lacrimomiméticos, mucolíticos e antibióticos também são utilizados como associações ou para reversão dos quadros secundários ao ressecamento da superfície ocular (STADES, 1999; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; PIGATTO et al., 2008; GELATT, 2013).

Ainda, em casos onde a terapia medicamentosa não tem efeito, a alternativa pode ser cirúrgica como a realização da transposição do ducto parotídeo (STADES, 1999; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; GELATT, 2013), tarsorrafia parcial permanente ou bloqueio da puncta lacrimal (HERRERA, 2008; GELATT, 2013). Outras especulações terapêuticas incluem: óleo de linhaça por via oral (PINHEIRO *et al.*, 2007) acupuntura, uso de interferon-alfa (CARTER e COLITZ, 2002; GELLAT, 2013), além de transplantes autólogos da mucosa oral ou de glândula salivar submandibular (ROCHA, 2012; WOUK, 2013). A injeção de células-tronco também já foi considerada com sendo uma alternativa terapêutica para esta doença principalmente quando o tratamento paliativo não é efetivo (FONSECA, 2011; PEIXOTO, 2013).

A terapia celular utilizando células-tronco vem trazendo uma nova esperança de tratamento e a obtenção de células-tronco a partir de anexos embrionários, como a membrana amniótica utilizada neste trabalho são tecidos comumente descartados no momento do nascimento ou em campanhas de castração. As CTMA possuem características de células-tronco mesenquimais e grande potencial regenerativo e vem sendo aplicadas para a regeneração de tecidos (PAROLINI *et al.*, 2008; PAROLINI *et al.*, 2011).

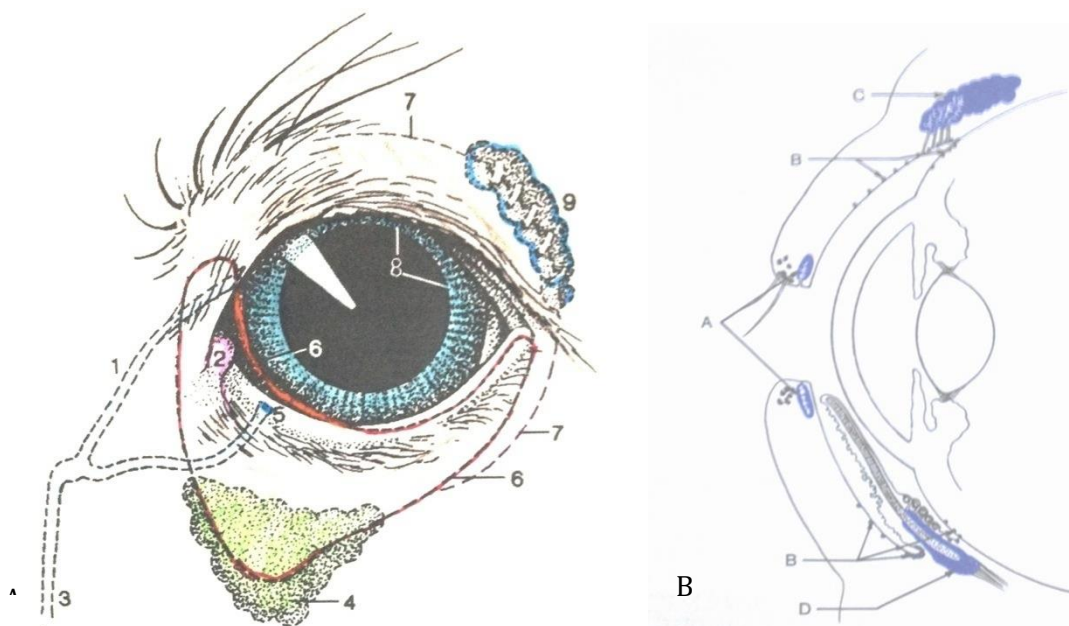
Antes mesmo da utilização das CTMA, a membrana amniótica livre de células já demonstrava importância na medicina regenerativa nas áreas de dermatologia e oftalmologia (SILINI *et al.*, 2013). Diversos usos terapêuticos têm sido atribuídos à membrana amniótica e aos seus diferentes tipos celulares, entretanto, muito pouco se sabe sobre a capacidade plástica e o uso de células-tronco de membrana amniótica de animais, já que a literatura a este respeito, não é tão ampla quanto à de humanos. Neste trabalho demonstramos que a utilização das CTMA no tratamento da KCS foi benéfica, mas não reverteu o quadro clínico inicial da doença e estudos utilizando animais em diferentes estágios da doença devem ser realizados com o objetivo de melhor entendimento desse potencial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA LACRIMAL DO CÃO

O sistema lacrimal, conforme figura 1, consiste basicamente em glândulas lacrimal e da terceira pálpebra, glândulas lacrimais e acessórias, filme lacrimal pré-corneal, filamentos mucosos, pontos e canalículos lacrimais e ducto nasolacrimal como demonstrado na Figura 1 (DYCE; WENSING; SACK, 1996; SLATTER, 2005).

Figura 1 - Anatomia do sistema lacrimal do cão



Fonte: A) Adaptado de DYCE, WENSING E SACK (1996); B) Adaptado de GELATT (2003).

Legenda: A) 1. Canalículo superior; 2. Carúncula lacrimal; 3. Ducto nasolacrimal; 4. Glândula da terceira pálpebra; 5. Ponto lacrimal; 6. Terceira pálpebra; 7. Posição do fórnix conjuntival; 8. Pupila; 9. Glândula lacrimal. B) A. Glândulas tarsais na placa tarsal; B. Células caliciformes conjuntivais; C. Glândula lacrimal orbitaria; D. Glândula da terceira pálpebra.

A glândula lacrimal (Figura 1) é achatada e tubuloalveolar e se encontra entre o bulbo ocular e a parede dorsolateral da órbita (DYCE; WENSING; SACK, 1996). No cão se situa abaixo do ligamento orbital e do processo supraorbital do osso frontal e está relacionada com a superfície medial do osso zigomático (SLATTER, 2005).

As glândulas lacrimais da órbita e da terceira pálpebra são tubuloacinares e histopatologicamente similares. No cão, três a cinco ductos da glândula lacrimal

orbitária se abrem no fórnix conjuntival dorsolateral, enquanto a glândula da terceira pálpebra libera as lágrimas aquosas na superfície corneana através de múltiplos ductos entre os folículos linfoides na terceira pálpebra póstero-central (GELATT, 2003).

As glândulas lacrimais acessória estão próximas as margens palpebrais e contribuem para o filme lacrimal pré-corneano compreendem em glândulas tarsais (originalmente de Meibonio), no cão são de 20 a 40 aberturas na margem palpebral.

As glândulas de *Moll* são glândulas sudoríparas modificadas que se abrem na margem palpebral próximo a margem dos cílios e as glândulas de *Zeis* são glândulas sebáceas rudimentares e modificadas, que se abrem no interior dos folículos que produzem os cílios (SLATTER, 2005). Até o momento, o significado funcional das glândulas de *Moll* e *Zeis* não estão bem descritos em animais.

Os pontos lacrimais são aberturas minúsculas de formato oval localizados na conjuntiva palpebral, nas bordas das pálpebras superior e inferior, 2 a 5mm do canto medial, próximos a carúncula, onde as glândulas tarsais terminam. Cada ponto leva a um canalículo curto e estreito, 4 a 7mm de comprimento e 0,5 a 1,0mm diâmetro, através do qual o líquido segue até o ducto nasolacrimal, este mais longo. O início do ducto nasolacrimal é levemente dilatado, formando o saco lacrimal, que ocupa uma fossa afunilada junto a margem óssea da órbita (DYCE; WENSING; SACK, 1996; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

O ducto nasolacrimal estende-se rostralmente, primeiro na parede da maxila, em seguida sobre sua superfície interna, onde é revestido por mucosa nasal. Em algumas espécies termina na narina e em outras, mais profundamente na cavidade nasal (DYCE, 1996).

Os pontos nasais são usualmente localizados no meato nasal ventrolateral, o qual se abre aproximadamente 1,0cm para dentro das narinas externas. Em aproximadamente 50% dos cães, o ducto nasolacrimal tem uma segunda abertura na mucosa oral do palato duro central, atrás dos incisivos, no nível dos dentes caninos. O ducto nasolacrimal tem por volta de 1mm de diâmetro mas essa medida varia consideravelmente entre os cães braquicefálicos, mesocefálicos e dolicocefálicos (GELLAT, 2013).

Movimentos de piscar distribuem o líquido lacrimal sobre a parte exposta do olho, superfície ocular, que é então, mantida úmida; as lágrimas removem substâncias estranhas e nutrem a córnea. O líquido sempre repellido pela secreção gordurosa das glândulas tarsais ao longo da borda das pálpebras, acumulam-se normalmente no

ângulo medial do olho, na chamada fossa lacrimal, uma depressão rasa que circunda a carúncula lacrimal, antes de ser removido por ação capilar para o sistema de ductos, através dos pontos lacrimais (DYCE; WENSING; SACK, 1996).

O sistema de ducto nasolacrimal tem como objetivo drenar as lágrimas da superfície ocular para as passagens nasais, onde 60% é drenado através dos pontos e canálculos inferiores (GELATT, 2003).

O líquido lacrimal escorre pela face apenas quando produzido em quantidades excessivas (lacrimejamento) ou quando a drenagem normal encontra-se prejudicada, por exemplo, uma obstrução (DYCE; WENSING; SACK, 1996; SLATTER, 2005).

2.1.1 Filme Lacrimal Pré-corneal (FLP)

A película lacrimal que banha o olho recobrando a córnea e a conjuntiva é denominada filme lacrimal pré-corneal ou pré-ocular e é constituída por três camadas, que diferem entre si em sua composição e tem cerca de 7 μ m de espessura (SLATTER, 2005). É um fluido trilaminar complexo constituído de componentes lipídico, aquoso e mucoso, como pode ser observado na Figura 2.

A camada superficial externa ou lipídica superficial tem cerca de 1 μ m e é composta de materiais oleosos e fosfolípidos provenientes das glândulas tarsais (meibonianas) e de Zeis. Ela fornece uma cobertura oleosa para a camada lacrimal aquosa retardando e/ou limitando a evaporação e promovendo a distribuição estável das lágrimas sobre a córnea e liga o FLP a córnea nas margens palpebrais prevenindo o extravasamento por sua tensão superficial alta (SLATTER, 2005; GELATT, 2013).

A camada média ou aquosa possui cerca de 7 μ m (GELATT, 2003) e é o componente de maior quantidade na lágrima, derivada das glândulas lacrimal e da terceira pálpebra e constituída de água (predominantemente), eletrólitos, glicose, uréia, polímeros de superfície ativos, glicoproteínas e proteínas lacrimais, incluindo lactoferrinas e algumas proteínas séricas. Proteínas lacrimais primárias incluem globulinas (IgA), albumina e lisozima. As funções desta camada são: remover material estranho e bactérias do saco conjuntival; lubrificar a passagem das pálpebras e da terceira pálpebra sobre a córnea; fornecer meio para a transferência de oxigênio

atmosférico, atrair células inflamatórias (por influências quiomiotáticas durante a inflamação), produzir anticorpos (Imunoglobulina A, IgA) para a córnea e remover os metabolitos provenientes desta camada; além de fornecer uma superfície lisa a córnea para ótima eficiência óptica; agir como fonte de substâncias antibacterianas, tais como imunoglobulinas, lactoferrinas e lisozimas (SLATTER, 2005).

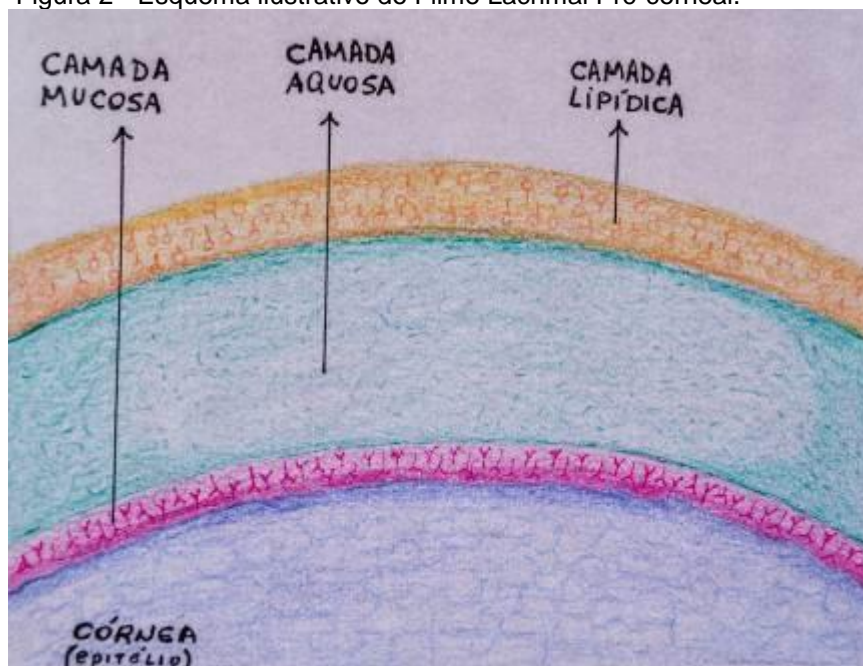
A camada lacrimal mais profunda ou camada mucóide interna tem a espessura de 1 a 2µm e é constituída de mucina, que é uma glicoproteína hidratada produzida pelas células caliciformes conjuntivais, que no cão, tem sua maior densidade no fórnix conjuntival (GELATT, 2003; SLATTER, 2005) e realiza uma função de eficiência óptica, pois preenche qualquer irregularidade da superfície corneana (SLATTER, 2005). As mucoprotéínas apresionam bactérias e partículas estranhas e ainda, a mucina ancora imunoglobulinas e lisozima além de auxiliar na lubrificação e na hidratação da conjuntiva e da córnea.

É sabido que essas camadas estratificam-se sobre a superfície corneana e desempenha importantes funções como a lubrificação, proteção e nutrição (lembrando que a córnea é uma estrutura avascular); portanto, a diminuição do FLP implica em desnutrição corneal significativa, assim como representa barreira imunológica devido as suas imunoglobulinas e enzimas. A lágrima, ou seja, o FLP também mantém a córnea úmida e limpa (HERRERA, 2008; STADES, 1999).

A falha na produção normal de qualquer um dos componentes do FLP leva a anormalidades que são classificadas basicamente como quantitativas quando há insuficiência no componente aquoso ou qualitativas quando há disfunções nos componentes lipídicos ou mucoide.

Os efeitos de anormalidades na quantidade ou qualidade do FLP comprometem sua função, levando a diversos eventos como: hipertonicidade do filme lacrimal remanescente; desidratação dos epitélios conjuntival e corneano; hipóxia do epitélio corneano e do estroma subepitelial; ausência de lubrificação e irrigação por atrito das pálpebras e terceira pálpebra; aumento do número de microorganismos e muco na superfície ocular e nas pálpebras; inflamação secundária da conjuntiva e córnea com vascularização estromal e posterior pigmentação; formação de úlceras corneanas (SLATTER, 2005).

Figura 2 - Esquema ilustrativo do Filme Lacrimal Pré-corneal.



Fonte: Ramos, S. D. (2015)

2.2 CERATOCONJUNTIVITE SECA - KCS

A ceratoconjuntivite seca (CCS ou KCS) pode ser encontrada na literatura por diversas nomenclaturas como: doença ou síndrome do olho seco, xeroftalmia, síndrome da disfunção lacrimal e deficiência do filme lacrimal. Ela é descrita como uma doença ocular comum e importante nos cães e se caracteriza por inflamação crônica das glândulas lacrimais, córnea e conjuntiva, que decorre de alterações do FLP (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERERRA, 2008; GELATT, 2013).

A KCS pode ser definida como a secura ou ressecamento de pequenas ou de grandes áreas da córnea e/ou da conjuntiva e por isso, não é uma ceratite primária, apesar de suas principais manifestações serem produzidas diretamente sobre a córnea (STADES, 1999; HERERRA, 2008). Apesar da KCS ser associada a uma simples deficiência do componente aquoso da lágrima é sabido que, frequentemente, a doença resulta de uma disfunção na dinâmica entre secreção, retenção, distribuição e drenagem da lágrima (LAUS, 2007).

A incidência da KCS encontra-se entre 1 e 3,3% (KASWAN, 1990; PIGATTO et al., 2007), porém Williams (2008) refere uma prevalência de 35% entre 460 cães

acometidos. Animais com mais de 7 anos são mais propensos a doença, assim como determinadas raças são predispostas, dentre elas: Buldogue inglês, West Highland, Pugs, Cockers, Yorkshire Terriers, Pequines, Schunauzer, Lhasa Apso, ShihTzu, Samoieda, Cavalier King Charles spaniel e Poodle (KAWAN, 1990; SANSOM et al., 1995; GELLAT, 2003; SLATTER, 2005; LAUS, 2007; SLATTER, 2005).

Ausência ou redução do FLP podem resultar de um único problema ou da combinação de condições. as causas conhecidas de KCS no cão são variadas e apesar de seu desenvolvimento relacionar-se com vários processos, a sua etiologia pode ainda assim não ser estabelecida, assumindo um caráter imunomediado (STADES, 1999; LAUS, 2007). Esse fato ainda pode ser fundamentado nas respostas clínicas apresentadas após tratamento com imunomoduladores (SANSOM, 1995; WILLIAMS, 1999) e em estudos histológicos (MOORE, 2001; FONSECA, 2011; PEIXOTO, 2013).

As causas conhecidas são: congênita, possivelmente hereditária (racial) como por exemplo: a hipoplasia acinar; traumáticas: devido a glândulas ou áreas próximas ou de suas inervações; Iatrogênicas como por exemplo a retirada da glândula da terceira pálpebra protruída e radioterapia local para neoplasias da cabeça; deficiências nutricionais como hipovitaminose A; intoxicações como por exemplo porastrágalo, beladona, botulismo; medicações como a fenazopiridina, os derivados de sulfa e a atropina; glândula da terceira pálpebra protruída não corrigida; doenças metabólicas como: hipotireoidismo, *diabetes mellitus* e hiperadrenocortisismo; dacrioadenopatia ou dacrioadenite imunomediada; vírus da cinomose canina; blefaroconjuntivite crônica; inflamação e infecção do aparato lacrimal; neoplasias locais ou adjacentes; doenças autoimunes e degenerativas como a Síndrome de Sjogren, síndrome da disautonomia, adenite plasmocitária e linfocítica e poliartrites (STADES, 1999; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; LAUS, 2007; HERRERA, 2008).

A síndrome de Sjogren está frequentemente associada com exocrinopatias autoimunes poliglândulares como hepatite crônica, distúrbios intestinais, seborréia entre outras. Esses pacientes podem apresentar também poliartrites, alergia e hipotireoidismo. Em muitos cães com KCS, o ressecamento ocular está associado com seborreia ou atopia, e inclusive alguns casos foram positivos ao fator reumatóide. Dados estes achados, a maioria dos casos de KCS canina é considerada como sendo autoimune e esta alteração deve ser considerada uma síndrome (HERRERA, 2008).

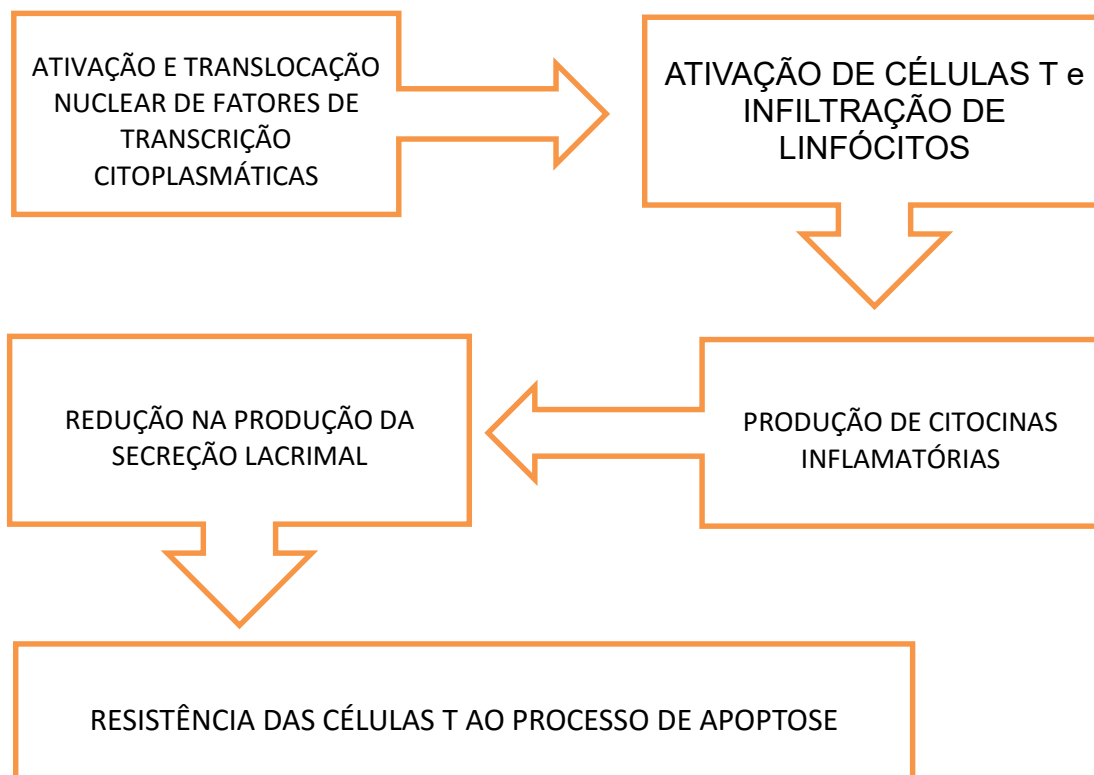
2.2.1 Patogênese e fisiopatologia

Todas as formas de olhos secos são caracterizadas por uma variação de grau de inflamação da glândula lacrimal. De fato, a inflamação é chave para o mecanismo de dano celular corneano e da conjuntiva, que é responsável por muitos sintomas e sinais da doença. Aspectos imunológicos da glândula lacrimal, como a perda da homeostase imunológica local pode levar ao KCS.

A glândula lacrimal normalmente possui uma pequena população de células imunoregulatórias, linfócitos T (com uma proporção de 2:1 de células CD8+(supressores) /CD4+ (helper)) e uma matriz limitada de células dendríticas, macrófagos e células B. A regulação funcional da glândula lacrimal é dependente do balanço entre as células T-supressoras e T-helper. Em cães saudáveis, as células supressoras (CD8+) estão em maior quantidade já em cães com KCS foi observado um maior número de células T *helper*. Gao et al., 2008 relata que os linfócitos T-*helper* (CD4+) agora em maior quantidade passam a atacar as células da glândula lacrimal orbitária e da terceira pálpebra desencadeando um processo inflamatório que leva a diminuição da produção lacrimal (GAO et al., 2008). Ainda, a ativação das células imunes na infiltração inflamatória libera citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas dos tipos IL-1 e IL-6 por exemplo, o que leva a destruição da arquitetura secretora da glândula e disfunção dos tecidos que continuam vivos, assim contribuindo para uma diminuição significativa na produção do fluido, induzindo os sintomas e sinais da KCS (BARABINO; DANA, 2007; STEVENSON; DANA, 2012), conforme Figura 3.

A apoptose é um processo fisiológico normal na glândula lacrimal e corpos apoptóticos são processados por macrófagos e células dendríticas presentes da célula T CD4+. Esse processo é controlado por andrógenos e estrógenos, o que mantém baixo o nível de apoptose. Estudos em animais mostraram que a diminuição nos hormônios sexuais induzido por ovariosalpingoesterectomia podem desencadear apoptose da glândula lacrimal, assim como infiltração linfocítica, enquanto o tratamento com andrógenos e estrógenos parecem desempenhar um papel de manutenção de estrutura e função da glândula lacrimal (BARABINO; DANA, 2007).

Figura 3 - Esquema simplificado do processo inflamatório na KCS.



Fonte: Ramos, S. D. (2015) adaptado de Stevenson; Chauhan; Dana, 2012.

Cães portadores de KCS apresentam infiltrado mononuclear com variável grau de fibrose glandular, além de grandes áreas de ácinos não funcionais nas glândulas, lacrimal orbitária e da terceira pálpebra (PEIXOTO et al., 2013).

A xerose ou seja, o ressecamento causa uma conjuntivite purulenta, com infiltração difusa de tecidos subconjuntivais por neutrófilos e linfócitos. Inicialmente é superficial e, logo seguida por ceratite profunda onde há vascularização e infiltração mista de células inflamatórias do estroma corneano. Como também pode ocorrer formação de úlceras corneanas e até exposição da membrana de Descemet (SLATTER, 2005).

A ausência ou a redução das secreções lacrimais acarretam em diversos prejuízos na superfície ocular, quando a redução se dá pela porção aquosa descreve-se que a deficiência é quantitativa, enquanto alterações nas porções lipídica ou mucosa são descritas como deficiência qualitativa (GELATT, 2003; 2013; LAUS, 2007; HERERRA, 2008).

A maioria dos casos são considerados idiopáticos e ligados a diminuição da porção aquosa da lágrima associada a doença imunomediada (STADES, 1999; PIGATTO et al., 2007).

2.2.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da KCS irão variar pelo tempo inicial da doença e da extensão ou grau do ressecamento ocular. Em ordem cronológica, os sinais clínicos da KCS são: opacidade corneana; hiperemia conjuntival; muco espesso, filamentosos e que se adere a conjuntiva e a córnea em fios filamentosos; epífora, edema e injeção de vasos episclerais em alguns casos; eritema; narina ipsilateral seca; exsudato dessecados ao redor das margens palpebrais; incomodo e dor também são relatados (STADES, 1999; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; LAUS, 2007; GELATT, 2013).

Na fase inicial é possível notar olhos vermelhos com muco intermitente ou secreção mucopurulenta que com o passar do tempo a córnea perde o brilho se tornando opaca, a conjuntiva fica extremamente hiperêmica e há uma grande persistência da secreção mucopurulenta. Se não tratada de forma correta neste período ela evolui para uma ceratite progressiva caracterizada por extensa vascularização e pigmentação corneal que se agrava ainda mais podendo ou não ocorrer ulcerações (GELATT, 2013).

Com a progressão da doença, o nível de desconforto se intensifica resultando em blefaroespasmos persistente. Na KCS crônica, o epitélio corneano é hiperplásico, queratinizado com depósitos de melanina em todo epitélio e estroma anterior, epitélio basal ondulado e estroma anterior cheio de vascularização (GELATT, 2003; 2013). O dano persistente na superfície ocular acaba levando a cegueira (HERRERA; LAUS, 2007).

A ceratite pigmentar é uma manifestação comum na KCS e blefarites, assim como dermatites perioculares podem ocorrer com frequência (GELATT, 2003) podendo ainda em casos graves haver perfurações corneanas e endoftalmite (SLATTER, 2005).

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da KCS é realizado com base nos sinais clínicos e nos resultados do TLS (Teste Lacrimal de Schirmer) e pode ser feito de duas maneiras sem ou com o uso de anestesia tópica, chamado respectivamente de TLS I e TLS II. O TLS I mede a habilidade do olho de produzir lágrimas reflexas além das secreções basais e é o mais comumente utilizado, enquanto o TLS II estima somente a secreção lacrimal basal. Tanto os valores do TLS I quanto os do TLS II são significativamente diferentes nos cães normais (GELATT 2003 ; 2013).

O TLS é realizado a partir do posicionamento de uma fita de papel filtro padronizada e milimetrada no fórnix conjuntival durante um minuto a fim de mensurar a umidade em milímetros por minuto. A produção lacrimal normal em cães varia entre 15-25mm/min. Pacientes com valores entre 11-15mm/min são considerados suspeitos, inicial ou subclínica (associadas aos sinais clínicos); valores de 6-10mm/min são considerados portadores de grau leve a moderado já os que possuem valores inferiores a 5mm/min, são considerados graves (GELATT, 2003 ; 2013; LAUS, 2007).

Geralmente a produção de lágrimas pelas glândulas lacrimais é inadequada, ou seja, a quantidade da fração aquosa do FLP é reduzido, os valores do TLS são normalmente baixos. Se o valor for normal ou abaixo do normal e ainda assim houver sinais clínicos consistentes, o uso dos corantes vitais (rosa bengala, lissamina verde e flurosceína) e o auxílio de biomicroscopia com lâmpada de fenda, podem ser de grande valia diagnóstica adicional (STADES, 1999).

O corante de Rosa bengala e o de Lissamina verde coram células conjuntivais desvitalizadas por xerose (SLATTER, 2005). Outros testes diagnósticos muito utilizados para o diagnóstico da KCS são o Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) ou BUT (*Break up time*) e o fio com Vermelho Fenol (HERRERA, 2008).

O TRFL é o tempo que o FLP apresenta pontos de ressecamento logo após a instilação de uma gota de flurosceína (as pálpebras precisam ser mantidas abertas) e o tempo médio normal varia entre 15 a 20 segundos (HERRERA, 2008; GELATT, 2013).

O teste com o Vermelho Fenol consiste na aplicação deste fio embebido com vermelho fenol, o qual é um indicador de pH, o fio deve ser colocado no fórnix conjuntival inferior e permanecer durante 20 segundos, observando a quantidade de fio

que muda da coloração vermelha para a amarela, o que decorre da alcalinidade lacrimal e o valor normal é ao redor de 35mm (HERRERA, 2008).

Casos problemáticos de KCS podem ocorrer, os quais o volume aquoso parece adequado e outras causas reconhecidas tenham sido excluídas como irritação, infecção, piscar não efetivo. Nesses casos, deficiências qualitativas da lágrima por anormalidade no componente lipídicos e/ou mucosos devem ser causas primárias ou contribuintes da afecção (GELATT, 2003).

Cães com distúrbios da camada lipídica do FLP (produto das glândulas tarsais ou meibonianas) e da camada de mucina (produto das células caliciformes conjuntivais), podem mostrar sinais clássicos de KCS e no entanto, apresentar o TLS dentro da variação de normalidade (GELATT, 2013).

A perda resultante da cobertura oleosa normal permite a dispersão prematura da camada aquosa (evaporação). Além disso, a produção insuficiente de mucina pré-ocular também resulta na perda da estabilidade do FLP, com subsequente ressecamento corneano (GELATT 2003 , 2013).

Cães com seborréia generalizada também podem produzir quantidades insuficientes de lipídeos pelas glândulas meibonianas. Ao afetar as junções mucocutâneas, as doenças autoimunes como lúpus eritematoso e bolhoso pênfigóide pode afetar as margens palpebrais e as secreções meiboianas (GELATT, 2013).

Todos os pacientes com a doença devem ter o perfil hematológico completo e bioquímico sérico realizados para avaliar efeitos sistêmicos de doenças concomitantes autoimunes relacionadas, tais como diabetes melito, hipotireoidismo, hipoadrenocortisismo, poliartrite e polimiosite, artrite reumatoide e distúrbios cutâneos imunomediados (SLATTER, 2005).

2.2.4 Tratamento

A terapia medicamentosa é o meio primário de se tratar a KCS e deve ser ajustada para cada paciente (GELLAT, 2003; 2013). Utilizar lacrimomiméticos, anti-inflamatórios, antibióticos e mucolíticos é sugestão da maioria dos autores consultados para tratar quadros secundários ao ressecamento da superfície ocular.

O objetivo do tratamento medicamentoso na KCS é particular para o tipo utilizado como: estimular a secreção normal (ciclosporina, pilocarpina, tacrolimus; substituir o FLP com lubrificantes (mucinas sintéticas, lágrimas artificiais contendo polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, metilcelulose, ácido poliacrílico, ácido hialurônico e condroitina); controle da infecção e inflamação secundária (antibióticos e anti-inflamatórios tópicos); remoção do excesso de muco (acetilcisteína); inibir a colagenase nas lesões ulcerativas (acetilcisteína, EDTA dissódico, soro sanguíneo autólogo ou heterólogo) e impedir os mecanismos autoimunes (ciclosporina, tacrolimus, pimecrolimus) (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

Por causa da inervação parassimpática das glândulas lacrimais, drogas colinérgicas como por exemplo, a pilocarpina ainda são utilizadas para estimular a secreção lacrimal. Além da administração tópica de 2%, a administração oral da solução oftálmica a 1 ou 2% pode ser usada na comida, onde as doses são aumentadas até que sinais de reação sistêmica (salivação, vômitos, diarreia, taquicardia) se desenvolvam (GELATT, 2003, 2013). Entretanto, Sllater (2005) sugere que a medicação tópica é mais efetiva e não apresenta os efeitos adversos sistêmicos da pilocarpina oral. Já GELATT (2013) declara que estudos recentes em cães normais indicaram que a pilocarpina administrada topicamente não é significativa para a produção lacrimal, e que, por isso, há dúvidas na eficácia da terapia com essa medicação. Além disso, a pilocarpina tópica pode causar blefaroespasmos, hiperemia conjuntival e miose. E em alguns casos, os efeitos irritativos são suficientes para que o tratamento seja interrompido.

Os lacrimomiméticos ou substitutos da lágrima contêm ingredientes para repor um ou mais componentes da lágrima e estão comercialmente disponíveis hoje em várias especificações com diversos intuitos (GELATT, 2013).

Lubrificantes viscosos aumentam a capacidade de umedecer a superfície ocular e estende o tempo de contato do FLP com a córnea. Polímeros lineares como o dextran

e o polivinilpirrolidona tem propriedades mucinomiméticas também. Substâncias viscoelásticas com essas propriedades incluem o hialuronato de sódio, sulfato de condroitina e metilcelulose a 1 ou 2% (GELATT, 2003).

Em relação aos agentes lacrimomiméticos, estes podem ser associados com o uso de imunomoduladores, como a Ciclosporina A. Alguns estudos realizados em cães, nos quais foi avaliado a utilização do ácido hialurônico, demonstraram que sua utilização produz uma boa estabilização do FLP, embora sem aumentar sua quantidade. No entanto, podem ser de grande utilidade em casos onde já não existe glândula que possa responder aos estimulantes lacrimais ou nos casos de alacrimia congênita (HERRERA, 2008).

Atualmente, como ainda não há um tratamento curativo para o controle da doença e o tratamento consiste na utilização de imunomoduladores como a Ciclosporina A (CsA) (GELATT, 2003) e o Tacrolimus (WILLIAMS, 2008; HENDRIX, 2011, GELATT, 2013, GIULIANO, 2013). A Ciclosporina (CsA) vem demonstrando efeitos notórios na produção lacrimal e o Tacrolimus assim como o Pimecrolimus vem sendo avaliados. Entretanto, dados atuais têm demonstrado que o Tacrolimus apresenta resultados similares aos da Ciclosporina A (CsA- HERRERA, 2008; GELATT, 2013). Tanto a CsA um medicamento isolado do fungo *Tolypocladium inflatum* Gams, quanto o Tacrolimus (FK506) um antibiótico macrolídeo produzido através do *Streptomyces tsukubaensis*, inibem a ativação das células T pela inibição da expressão do gene da Interleucina 2 (IL-2) nos linfócitos T-helper CD4+ (GELATT, 2013) e foram inicialmente desenvolvidos para uso sistêmico na prevenção de rejeição de pacientes que receberam transplantes de órgãos.

Apesar de encontrarmos resultados positivos e rápidos com o uso do tacrolimus 0,03%, alguns estudos recentes (SWINGER et al., 2009; DREYFUS et al., 2011; NEVILE et al., 2015) relatam que o uso prolongado e/ou associado de imunomoduladores com antibióticos e corticóides podem predispor a infecções da córnea e conjuntiva e até mesmo estar relacionado com o desenvolvimento primário de carcinoma de células escamosas. Dados de Dreyfus et al. (2011) mostraram que 16 de 21 cães tinham uma história de tratamento com a terapia imunossupressora tópica (ciclosporina ou tacrolimus) no momento do diagnóstico.

Em casos onde a terapia medicamentosa não surte efeito existe a possibilidade de intervenções cirúrgicas como a transposição do ducto parotídeo (STADES, 1999;

GELATT, 2003; SLATTER, 2005; GELATT, 2013), a tarsorrafia parcial permanente ou bloqueio da puncta lacrimal (HERRERA, 2008; GELATT, 2013).

Além disso, outras especulações terapêuticas incluem: óleo de linhaça (PINHEIRO et al., 2007), acupuntura, uso de interferon-alfa (ENGLISH; GILGER, 2013), além de transplantes autólogos da mucosa oral ou de glândula salivar submandibular (ROCHA, 2012; CASTANHO et al., 2013) e aplicações de células-tronco (FONSECA, 2011; PEIXOTO, 2013).

Como a terapia celular utilizando células-tronco é uma opção para o tratamento de doenças que não tem tratamento efetivo como é o caso da KCS onde são realizados apenas tratamento paliativo com colírios ou pomadas com efeitos imunomoduladores para o controle da doença. O tratamento de KCS com efeito benéfico, mas sem reversão já foi demonstrado utilizando células-tronco autóloga de medula óssea no local da lesão (PEIXOTO, 2013). Nesse trabalho foi utilizado células-tronco mesenquimais obtidas da membrana amniótica com grande potencial regenerativo e imunomodulador.

2.3 CÉLULAS - TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Como relatado anteriormente, as células-tronco mesenquimais vem sendo vistas como uma nova esperança de tratamento de doenças cujo tratamento convencional não é efetivo como o caso da KCS onde apenas cuidados paliativos podem ser realizados.

Células-tronco mesenquimais isoladas de diferentes fontes foram isoladas e se mostraram bastante interessantes e diferentes das primeiras obtidas a partir da medula óssea. Anexos embrionários como cordão umbilical, membrana amniótica, placenta, saco vitelino (animais) e do alantóide de material abortivo em humanos ou animais (CAPLAN, 2005; CAPLAN; BRUDER, 2001), comumente descartados no momento do nascimento ou em campanhas de castração se tornaram muito interessantes para a coleta de células-tronco com grande potencial regenerativo e características de células-tronco mesenquimais. Além disso, o procedimento para obtenção desses tecidos não

é invasivo e não tem implicações éticas como as encontradas quando pensamos no isolamento a partir de embrião.

Como relatado anteriormente antes mesmo da utilização das CTMA como alternativa terapêutica convém ressaltar que a membrana amniótica livre de células já demonstrava importância na medicina regenerativa nas áreas de dermatologia e oftalmologia (SILINI et al., 2013). Na oftalmologia, a membrana amniótica foi utilizada a primeira vez como um curativo para a reconstituição ocular, como no caso de doenças cicatriciais da córnea e conjuntiva (GOMES et al., 1999). Estes transplantes mostraram-se eficazes na reconstrução da superfície ocular, uma vez que a membrana amniótica possui uma combinação única de propriedades, incluindo a facilitação na migração de células epiteliais, o reforço da adesão celular basal e o incentivo a diferenciação epitelial (SANGWAN et al., 2007). Além disso, a membrana amniótica livre de células foi primeiramente utilizada no tratamento de queimaduras dermais, úlceras indolentes e feridas traumáticas (SINGH et al., 2004). Atualmente, a membrana livre de células vem sendo utilizada na oftalmologia como enxerto para reparo de defeitos de córnea, conjuntiva e bulbo, além da aplicação em incisões cirúrgicas realizadas em cirurgias oftálmicas corretivas (KRUSE; CURSIEFEN., 2008).

Em resumo, a membrana amniótica (MA) representa a mais interna das duas membranas fetais que circundam o feto durante gestação e tem origem a partir do ectoderma embrionário devido ao dobramento do folheto. Ela que rodeia o embrião/feto como uma segunda membrana avascular, sendo que a primeira, o córion, membrana mais externa, mais espessa e vascularizada. As duas juntas formam a membrana corio-amniônica conhecida como “bolsa” (MOORE; PERSAUD, 2005) e tem a função de manter o feto dentro do líquido amniótico protegendo de impacto e impedindo sua dessecação e permitindo com que ele cresça sem distorção ou pressão de sua estrutura (OKAZAKI et al., 1981). No cão, o período normal de gestação é de 58-64 dias, sendo muito comum este período ser em torno de 63 dias (JACKSON, 2005). Histologicamente é composta pelo epitélio amniótico formado por uma camada única de células cubóides e colunares e pela mesoderme amniótica composta por uma rede de células mesenquimais e alguns macrófagos dispersos. (PAROLINI et al., 2009; MIKI; GRUBBS, 2014).

As células-tronco provenientes de membrana amniótica são classificadas como células-tronco adultas (CTA) ou células-tronco pós-natais ou fetais. Em cães, as

primeiras células-tronco obtidas a partir da membrana amniótica foram isoladas em 2011 (URANIO et al. 2011). No ano seguinte um outro grupo também isolou (Park et al., 2012) células-tronco de membrana amniótica de cães. Entretanto, o primeiro grupo a isolar células-tronco de membrana amniótica foi em humanos (SONCINI et al., 2007; PAROLINI et al., 2008) e em seguida, em ratos (MARCUS et al., 2008).

As células obtidas deste tecido não induzem a formação de tumores ou infecções virais, e proporcionam um alto rendimento em cultura (SANT'ANNA et al., 2011; VERYASOV et al., 2014). Entretanto, convém ressaltar que duas linhagens obtidas a partir de úteros gravídicos de cães com 35 e 56 dias de gestação quando injetadas em camundongos imunossuprimidos levaram a formação de tumor (LIMA et al., 2012).

Células-tronco de membrana amniótica humana demonstraram propriedades regenerativas e imunomoduladoras liberam citocinas imunomoduladoras e anti-inflamatórias (IL-10, IL-6), fatores de crescimento associados com cicatrização de feridas, tais como fatores angiogênicos (VEGF, PDGF), e fatores de proliferação (fatores de crescimento epidermal, de hepatócitos e de fibroblastos) (PAROLINI et al., 2010; SILINI et al., 2013) semelhantes as CTM.

3. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo principal utilizar células-tronco da membrana amniótica de cães como terapia alternativa para o tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães com base nas propriedades regenerativas e imunomoduladoras destas células.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A terapia celular utilizando células-tronco de membrana amniótica de cães foi realizada em dois animais de espécie canina, de mesma raça e idade. A avaliação foi realizada baseada na interpretação dos sinais clínicos e testes oftálmicos rotineiros na clínica oftalmológica de pequenos animais, conforme descrição detalhada a seguir.

4.1 ANIMAIS

Dois animais de espécie canina, sexo feminino da raça *Golden Retriever* provenientes do canil da Faculdade de Medicina Veterinária com idade média de 7 anos e em grau crônico de KCS foram utilizados. Os animais foram selecionados conforme aprovação pelo comitê de ética CEUA/Vet nº 3122/2013. Convém ressaltar que as caninas utilizadas neste trabalho estavam em estágio crônico avançado da doença sem nunca ter recebido nenhum tratamento, nem mesmo paliativo anteriormente ao experimento.

Exames clínicos e testes oftálmicos como magnificação e iluminação; testes físicos de ameaça e movimento, Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Ophthalmos®, SP, BR) Teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) com corantes vitais (Fluoresceína e Lissamina Verde - Ophthalmos®) e tonometria para verificação da pressão intraocular (PIO) utilizando o equipamento Tono-Pen Avia® (Reichert, NY, USA) foram realizados na seleção para obter o quadro clínico atual antes da terapia celular.

4.2 CÉLULAS - TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA EM CÃES

As células-tronco de membrana amniótica foram obtidas utilizando o protocolo descrito em Winck et al. (2012). Em resumo, as membranas amnióticas de cães foram obtidas em campanhas de castração através do “Programa Permanente de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos no Município de São Paulo” do Centro de Controle de Zoonoses após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMVZ-USP. Os úteros gravídicos de um cão SRD foi coletado através da técnica de ovariosalpingohisterectomia após sedação dos animais. Terminada a coleta, os úteros foram transportados em gelo e tampão salina-fosfato até o Laboratório de Células-Tronco da FMVZ-USP, onde foram seccionados cirurgicamente para a retirada dos fetos e o material foi fotografado e mensurado pela técnica de Evans e Sack (1973). Os fetos utilizados nessa coleta tinham de acordo com esta técnica de mensuração 40 dias. Em seguida, membranas coletadas de diferentes fetos dentro do mesmo útero foram transferidas para um tubo cônico contendo tampão salina fosfato (PBS-Sigma-Aldrich, CA, USA) e 5% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (500U/mL de penicilina, 500µg/mL de estreptomicina e 1,25µg/mL de anfotericina Sigma-Aldrich) e, lavado extensivamente com PBS. As membranas foram digeridas com collagenase tipo I (Invitrogen, CA, USA) por 30min a 37°C em banho maria e cultivadas em meio DMEM *high* glicose (LGC Biotecnologia, SP, BR) contendo 20% de SFB (Invitrogen) e 1% de solução de antibiótico e antimicótico (100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina). Ao final, as células-tronco de membrana amniótica isoladas foram expandidas e caracterizadas previamente seguindo protocolos descritos em Lima (2012) e Winck (2012).

4.3 TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NOS CÃES COM KCS

As células foram expandidas e quando atingiram a confluência necessária foram lavadas por 3-5 vezes com tampão fosfato-salina, contadas e ressuspendidas em 0,05 mL de solução fisiológica (Equiplax, GO, BR). As CTMA foram injetadas nas glândulas lacrimais da terceira pálpebra dos dois olhos (direito e esquerdo) por duas vezes com intervalo de 30 dias. Na primeira injeção foram utilizadas $0,5 \times 10^6$ células em cada glândula e na segunda 1×10^6 células. Após o início do tratamento, os animais foram avaliados semanalmente por 70 dias. Esporadicamente as caninas foram tratadas com lacrimomimético (Lacrima® Plus Colírio - Alcon, SP, BR).

4.4 AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NOS CÃES COM KCS

Para avaliação do tratamento com as CTMA, os animais foram submetidos a exames clínicos e testes oftálmicos idênticos aos usados para inclusão dos animais sendo eles: magnificação e iluminação, testes de ameaça e movimento (oferecem uma noção de visão), TLS, TRFL com corantes vitais de Flurosceína e Lissamina Verde e tonometria para verificação da PIO utilizando Tono- Pen Avia®, levando em consideração que a PIO normal em ces tem variação de 10-20 mmHg.

A produção lacrimal normal em cães varia entre 15-25mm/min, valores entre 11-15mm/min são considerados suspeitos, inicial ou subclínica (associadas aos sinais clínicos); valores de 6-10mm/min portadores de grau leve a moderado e inferiores a 5mm/min, grave e serão avaliados pelo TLS. Para o teste TRFL foi considerado normal a adesão do corante na superfície ocular por no mínimo 20 segundos.

Os resultados obtidos foram expressos em grau de severidade, variando em uma escala de + à +++++, onde uma cruz (+) classifica como menos intenso, sendo + (leve), ++ (moderado), +++ (intenso) e +++++ (muito intenso). Os números de cada olho foram expressos com barra (/) da esquerda para a direita, representando o olho direito e o esquerdo, respectivamente.

5 RESULTADOS

Antes da injeção celular, os exames e testes oftálmicos confirmaram o padrão crônico característico de KCS como presença de secreção mucopurulenta; opacidade, leucomas e pigmentação corneana como também o TRFL e TLS muito abaixo da normalidade. O exame de fundoscopia não foi realizado por interferência de meios, ou seja, a opacidade das córneas examinadas não permitiram a visualização efetiva de lente, vítreo e retina. Todos os sinais foram observados em ambos os olhos, de ambos os animais em maior ou menor grau conforme descrito no Quadro 1 e visualizado na Figura 4.

Quadro 1 - Avaliação oftálmica das caninas antes da primeira injeção de células-tronco de membrana amniótica

Avaliação Oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD; Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	02/03	00/00
TRFL	4 seg AO	3 seg AO
Teste de Lissamina Verde	Impregnação difusa	Impregnação difusa
Aspecto das glândulas	Degeneração +++ AO	Degeneração++++ AO
PIO	11/13 mmHg	13/11 mmHg
Opacidade corneana	++OD +++OE	++++ AO
Pigmentação corneana	+++ AO	++++ AO
Vascularização corneana	+++ AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a ++++.

Figura 4 – Imagem fotográfica dos olhos das caninas 1 e 2 antes da injeção de células-tronco de membrana amniótica



Fonte: Ramos, S. D. (2014)

Legenda: A) olho direito da canina 1. B) olho esquerdo da canina 1. C) olho direito da canina 2. D) olho esquerdo da canina 2. E) Glândula lacrimal da terceira pálpebra da canina 1. F) Glândula lacrimal da terceira pálpebra da canina 2.

As caninas selecionadas e descritas acima foram submetidas ao tratamento com as CTMA e após 7 dias de tratamento não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros oftalmológicos. Entretanto, as conjuntivas das glândulas lacrimais destes animais se apresentaram com aspecto menos hiperêmico ao fim desse período (Quadro 2; Figura 5).

Quadro 2 - Avaliação oftálmica das caninas 7 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica

Avaliação oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	03/05	00/00
TRFL	2 seg AO	2 seg AO
Teste de Lissamina verde	Impregnação difusa AO	Impregnação difusa AO
Aspecto das glândulas	Degeneração: ++ AO	Degeneração: +++ AO
PIO	12/13 mmHg	13/13 mmHg
Opacidade corneana	++ OD +++ OE	++++ AO
Pigmentação corneana	+++ AO	++++ AO
Vascularização corneana	+++ AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a ++++.

Figura 5- Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas testados com lissamina verde 7 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica.



Fonte: Ramos, S. D. (2014)
Legenda: A) Canina 1. B) Canina 2.

Após 14 dias da terapia, ou seja, da primeira implantação das CTMA, os dois animais apresentaram aumento no TLS, sendo maior na Canina 1. Além disso, a secreção mucopurulenta reduziu nas duas caninas sendo mais predominante na Canina 2, quando analisadas proporcionalmente. Além disso, foi possível observar que a vascularização e a pigmentação não reduziram em nenhuma das caninas tratadas, mas a opacidade corneana teve redução sutil na Canina 1 (Quadro 3 e Figura 6).

Quadro 3 - Avaliação oftálmica das caninas 14 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica

Avaliação oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	09/09	00/01
TRFL	5 seg OD - 7 seg OE	5 seg OD - 7 seg OE
Teste de Lissamina Verde	Impregnação difusa AO	Impregnação difusa AO
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14 mmHg	12/09 mmHg
Opacidade corneana	++ OD - +++ OE	++++ AO
Pigmentação corneana	+++ AO	++++ AO
Vascularização corneana	+++AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a ++++.

Figura 6 – Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas 14 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica



Fonte: Ramos, S. D. (2015)

Legenda: A) Canina 1. B) Canina 2, com demonstração do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS).

Após 21 dias da implantação das CTs (Quadro 4), a quantidade da secreção continuava a mesma (Figura 7), porém houve uma redução em torno de 50% no TLS das duas caninas, proporcionalmente. Nenhuma mudança no aspecto das glândulas lacrimais da terceira pálpebra foi observada nesta fase.

Quadro 4 - Avaliação oftálmica das caninas 21 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica

Avaliação oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	04/05	00/00
TRFL	3 seg AO	3 seg AO
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14 mmHg	12/09 mmHg
Opacidade corneana	++OD +++ OE	++++ AO
Pigmentação corneana	+++ AO	+++ AO
Vascularização corneana	+++ AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a ++++.

Figura 7 – Imagem fotográfica dos olhos direitos das caninas 21 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica



Fonte: Ramos, S. D. (2014).

Legenda: A) Canina 1. B) Canina 2.

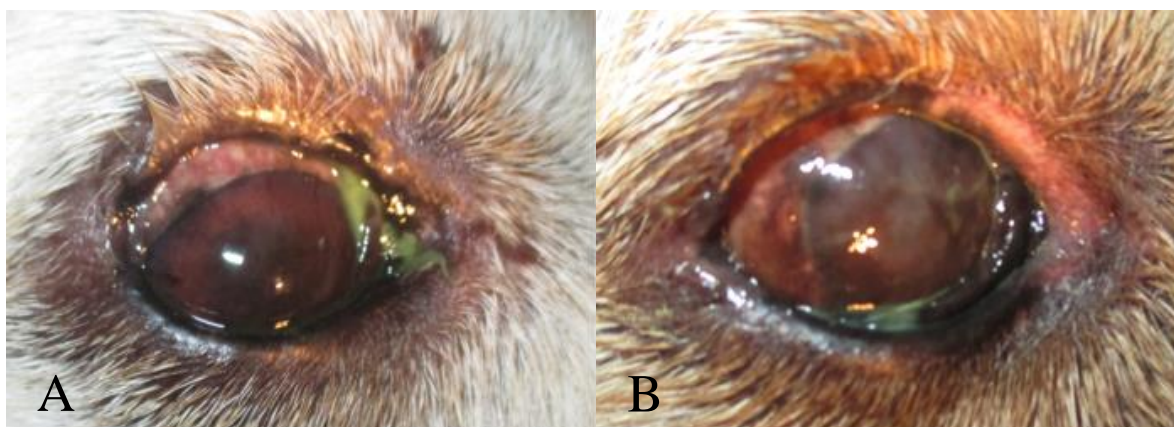
O exame oftalmológico 30 dias após implantação demonstrou que o TLS obteve valores iguais ao do início do estudo e as glândulas lacrimais da terceira pálpebra voltaram também ao seu aspecto inicial, ou seja, o que eram antes da implantação. No entanto, a pigmentação corneana encontrava-se menos homogênea nas duas caninas (Quadro 5; Figura 8).

Quadro 5 - Avaliação oftálmica das caninas 30 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica

Avaliação oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	04/05	00/00
TRFL	4 seg AO	4 seg AO
Teste de Lissamina Verde	Impregnação difusa AO	Impregnação difusa AO
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14 mmHg	12/09 mmHg
Opacidade corneana	++OD - +++OE	++++ AO
Pigmentação corneana	++ AO	++ AO
Vascularização corneana	+++ AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a ++++.

Figura 8- Imagem fotografica dos olhos direitos das caninas lavados e testados com fluoresceína (TRFL) 30 dias após o tratamento com células-tronco de membrana amniótica



Fonte: Ramos, S. D. (2014)

Legenda: A) Canina 1. B) Canina 2.

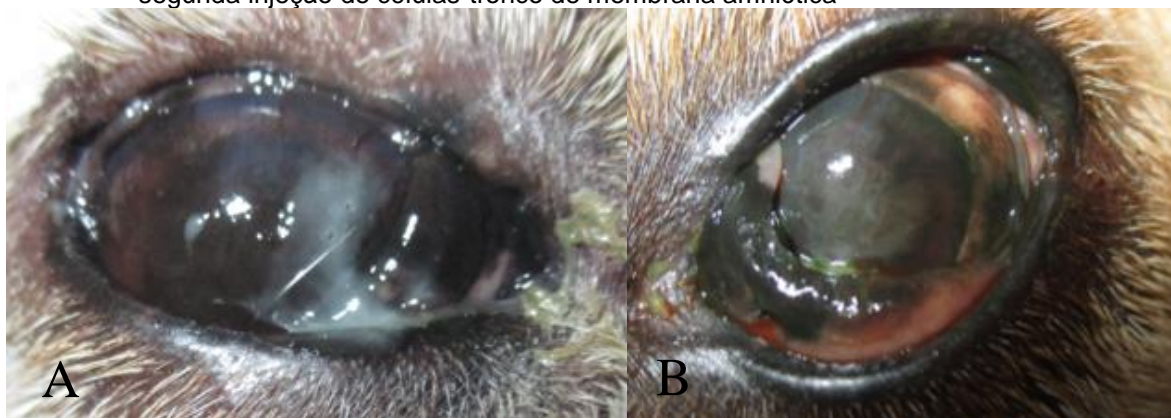
Nesta mesma ocasião, ou seja, 30 dias após o tratamento com as CTMA, uma nova injeção com cerca de um milhão de células foi realizada em cada glândula lacrimal da terceira pálpebra. Após 7 dias dessa nova injeção, foi observada uma redução no TLS da Canina 1, menos afetada. O TRFL também se apresentou reduzido nos dois olhos. A secreção mucopurulenta foi reduzida significativamente não retornando ao estágio inicial deste trabalho, principalmente na Canina 2, a mais afetada (Quadro 6; Figura 9).

Quadro 6 - Avaliação oftálmica das caninas 7 dias após segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica

Avaliação oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	02/03	00/00
TRFL	3 seg AO	3 seg AO
Teste de Lissamina Verde	Impregnação difusa AO	Impregnação difusa AO
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14 mmHg	12/09 mmHg
Opacidade corneana	Opacidade ++ OD +++OE	Opacidade ++++ AO
Pigmentação corneana	Pigmentação +++ AO	Pigmentação +++ AO
Vascularização corneana	+++ AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a +++.

Figura 9 – Imagem fotográfica do olho direito da canina 1 e esquerdo da canina 2 após 7 dias da segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica



Fonte: Ramos, S.D. (2015)

Legenda: A) Olho direito da canina 1. B) Olho esquerdo da canina 2.

Após a segunda aplicação, os animais foram monitorados semanalmente por aproximadamente 40 dias. O aspecto corneano dos animais como vascularização, pigmentação, leucomas e opacidade não se alteraram ao longo das últimas semanas em que foram submetidos aos exames oftálmicos. O TLS seguiu diminuindo após esse período e os demais testes permaneceram na média do que eram antes do experimento (Quadro 7). As figuras 10 e 11 representam os resultados obtidos após 40 dias da segunda injeção de CTMA respectivamente nas caninas 1 e 2.

Quadro 7 - Avaliação oftálmica das caninas 40 dias após segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica

Avaliação oftálmica	Canina 1	Canina 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
TLS	00/01	00/00
TRFL	3 seg AO	3 seg AO
Teste de Lissamina Verde	Impregnação difusa AO	Impregnação difusa AO
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14 mmHg	12/09 mmHg
Opacidade corneana	Opacidade ++ OD +++OE	Opacidade ++++ AO
Pigmentação corneana	Pigmentação +++ AO	Pigmentação +++ AO
Vascularização corneana	+++ AO	+++ AO

Legenda: AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular.
Escala da intensidade variando de + a +++.

Figura 10 – Imagem fotográfica da canina 1 após 40 da segunda injeção de células-tronco de membrana amniótica



Fonte: Ramos, S. D. (2014).

Legenda: A) Visão bilateral. B) olho direito. C) olho esquerdo.

Figura 11 – Imagem fotográfica da canina 2 após 40 dias da segunda injeção de células-tronco da membrana amniótica



Fonte: Ramos, S. D. (2014)

Legenda: A) Visão bilateral. B) olho direito (higienizado). C) olho esquerdo (higienizado).

6 DISCUSSÃO

A KCS é caracterizada como uma reação inflamatória imunomediada que leva à atrofia glandular e a diminuição de lágrimas. De acordo com Gao et al. (1998), o funcionamento da glândula lacrimal é associado e dependente do equilíbrio entre as células T supressoras e as células T helper, quando há o desequilíbrio (KCS) há diminuição no número de T supressoras e aumento das T helper que passam a atacar a glândula da terceira palpebra e a lacrimal orbitária desencadeando um processo inflamatório e a diminuição do filme lacrimal. Devido à este comportamento, a escolha de um tratamento utilizando células-tronco mesenquimais foi ainda baseado na sua capacidade imunomoduladora, no seu efeito parácrino e em suas propriedades regenerativas (CAPLAN et al, 2001; MEIRELLES et al., 2009).

O tratamento convencional dessa doença consiste na aplicação tópica de imunomoduladores que é bem aceita apesar de ser um tratamento paliativo, de uso contínuo, custo elevado e necessidade de colaboração ininterrupta do proprietário para manter a situação controlada (PIGATTO et al., 2008; THOMAS et al., 2009). Entretanto, o uso contínuo dos imunossupressores, como a Ciclosporina A e o tacrolimus pode ser um fator de risco para desenvolvimento primário de carcinoma de células escamosas na córnea (DREYFUS et al., 2011) e algumas vezes não responsivo.

Neste estudo tivemos como objetivo principal utilizar as CTMA como alternativa terapêutica para KCS canina em 2 (dois) animais nunca tratadas com lacrimoestimulantes, do sexo feminino, raça Golden Retriever, com aproximadamente 7 (sete) anos de idade. Não existe na literatura dados que indicam esta raça como uma raça predisposta a KCS, o que não necessariamente a exclui de ter a doença (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; LAUS, 2007; HERRERA, 2008; GELATT, 2013). A idade das caninas selecionadas está de acordo com a faixa etária descrita para o desenvolvimento da KCS (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; LAUS, 2007; HERRERA, 2008; GELATT, 2013). Apesar de termos em primeiro momento sugerido a inclusão de animais com KCS tratados com imunossupressores para serem utilizados como controles, esse procedimento não foi autorizado pelo comitê de

ética, pois os resultados obtidos com esses tratamentos já estão bem descritos na literatura (PIGATTO et al., 2008; THOMAS et al., 2009).

Além disso, a escolha da membrana amniótica como fonte para obtenção das células-tronco utilizadas neste trabalho se deu devido ao fato de que a membrana amniótica vem sendo bastante utilizada no tratamento de doenças oftalmológica na reconstrução do epitélio corneal e superfície ocular em pacientes com deficiência bilateral de células-tronco limbal demonstrando um grande potencial terapêutico e alternativa de tratamento utilizando este tecido que é comumente descartado ao nascimento ou em campanhas de castração (ANG et al. 2006; HIGA e SHIMAZAKI, 2008; MADHIRA et al. 2008; KANAYAMA et al. 2009; KLINGBEIL et al. 2010; SEN et al. 2011; HIRAYAMA et al. 2012; BARDAG-GORCE et al. 2015; SHETH et al. 2015; AMEMIYA et al. 2015).

O tratamento da KCS com as CTMA foi benéfico as caninas logo após sua injeção (14 dias após a primeira e 7 dias após a segunda) observando-se melhora na produção lacrimal através do teste de TLS que pode ser explicado devido aos efeitos parácrinos, imunomoduladores entre outros que já foram relatados para CTM e CTMA (CAPLAN et al; BILIC et al., 2008; PAROLINI et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009).

Efeitos benéficos utilizando células-tronco no tratamento de diversas doenças já foram relatados (FLOHR et al., 2009; MANUELPIILLAI et al., 2010; SHIMIZU et al.; 2012, Marx et al.; 2014; GIBBS et al., 2015; LAVORATO et al., 2016).

Além disso, CTMA liberam citocinas imunomoduladoras e anti-inflamatórias (IL-10, IL-6), fatores de crescimento associados com cicatrização de feridas, tais como fatores angiogênicos (VEGF, PDGF), e fatores de proliferação (fatores de crescimento epidermal, de hepatócitos e de fibroblastos) que as tornam de grande interesse para a terapia celular no tratamento de diversas doenças incluindo a KCS que foi aqui estudada (PARADOWSKA et al., 1997; STEED et al., 2008; PAROLINI, 2010).

A avaliação do perfil de expressão de citocinas também foi um aspecto levantado por nós, entretanto como o animal não produz ou produz em baixa quantidade de secreção lacrimal que poderia ser a fonte para extração de RNA já que o sangue não é a fonte mais indicada para tal, em um primeiro momento esse parâmetro não foi avaliado. A análise histológica também não foi solicitada uma vez que os animais encontravam-se em estágio crônico, não sendo recomendada a realização de uma biópsia desses animais.

A utilização de células-tronco medula óssea para o tratamento de KCS crônica canina e não responsivo a ciclosporina A também demonstrou melhora do quadro clínico com aumento de valores no TRLF, diminuição na impregnação de lissamina verde e classificou que a inflamação conjuntival foi reduzida após a terapia celular o que não foi observado após o tratamento com CTMA. Esse grupo ainda relatou que um dos animais selecionados apresentava um quadro clínico mais ameno e foi o mais responsivo e estável durante o tratamento com as células-tronco de medula óssea (PEIXOTO et al., 2013). Resultado esse que vem de encontro com os nossos achados onde sugerimos que o fato de que as duas caninas utilizadas nesse estudo encontravam em um quadro crônico avançado e nunca tiveram tratamento paliativo a glândula já se encontrava em um estado irreversível onde o tecido glandular dessas caninas já estava possivelmente muito atrofiado. Neste caso, estudos em caninas com estágio de menor cronicidade devem ser realizados com monitoramento do quadro inflamatório após a injeção celular.

7 CONCLUSÃO

A terapia celular utilizando CTMA proporcionou benefícios as caninas com KCS, pois mesmo não havendo reversão do quadro crônico da doença, no décimo quarto dia da primeira injeção de CTMA foi observado aumento na produção lacrimal bem como, o aspecto da conjuntiva da glândula lacrimal da terceira pálpebra e a secreção mucopurulenta foi diferenciado em alguns momentos durante o tratamento. O estágio de cronicidade das caninas utilizadas neste trabalho pode ter sido o fator limitante da irreversibilidade do quadro e estudos utilizando estágios menores de cronicidade devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ANG, L. P. K.; NAKAMURA T.; INATOMI T.; SOTOZONO C.; KOIZUMI N.; YOKOI N.; KINOSHITA, S. Autologous Serum-Derived Cultivated Oral Epithelial Transplants for Severe Ocular Surface Disease. **Archives of ophthalmology** v. 124, n. 11, p. 1543-1555, 2006.
- AMEMIYA, T.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, T.; KINOSHITA, S.; KANAMURA, N. Autologous Transplantation of Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets Cultured on an Amniotic Membrane Substrate for Intraoral Mucosal Defects. **Plos One** 10, 2015.
- BARABINO, S.; DANA, M. Dry eye syndromes. **Chemistry Immunology Allergy**. Basel, Karger, v. 92, p.176-184. 2007.
- BARDAG-GORCE F.; OLIVA J.; WOOD A.; HOFT R.; PAN D.; THROPAY J.; MAKALINAO A.; FRENCH, S. W.; NIIHARA Y. Carrier-free Cultured Autologous Oral Mucosa Epithelial Cell Sheet (CAOMECS) for Corneal Epithelium Reconstruction: a histological study. **The ocular surface**, v. 13, n. 2), p. 150-163, 2015.
- BILIC, G.; ZEISBERGER, S. M.; MALLIK, A. S.; ZIMMERMANN, R.; ZISCH, A. H. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy [abstract]. **Cell Transplantation**, v. 17, p. 955-968, 2008.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clinical Orthopedics*. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 1198-1211, 2005.
- CAPLAN, A. I; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, p. 259-264, 2001.
- CARTER, R.; COLITZ, C. M. H. The causes, diagnosis, and treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Medicine**, v.97, n.9, p.683-694, 2002.
- CASTANHO, L. S.; Moreira, H.; RIBAS, C. A. P. M.; WOUK, A. F. P. D. F.; SAMPAIO, M.; Giordano, T. Transplante de glândulas salivares labiais no tratamento de olho seco em cães pela autoenxertia. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 72, n. 6, p. 373-378, 2013.
- DREYFUS, J.; SCHOBERT, C. S.; DUBIELZIG, R. R. Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. **Veterinary ophthalmology**, v. 14, n. 3, p. 161-168, 2011.
- DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de anatomia veterinária**. Elsevier Brasil, 1997. Cap 9, p. 258-268.
- ENGLISH, R.; GILGER, B. C. Ocular Immunology. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. John Wiley & Sons, v. 2, cap. 5, p. 273-287, 2013.

EVANS H. E.; SACK W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FLOHR, T. R.; BONATTI, H. J.; BRAYMAN, K. L.; PRUETT, T. L. (2009). The use of stem cells in liver disease. **Current opinion in organ transplantation**, v. 14, n. 1, p. 64-71, 2009.

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 de cães**. 2011. 83p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, DF, 2011.

FONSECA, E. C.; ARRUDA, G.; ROCHA, E. M. Dry eye: etiopathogenesis and treatment. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.

GELATT, K. N. **Manual de oftalmologia veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2003. Cap. 4, p. 73-86.

GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. USA; John Wiley & Sons, 2013. Cap 16, v. 2, p. 912-932.

GIBBS, N.; DIAMOND, R.; SEKYERE, E. O.; THOMAS, W. D. Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: a case series. **Journal of pain research**, v. 8, p. 799, 2015.

GIULIANO, E. A. Diseases and surgery of the canine lacrimal secretory system. In:

GOMES, J. A. P.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N.; CHAVES, A. P.; CUNHA, M. C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias de reconstrução da superfície ocular nas Ceratoconjuntivites Cicatríciais - Resultados preliminares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.62, p.562-76, 1999.

HENDRIX, D. V.; ADKINS, E. A.; WARD, D. A.; STUFFLE, J.; SKOROBOHACH, B. (2011). An investigation comparing the efficacy of topical ocular application of tacrolimus and cyclosporine in dogs. **Veterinary medicine international**, v. 2011, p.2-6, 2011.

HERRERA, D. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. São Paulo; MedVet Livros: 2008, p.117-122.

HIGA, K.; SHIMAZAKI, J. Recent advances in cultivated epithelial transplantation. **Cornea**, v. 27, p. S41-S47, 2008.

HIRAYAMA, M.; SATAKE, Y.; HIGA, K.; YAMAGUCHI, T.; SHIMAZAKI, J. Transplantation of cultivated oral mucosal epithelium prepared in fibrin-coated culture dishes. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 53, n. 3, p. 1602-1609, 2012.

JACKSON, P. G. G. **Obstetrícia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 11, p. 10-11.

KANAYAMA, S.; NISHIDA, K.; YAMATO, M.; HAYASHI, R.; MAEDA, N.; OKANO, T.; TANO, Y. Analysis of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 secreted from cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets in vitro. **British Journal of Ophthalmology**, v. 93, n. 2, p. 263-267, 2009.

KASWAN R. L.; MARTIN C. L.; CHAPMAN W. L. JR. Keratoconjunctivitis sicca: histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28 dogs. **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, p. 583-613, 1990.

KLINGBEIL, M. F. G.; MATHOR, M. B.; GIUDICE, F. S.; YOSHITO, D.; DOS SANTOS PINTO JR, D. Is it safe to utilize in vitro reconstituted human oral epithelium? An oncogenetic pathway study. **Cell and tissue banking**, v. 13, n. 1, p. 27-35, 2012.

KRUSE, F. E.; CURSIEFEN, C. C. Surgery of the cornea: corneal, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation [abstract]. **Developments in Ophthalmology**, v. 41, p. 159-170, 2008.

LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. São Paulo: Roca: 2009. p. 77-82.

LAVORATO, V. N.; DEL CARLO, R. J.; DA CUNHA, D. N. Q.; OKANO, B. S.; BELFORT, F. G.; DE FREITAS, J. S.; CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 90, p. 111-119, 2016.

LIMA, Evander Bueno de. **Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão**. 2012. Tese (Dotourado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 2012.

MADHIRA, S. L.; VEMUGANTI, G.; BHADURI, A.; GADDIPATI, S.; SANGWAN, V. S.; GHANEKAR, Y. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Molecular vision**, v. 14, p. 189, 2008.

MANUELPILLAI, U.; TCHONGUE, J.; LOURENSZ, D.; VAGHJIANI, V.; SAMUEL, C. S.; LIU, A.; SIEVERT, W. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl4-treated mice. **Cell transplantation**, v. 19, n. 9, p. 1157-1168, 2010.

MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. Isolation, characterization and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, v. 76, p. 130-144, 2008.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; SELBACH, I.; DA SILVA, A. S.; BRAGA, L. M. G. D. M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B. (2014). Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. **Stem cells international**, v. 2014, 2014.

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 and Visual Science**, v. 42, p. 653-659, 2001.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia clínica**. 7. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 7, p. 131-165.

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

NEVILE, J. C.; HURN, S. D.; TURNER, A. G.; MCCOWAN, C. (2015). Management of canine corneal squamous cell carcinoma with lamellar keratectomy and strontium 90 plesiotherapy: 3 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 3, p. 254-260, 2015.

OKAZAKI, T.; CASEY, M. L.; OKITA, J. R.; MACDONALD, P. C.; JOHNSTON, J. M. Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 139, n. 4, p. 373-381, 1981.

PARADOWSKA, E.; BLACH-OLSZEWSKA, Z.; GEJDEL, E. Constitutive and induced cytokine production by human placenta and amniotic membrane at term [abstract]. **Placenta**, v. 18, p. 441-446, 1997.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILICI, G.; BUHRING, H. J.; EVANGELISTA, M. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

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

PAROLINI, O.; SONCINI, M.; EVANGELISTA, N.; SCHMIDT, D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? **Regenerative Medicine**, v. 4, n. 2, p. 275-291, 2009.

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**. 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, DF, 2013.

PINHEIRO JR, M. N.; SANTOS, P. M. D.; SANTOS, R. C. R. D.; BARROS, J. D. N., PASSOS, L. F.; CARDOSO NETO, J. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjögren. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 4, p. 649-55, 2007.

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

ROCHA, G. L. S. **Transplante autólogo das glândulas salivares labiais, oclusão cirúrgica dos pontos lacrimais ou associação das duas técnicas no tratamento da ceratoconjuntivite seca e cães**. 2012. 81 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG, 2012.

SANGWAN, V. S.; BURMAN, S.; TEJWANI, S.; MAHESH, S. P.; MURTHY, R. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. **Indian Journal Ophthalmol**, v. 4, n. 55, p. 251-60, 2007.

SANSOM, J. ; BARNETT K. C. ; NEUMANN, W. ; SCHULTE-NEUMANN, A. ; CLERC, B. ; JEGOU J. P. ; WEINGARTEN, A. Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical field trial. **The Veterinary Record**, v. 137, n. 20, p. 504-507, 1995.

SANT'ANNA, L. B.; CARGNONI, A.; RESSEL, L.; VANOSI, G.; PAROLINI, O. Amniotic Membrane Application Reduces Liver Fibrosis in a Bile Duct Ligation Rat Model. **Cell Transplantation**, v. 20, p. 441–453, 2011.

SEN, S.; SHARMA, S.; GUPTA, A.; GUPTA, N.; SINGH, H.; ROYCHOUDHURY, A.; MOHANTY, S.; NAG, T. C.; TANDON, R. Molecular characterization of explant cultured human oral mucosal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 13, 2011.

SHETH, R.; NEALE, M. H.; SHORTT, A. J.; MASSIE, I.; VERNON, A. J.; DANIELS, J. T. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on a fibrin gel for ocular surface reconstruction. **Current eye research**, n. 0, p. 1-11, 2014.

SHIMIZU, Y.; SHIBATA, R.; SHINTANI, S.; ISHII, M.; MUROHARA, T. Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells. **Journal of the American Heart Association**, v. 1, n. 4, p. e000877, 2012.

SILINI, A.; PAROLINI, O.; HUPPERTZ, B.; LANG, I. Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. **Current stem cell research & therapy**, v.8 n.1, 6-14, 2013.

SINGH, R.; CHOUHAN, U. S.; PUROHIT, S.; GUPTA, P.; KURNAR, P.; KUMAR, A. Radiation processed amniotic membranes in the treatment of non-healing ulcers of different etiologies. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 129-134, 2004.

SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2005. Cap.11, p. 283-338.

SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; ZORZI F.; DENEGRI, M.; ALBERTINI, A. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 296-305, 2007. STADES, F.C. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 6, p. 54-63.

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

STEVENSON, W.; CHAUHAN, S. K.; DANA, R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. **Archives of Ophthalmology**, v. 130, n. 1, p. 90-100, 2012.

SWINGER, R. L.; SCHMIDT JR, K. A.; DUBIELZIG, R. R. Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 1, p. 56-60, 2009.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular reproduction and development**, v. 78, n. 5, p. 361-373, 2011.

VERYASOV, V. N.; SAVILOVA, A. M.; BUYANOVSKAYA, O. A.; CHULKINA, M. M.; PAVLOVICH, S. V.; SUKHIKH, G. T. Isolation of mesenchymal stromal cells from extraembryonic tissues and their characteristics. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 157, n. 1, p. 119-124, 2014.

WILLIAMS, D. L. Histological and immunohistochemical evaluation of canine chronic superficial keratitis. **Research in Veterinary Science**, v. 67, p. 191-195, 1999.

WILLIAMS, D. L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 38, n. 2, p. 251-268, 2008.

WINCK, Caroline Pinho. **Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais**. 2012. 74p. Tese (Dotourado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 2012.