



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

**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**

STELLA ALVES DA FONSECA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**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**

STELLA ALVES DA FONSECA

ORIENTADORA: PAULA DINIZ GALERA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 041/2011

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2011

FICHA CATALOGRÁFICA

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.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 83p. Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Stella Alves da

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. / Stella Alves da Fonseca orientação de Paula Diniz Galera – Brasília, 2011. 83p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

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

CDU

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

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

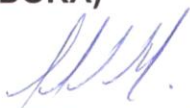
STELLA ALVES DA FONSECA

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:



PAULA DÍNIZ GALERA
(ORIENTADORA)



ANA CAROLINA MORTARI
(EXAMINADORA INTERNA)



ANA MARIA BARROS SOARES
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA/DF, 28 DE JUNHO DE 2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha avó.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Paula Diniz Galera, e à professora Concepta McManus.

Ao Victor e à Daiana, que me ajudaram em tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I	
Introdução	14
Referencial Teórico	16
Objetivos	22
Referências	23
CAPÍTULO II – Estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília	
Introdução	36
Material e Métodos	38
Resultados	39
Discussão	46
Conclusões	50
Referências	51
CAPÍTULO III – 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	
Introdução	56
Material e Métodos	58
Resultados	66
Discussão	73
Conclusões	77
Agradecimentos	78
Referências	79
CAPÍTULO IV	
Considerações Finais	83

LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 1 – Distribuição das raças no estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.	41
TABELA 2 - Resultados do Teste da Lágrima de Schirmer-1 em mm/minuto realizado em coelhos após administração de solução salina (R1) e de solução salina + FCM (R2).	66
TABELA 3 – Teste de Duncan aplicado às médias do Teste da Lágrima de Schirmer-1 realizado nos coelhos após administração de solução salina (R1) e de solução salina + FCM (R2) ($P \leq 0,05$).	67
TABELA 4 – Teste de Duncan aplicado às médias de hiperemia dos cães observadas após administração de solução salina (D1) e de solução salina + FCM (D2) ($P \leq 0,05$).	68
TABELA 5 - Resultados do Teste da Lágrima de Schirmer-1 em mm/minuto em cães do D1 realizado após administração de solução salina. O primeiro valor representa o olho direito e o segundo, o olho esquerdo. H=fragmento colhido para histologia.	68
TABELA 6 - Resultados do Teste da Lágrima de Schirmer-1 em mm/minuto em cães do D2 realizado após administração de solução salina. O primeiro valor representa o olho direito e o segundo, o olho esquerdo. H=fragmento colhido para histologia.	69
TABELA 7 – Teste de Duncan aplicado às médias do Teste da Lágrima de Schirmer-1 realizado nos cães após administração de solução salina (D1) e de solução salina + FCM (D2) ($P \leq 0,05$).	71

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1 – Distribuição da idade no estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.	42
FIGURA 2 – Distribuição da idade nas raças cocker spaniel, poodle e Yorkshire terrier e em cães SRD no estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.	43
FIGURA 3 – Correlação entre os dados obtidos quanto às faixas de valores do Teste da Lágrima de Schirmer-1, à presença de ceratite ulcerativa e à média da quantidade de sinais clínicos de animais do estudo retrospectivo de ceratoconjuntivite seca realizado no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.	45
FIGURA 4 – Ilustração fotográfica demonstrando o procedimento de colheita de medula óssea em coelhos a partir do trocanter maior do fêmur (A) e de cães a partir do osso esternal (B).	60
FIGURA 5 – Isolamento da fração de células mononucleares obtidas a partir da medula óssea. A: Tubo de Falcon de 15ml após centrifugação em gradiente de densidade de $1077\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$, com destaque para o halo. B: Aspiração da FCM com pipeta automática.	61
FIGURA 6 – Ilustração fotográfica do processo de lavagem em DMEM e soro fetal bovino do <i>pellet</i> obtido da fração de células mononucleares proveniente da medula óssea colhida de coelhos e de cães.	62
FIGURA 7 – Fotomicrografia em microscópio de luz da fração de células mononucleares submetida ao teste de viabilidade com azul de trypan 1%. Apenas células incolores foram consideradas viáveis. A: Aumento de 10x. B: Aumento de 40x.	62

FIGURA 8 – Cronograma das avaliações clínica, oftalmológica e histológica dos coelhos e dos cães. A=ambientação; T=administração de solução salina no R1 e no D1 e de FCM no R2 e no D2; H=colheita de fragmento para histologia.

65

FIGURA 9 – Lâminas de histologia do fragmento da terceira pálpebra de cães em microscópio de luz colhido após administração de solução salina (D1) e solução salina + FCM (D2) ($P \leq 0,05$). A: Nada digno de nota (aumento 10x). B: Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico difuso (aumento 4x). C: inflamatório linfoplasmocítico difuso (aumento 10x). D: Infiltrado inflamatório neutrofílico (aumento 40x).

72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS	ceratoconjuntivite seca
CT	células-tronco
CTH	células-tronco hematopoiéticas
CTM	células-tronco mesenquimais
DF	Distrito Federal
FCM	fração de células mononucleares
FAV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
M	metro
ML	mililitro
MM	milímetro
MO	medula óssea
MPA	medicação pré-anestésica
SRD	sem raça definida
UnB	Universidade de Brasília
TLS	Teste da Lágrima de Schirmer
TLS-1	Teste da Lágrima de Schirmer realizado sem colírio anestésico
UnB	Universidade de Brasília

RESUMO

Foi realizado estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca (CCS) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, a fim de estabelecer os padrões da doença no Distrito Federal. O estudo demonstrou predisposição da raça cocker spaniel ($P < 0,0001$), sinais clínicos mais evidentes em animais com valores do Teste da Lágrima de Schirmer realizado sem colírio anestésico (TLS-1) $< 5\text{mm}/\text{minuto}$ ($P < 0,0001$) e maior incidência da CCS em cães com idade superior a seis anos. Exceção foi observada em cães da raça Yorkshire terrier, acometidos mais precocemente. Os sinais clínicos observados com maior frequência foram hiperemia conjuntival, secreção mucosa, neovascularização e pigmentação de corneanas. A ciclosporina A foi o principal medicamento prescrito. A fim de investigar o potencial da terapia com células-tronco, foi criado um protocolo aplicado ao tratamento da CCS, de colheita de medula óssea (MO), separação de fração de células mononucleares (FCM) e administração autóloga por via subconjuntival palpebral sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e cães. Foram utilizados dez coelhos e 20 cães, que, após passarem por exames clínicos e laboratoriais e ambientação, foram divididos em grupo controle e grupo tratado. Para obtenção da FCM, foi realizada colheita, centrifugação e isolamento da medula óssea. O material, ressuspenso em solução salina, foi administrado no grupo tratado, enquanto o grupo controle recebeu apenas solução salina. Os animais passaram por avaliações clínicas e TLS-1 até 60 dias da aplicação, e avaliação histológica da glândula da terceira pálpebra, que demonstraram não haver alterações que contraindicassem o tratamento. Tanto a administração de solução salina quanto a de solução salina + FCM aumentaram significativamente os valores do TLS, mas o aumento foi mais pronunciado nos cães que receberam células mononucleares. Aos 60 dias da aplicação da FCM, os cães tratados apresentaram aumento de $3,4\text{mm}/\text{min}$ ao TLS-1.

Palavras-chave: ceratoconjuntivite seca, CCS, cães, estudo retrospectivo, células-tronco, fração de células mononucleares

ABSTRACT

A retrospective study of 157 dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS) examined at the Veterinary Hospital at the University of Brasilia was undertaken in order to establish the patterns of disease in Distrito Federal. The study demonstrated predisposition of cocker spaniels ($P < 0.0001$), more clinical signs in patients with Schirmer Tear Test (STT) values less than 5 mm/minutes ($P < 0.0001$) and higher incidence of KCS on dogs over six years (except on Yorkshire terriers, which were stricken younger). Clinical signs more frequently observed were conjunctival hyperaemia, mucus discharge, neovascularization and pigmentation. Cyclosporin A was the main drug prescribed, regardless of the amount of clinical signs and values of the STT presented by each animal. In order to investigate the potential of stem cell therapy, an experimental model of harvest of bone marrow (BM), separation of mononuclear cell fraction (MCF) and administration by subconjunctival autologous eyelid on the third eyelid gland in rabbits and dogs was created and applied to the treatment of KCS. Ten rabbits and 20 dogs were divided into control and treated group, after undergoing clinical and laboratorial exams and quarantine. To obtain MCF, BM was harvested, centrifuged and isolated. Treated group was submitted to the autotransplant of MCF + saline, while the control group received only saline. The animals underwent clinical and histological evaluation and STT, which showed no contraindicative changes. Both the administration of saline as that of saline + FCM significantly increased the values of the TLS, but the increase was more pronounced in dogs that were inoculated mononuclear cells.

Keywords: keratoconjunctivitis sicca, KCS, dogs, retrospective study, stem cells, mononuclear cells

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O filme lacrimal é um leito trilaminar cuja integridade é essencial para a manutenção da integridade da superfície ocular. A sua fração intermediária, aquosa, é responsável pela proteção e pela nutrição corneana, e decorre da secreção das glândulas lacrimal orbital e da terceira pálpebra. Sua mensuração é realizada a partir da fração quantitativa da lágrima.

Anormalidades quantitativas no filme lacrimal são observadas com frequência em cães, sendo a ceratoconjuntivite seca (CCS) a principal delas. A doença consiste na deficiência da fração aquosa do filme lacrimal e tem prevalência entre 1 e 3,3%. Os agentes envolvidos em sua etiologia são diversos, mas se acredita que a doença imunomediada seja a causa mais frequente.

Dentre as raças mais acometidas citam-se cocker spaniel, buldogue inglês, lhasa apso, shih tzu, schnauzer, West Highland white terrier e Yorkshire terrier. Os sinais clínicos mais relatados são secreção ocular seromucosa a purulenta, blefarospasmo, fotofobia, hiperemia conjuntival, quemose, neoformação vascular e pigmentação corneana. Úlcera corneana pode ser uma complicação da doença, seguida de cegueira e perda do bulbo do olho.

O diagnóstico é realizado mediante os sinais clínicos relacionados e confirmado pelos valores do Teste da Lágrima de Schirmer (TLS) inferiores a 15mm/minuto. Ele consiste em mensurar a umidade ocular através de uma fita de papel filtro inserida no saco conjuntival da pálpebra inferior durante um minuto.

O controle da CCS pode ser realizado a partir de uma abordagem clínica, que consiste na administração tópica de lacrimoestimulantes, antiinflamatórios, antibióticos, mucolíticos e lacrimomiméticos, e cirúrgica, com a transposição do ducto parotídeo. A administração de imunomoduladores lacrimoestimulantes é o tratamento de eleição. Contudo, ainda que amenize os sinais clínicos e confira bons resultados, o tratamento não é curativo e deve ser continuado por toda a vida do animal – exigindo colaboração por parte do proprietário. Além disso, há o entrave financeiro, uma vez que terapias com imunomoduladores implicam despesas mensais significativas, que podem desencorajar o tratamento, estando entre as

maiores causas de falha do mesmo. Desta forma, estudos que avaliem alternativas terapêuticas mais efetivas e menos dispendiosas devem ser incentivados.

Propõe-se a utilização de células-tronco (CT) como uma nova opção terapêutica para a CCS, intencionando-se substituir as células originais da glândula da terceira pálpebra lesionadas (tecido epitelial glandular) por células íntegras, capazes de produzir a fração aquosa do filme lacrimal em quantidades adequadas. O êxito na substituição celular implicaria melhora clínica definitiva do paciente, dispensando a necessidade de tratamentos tópicos a longo prazo. A Fração de Células Mononucleares (FCM) é a mais indicada para transplantes autólogos e pode ser facilmente obtida pela colheita e centrifugação da medula óssea (MO). Hoje, sabe-se que a colheita e o isolamento de MO geram quantidade e viabilidade celulares adequadas, que a administração por via intralesional é a mais recomendada e que a utilização da FCM é eficaz, já que a presença das CT no local de implante pôde ser comprovada com a utilização de nanocristais (marcadores celulares).

Estes embasamentos encorajam a proposta de utilização da FCM no tratamento de cães com deficiência na produção da fração aquosa do filme lacrimal. Contudo, antes da sua utilização em cães acometidos pela doença, é importante descartar efeitos colaterais que possam agravar o quadro clínico do paciente.

Atualmente, existe grande acervo sobre a manifestação da CCS em animais domésticos, mas a maioria é proveniente da literatura estrangeira. Por isso, observa-se a importância de realizar um estudo retrospectivo no Distrito Federal, especialmente se forem considerados o efeito da CCS sobre a qualidade de vida do animal, sua prevalência e cronicidade, a distribuição geográfica das raças mais acometidas e a possibilidade de fatores ambientais influenciarem no TLS.

Intencionou-se obter dados sobre a presença de padrões da CCS, estabelecer os sinais clínicos e as doenças concomitantes mais frequentes, analisar a terapêutica empregada e investigar possíveis predisposições. E, em seguida, criar um protocolo aplicado ao tratamento da CCS, de colheita de MO, separação e administração de FCM sobre a glândula da terceira pálpebra, bem como avaliar alterações decorrentes do procedimento.

REFERENCIAL TEÓRICO

A terceira pálpebra, também conhecida como membrana nictitante, localiza-se no canto medial do olho da maioria dos animais domésticos. É constituída por tecido conjuntivo em suas superfícies bulbar e palpebral; tecido linfóide, abaixo da superfície bulbar do tecido conjuntivo; cartilagem hialina, que dá suporte à pálpebra; glândula da terceira pálpebra, que secreta parte da fração aquosa do filme lacrimal através de múltiplos dutos inseridos na superfície bulbar; vasculatura; e inervações simpática e parassimpática (SLATTER, 2005; ALEXANDRE-PIRES et al., 2008). Histologicamente, caracteriza-se por tecido conjuntivo e tecido epitelial glandular que é constituído de dutos e unidades secretórias tubuloacinares (CABRAL, 2005).

As funções da terceira pálpebra são produzir a fração aquosa do filme lacrimal; distribuí-la na superfície bulbar; e proteger a córnea fisicamente, pela remoção de corpos estranhos (GALERA et al., 2009); e imunologicamente, pela liberação de linfócitos (SAITO et al., 2001). Nos casos em que a terceira pálpebra é acometida por afecções na glândula (HENDRIX, 2007; PLUMMER, et al., 2008), neoplasias (HONG et al., 2011), traumas ou corpos estranhos, há comprometimento de tais funções, o que pode desencadear anormalidades quantitativas e/ou qualitativas no filme lacrimal (SLATTER, 2005).

As anormalidades quantitativas são observadas com frequência em cães e podem alterar a dinâmica da lágrima e comprometer sua função (ALMEIDA et al., 2004). A CCS, doença oftálmica crônica comum na espécie (BERDOULAY et al., 2005; WESTERMEYER et al., 2009), é a principal desordem quantitativa e consiste na deficiência da fração aquosa do filme lacrimal (MOORE, 1999; ALMEIDA et al., 2004; RIBEIRO et al. 2008; WILLIAMS, 2008; GALERA et al., 2009). Uma outra forma da doença é a redução lacrimal decorrente da evaporação excessiva, observada em cães braquicefálicos e lagoftalmos (WILLIAMS, 2008).

A fração aquosa é produzida pela glândula lacrimal orbital (50 – 70%) e pela glândula da terceira pálpebra (30 – 50%) (HELPER, 1996; SAITO et al., 2001). É responsável por remover debris, diminuir o atrito entre a córnea e as pálpebras, manter a integridade da córnea, umidificá-la e supri-la de oxigênio e glicose (SANSOM et al., 1995; MOORE, 1999; WILKIE, 1993). Quando há deficiência em sua produção, observam-se diminuição no volume lacrimal, aumento da

osmolaridade, desordens no balanço das citocinas e aumento nas metaloproteinases da matriz. Estas alterações podem levar a inflamação, causando ceratite e conjuntivite (BEGLEY et al., 2003; BARABINO et al., 2004) e, em casos mais graves, perda da visão (BERDOULAY et al., 2005; SANCHEZ et al., 2007).

A prevalência da CCS em cães tem sido relatada entre 1 e 3,3%, sendo maior em animais idosos, e sua incidência pode variar dependendo da localização geográfica (KASWAN & SALISBURY, 1990; PIGATTO et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007). Outros autores referem uma prevalência tão elevada quanto 35% dentre 460 cães acometidos (WILLIAMS, 2008). Em relação à raça, há relatos frequentes da doença em cocker spaniel, buldogue 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). Estudos mostram, também, predisposição do sexo feminino (SANSOM & BARNETT, 1985; BARNETT, 1988; KASWAN & SALISBURY, 1990; LIGHTOWLER et al., 1993; CABRAL et al., 2005), embora HARTLEY et al. (2006) não tenham verificado diferença entre os gêneros.

O desenvolvimento da CCS pode estar relacionado a um processo pontual ou a uma combinação de fatores que afetam a glândula lacrimal (ALMEIDA et al., 2004). Suas causas são hipoplasia congênita da glândula (WESTERMEYER et al., 2009); perda de sua inervação parassimpática, blefaroconjuntivite crônica, uso tópico de sulfonamidas e/ou atropina, doenças metabólicas, cinomose (GELLAT, 1991; MOORE et al., 1999; BERDOULAY et al., 2005; MARTINS et al., 2009), leishmaniose (NARANJO et al., 2005), trauma (SANSOM, 1985), agentes anestésicos (MARGADANT et al., 2003), etodolac (KLAUSS et al., 2007), radiação (JAMIESON et al., 1995) e diabetes melito (BARRERA et al., 1992; CULLEN et al., 2005; WILLIAMS et al., 2007). A doença também pode ter causa iatrogênica, secundária à excisão da glândula lacrimal da terceira pálpebra protruída (SAITO et al., 2001; BERDOULAY et al., 2005).

Na maioria das vezes, contudo, a etiologia não pode ser estabelecida. Nesses casos, assume-se que a doença seja imunomediada (BOUNOUS et al., 1996; Izci, 2002; DURSUN et al., 2002; YEH et al., 2003) baseando-se em estudos histológicos (GILGER & ALLEN, 1998; MOORE, 2001; BERDOULAY, 2005; NELL, 2005) e na resposta clínica observada após tratamento com imunomoduladores (MORGAN & ABRAMS, 1991; OLIVERO et al., 1991; SANSOM, 1995; WILLIAMS, 1999). Quanto

à CSS congênita, apesar de já ter sido relatada, é rara e acomete raças de pequeno porte, que, em geral, já apresentam produção mais baixa de filme lacrimal (BONAGURA & KIRK, 2002; HERRERA et al., 2007).

Cães com CCS podem apresentar secreção ocular seromucosa a purulenta, quemose, fotofobia, neovascularização e pigmentação corneanas, hiperemia de conjuntiva, blefarospasmo, úlcera corneana e fibrose (WILKIE, 1993; MOORE, 1999; KUNERT et al., 2002). Em casos mais graves, pode haver sinais de desconforto e dor (SANSOM et al, 1995), diminuição da acuidade visual, cegueira e perda do olho, secundários à opacidade ou à perfuração de córnea em animais com úlcera (BERDOULAY et al., 2005; SANCHEZ et al., 2007).

Em cães, a CCS é diagnosticada com base nos resultados do TLS. O teste consiste em posicionar uma fita de papel filtro milimetrada na superfície bulbar da terceira pálpebra, onde deverá permanecer por um minuto a fim de mensurar a umidade no local em milímetros por minuto. A CCS é diagnosticada quando a marcação fica abaixo de 15mm/minuto em cães e 2mm/minuto em coelhos, acompanhada de sinais clínicos relacionados (SANSOM & BARNETT, 1985; KASWAN & SALISBURY, 1990; PIGATTO et al., 2007), sendo mais evidente em cães com sinais clínicos e TLS abaixo de 10mm/minuto (WILLIAMS, 2008). O diagnóstico diferencial é a conjuntivite bacteriana, cujos sinais clínicos são semelhantes aos da CCS (KASWAN et al., 1995; GIULIANO & MOORE, 2007).

O TLS é realizado sob leve contenção física. Os fatores que podem influenciar seu resultado são posição da cabeça, iluminação, posição da fita de papel e umidade e temperatura do ambiente. Recomenda-se realizar o teste com o olho do animal fechado para diminuir a interferência de fatores ambientais, como evaporação e umidade. Contudo, ainda não há estudos que comprovem essa teoria ou mensurem o grau de interferência do ambiente nos resultados do TLS (WILLIAMSON & ALISSON, 1967; SERRUYA et al., 2009).

Os objetivos do tratamento da CCS são restabelecer a produção lacrimal adequada e controlar as afecções secundárias, como infecções e úlceras. Os protocolos terapêuticos mais utilizados incluem administração tópica de lacrimoestimulantes, antiinflamatórios, antibióticos, mucolíticos e lacrimomiméticos (MORGAN & ABRAMS, 1991; SEVERIN, 1996; RIBEIRO et al., 2008). Os lacrimoestimulantes são os únicos reconhecidos pela Food and Drug Administration

como capazes de aumentar a produção lacrimal (STEPHEN & PFLUGFELDER, 2004; RAO, 2010).

A ciclosporina A (CsA), lacrimoestimulante mais utilizado no tratamento da CCS, é um polipeptídeo composto por 11 aminoácidos, que pode ser isolado de culturas fúngicas de *Cylindrocarpon lucidum* ou *Tolypocladium inflatum*. Seu mecanismo de ação imunossupressor consiste em se ligar à ciclofilina A, inibindo a indução do fator nuclear de ativação de linfócitos T via calcineurina, interrompendo, assim, a transcrição da interleucina-2 (MATSUDA & KOYASU, 2000; DONNENFELD & PFLUGFELDER, 2009). Em humanos, foi demonstrado que sua utilização diminui o número de linfócitos T ativados e a expressão de marcadores inflamatórios na conjuntiva (KUNERT et al., 2002; TURNER et al., 2000). Acredita-se que o número de linfócitos T na glândula da terceira pálpebra esteja relacionado à causa da doença e não que seja uma consequência da mesma (WILLIAMS, 2008). Em cães, sabe-se que a ciclosporina é o medicamento que melhor age na diminuição de sinais clínicos e sobre o índice de perda de visão (THOMAS et al., 2009; RAO, 2010; SAHLI et al., 2010). Outros lacrimoestimulantes têm sido desenvolvidos, como o tacrolimus e o pimecrolimus, atribuindo-se a eles um efeito mais potente, enquanto alguns autores afirmam que, em casos resistentes à ciclosporina 2%, o uso do tacrolimus não surte efeito (WILLIAMS, 2008).

Como os lacrimoestimulantes requerem um período para estabelecimento da dose e da frequência adequadas para cada paciente – durante o qual pode não haver resposta clínica adequada –, alguns autores recomendam utilizar, concomitantemente, um lacrimomimético (SALISBURY, 1995). Popularmente conhecidos como “lágrima artificial”, os lacrimomiméticos simulam o filme lacrimal e ajudam a manter a umidade da superfície ocular. Em casos menos graves, podem ser os únicos medicamentos prescritos, pois controlam os efeitos da doença e têm custo baixo, evitando que o proprietário desista de um tratamento considerado dispendioso (BEHRENS et al., 2006).

Os antiinflamatórios são indicados para animais que apresentem sinais de inflamação, como neovascularização e hiperemia conjuntival (RIBEIRO et al., 2008). Mas, como existem fortes indícios de que a inflamação participe da etiologia da CCS, alguns autores recomendam o uso crônico do medicamento independente dos sinais clínicos apresentados, com o objetivo de prevenir, desacelerar ou reverter a

progressão da doença (WILSON & STULTING, 2007). Os antibióticos, por sua vez, são recomendados para pacientes com infecções oculares graves e/ou que apresentem úlcera de córnea (BEHRENS et al., 2006). Outros tratamentos, como a utilização da pilocarpina e a transposição do ducto parotídeo, podem ser considerados em casos específicos (GELATT, 2003; COLITZ, 2008).

Contudo, ainda que a utilização tópica da CCS seja fácil, segura, amplamente aceita e venha sendo utilizada rotineiramente, é um tratamento paliativo (CALONGE, 2001; NELL et al., 2005; PIGATTO et al., 2008; THOMAS et al., 2009) e precisa ser realizada por toda a vida do animal, exigindo grande colaboração do proprietário. Há, ainda, o entrave financeiro, uma vez que o uso de imunomoduladores implica despesas mensais elevadas, que podem desencorajar o tratamento. Em casos mais graves, o animal pode não se beneficiar deste tratamento, já que quando não há mais tecido glandular exócrino e as alterações glandulares atingiram o estágio de fibrose máximo (grau III), nenhum lacrimoestimulante será efetivo (KASWAN et al., 1982). Além disso, tem-se chamado a atenção para a possibilidade de o tratamento prolongado com CsA tópica estar relacionado ao desenvolvimento de neoplasias malignas (DREYFUS et al., 2011).

Considerando a inexistência de tratamento definitivo e a presença de casos não responsivos aos tratamentos propostos, assim como a diminuição da qualidade de vida dos pacientes com CCS, observa-se a necessidade de encontrar uma alternativa terapêutica efetiva (SLATTER, 2005; MERTZANIS et al., 2005; MILJANOVIC, et al., 2007; SAHLI et al., 2010). Dentre as opções disponibilizadas por novos avanços na medicina humana, destaca-se a pesquisa com CT (NEIVA, 2005), que se baseia na substituição de células lesionadas por tecido saudável desenvolvido a partir de uma única célula mononuclear. Este tecido, que age como sistema de reparo, pode melhorar significativamente prognósticos antes considerados desfavoráveis (STRAUER & KORNOWSKI, 2003; HUANG et al., 2004; MCCULLOCH & TILL, 2005).

As CT se distinguem de outros tipos celulares por serem células não especializadas que se renovam por longos períodos (DEL CARLO, 2005) e por sua plasticidade, ou seja, capacidade de se transformar em células com funções específicas sob certas condições fisiológicas ou experimentais (SOUZA & ELIAS, 2005). Tais características possibilitam sua utilização em terapias regenerativas e

reparadoras, trazendo novas perspectivas para o tratamento de doenças com baixa resposta aos métodos convencionais, especialmente na área cirúrgica (TOGNOLI, 2008).

A MO é uma fonte excelente de CT, pois a técnica para obtenção das células é fácil, o transplante pode ser autólogo e o processo não envolve implicações éticas, já que é realizado em organismos adultos (KÖRBLING et al., 2003; HOWS 2005; TOGNOLI, 2008; OLSSON et al., 2009). Na MO, são produzidas cerca de seis bilhões de células por quilograma de peso corporal por dia, que sofrem processos distintos de diferenciação (KÖRBLING et al., 2003), dividindo-se em mononucleares e multinucleares (ROMANOV et al., 2003). As células de interesse para os transplantes autólogos são as mononucleares, pois podem apresentar multipotencialidade (células-tronco hematopoiéticas) ou pluripotencialidade (células-tronco mesenquimais) (JIANG et al. 2002; ROMANOV et al., 2003; NAGAYA et al., 2004).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são altamente capazes de se autorrenovar e de proliferar, o que possibilita a diferenciação em células progenitoras da linhagem sanguínea e seus derivados a partir de uma única célula (CANTLEY, 2005; TOGNOLI, 2008). As células-tronco mesenquimais (CTM), por outro lado, além de apresentarem capacidade de autorrenovação, podem, ainda, se diferenciar em linhagens de tecido conjuntivo (BLACK & WOODBURY, 2001; FUKUDA, 2003), pulmonar, hepático e nervoso (THEISE et al., 2002; ALISON et al. 2000; MEZEY et al., 2000).

Apesar de o transplante de CTH para o tratamento de doenças hematológicas ser amplamente difundido, o uso de células provenientes da MO na terapia regenerativa ainda está em desenvolvimento. Além disso, como não se sabe ao certo qual fração apresenta maior plasticidade (HOWS, 2005), sugere-se utilizar ambos os tipos celulares, a fim de garantir suporte à proliferação e à manutenção das CT – ou seja, o uso completo da FCM tem sido mais indicado que a escolha de um único tipo celular (GOWDAK et al., 2004; VILAS-BOAS et al., 2004).

A MO é colhida por via intraóssea, utilizando-se agulhas específicas. A partir dela, pode-se obter FCM por meio de processos de centrifugação. Seguindo o protocolo descrito por BOYUM (1968) e modificado por TOGNOLI et al. (2007), é possível obter entre $0,63$ e $1,24 \cdot 10^8$ células e viabilidade celular acima de 90%.

Segundo FORTIER (2005), em cães, 0,001 a 0,01% dessas células correspondem a CTM, o que viabiliza estudos de autotransplante, uma vez que a recomendação é que sejam obtidas ao menos 2.10^6 células mononucleares (GENGOZIAN, 2000; GUARITA-SOUZA et al., 2005).

No início dos estudos do tratamento com CT, alguns pontos não estavam totalmente esclarecidos, como as técnicas de colheita e separação da FCM, a melhor via para administração (ANDERSON et al., 2005) e a avaliação da eficiência do transplante. Hoje, sabe-se que a colheita de MO e o protocolo de separação da FCM modificado por TOGNOLI et al. (2007) geram quantidade e viabilidade celulares adequadas, que a administração por via intralesional é a mais recomendada (TOMITA et al, 2004; VILAS-BOAS et al., 2004; VAQUERO et al., 2005) e que o transplante da FCM é eficaz, já que a presença das CT no local de implante pôde ser comprovada com a utilização de nanocristais (marcadores celulares) (TOGNOLI, 2008; OLSSON, 2009; TOGNOLI et al, 2009).

Na medicina veterinária, TI et al. (2002), NAKAMURA et al. (2005) e TOGNOLI (2008) relataram sucesso no transplante de CT em oftalmologia, mas, embora tenha sido observada diferenciação celular, restam dúvidas quanto a funcionalidade das células transplantadas. Desta forma, a terapia com CT, embora promissora, ainda demanda estudos sobre sua aplicabilidade em intervenções terapêuticas (TOGNOLI, 2008).

OBJETIVOS

Estabelecer padrões da CCS em cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV-UnB) quanto a raça, idade, gênero, sinais clínicos, doenças concomitantes, protocolos terapêuticos e valores do TLS, e analisar suas correlações.

Criar um protocolo aplicado ao tratamento da CCS, por meio de colheita de MO, separação de FCM e administração autóloga por via subconjuntival palpebral sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e de cães.

Avaliar possíveis alterações na produção da fração aquosa do filme lacrimal e nas características histopatológicas da glândula da terceira pálpebra e/ou complicações oculares decorrentes da administração de FCM.

REFERÊNCIAS

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 Tecnology**, v.71, p.521-528, 2008.

ALISON, M.R.; POULSOM, R.; JEFERRY, R.; DHILLON, A.P.; QUAGLIA, A.; JACOB, J.; NOVELLI, M.; PRENTICE, G.; WILLIAMSON, J.; WRIGHT, N.A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, v.406, n.6793, p.257, 2000.

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.

ANDERSON, N.G.; RISBUD, M.B.; SHAPIRO, I.M.; VACCARO, A.R.; ALBERT, T.J. Cell-based therapy for disc repair. **The Spine Journal**, v.5, p.297-303, 2005.

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.

BARNETT, K.C. Keratoconjunctivitis sicca: sex incidence. **Journal of Small Animal Practice**, v.29, p.531-534, 1998.

BARRERA, R.; CINTA MAÑÉ, M.; RODRIGUEZ, J.F.; JIMENÉZ, A. Keratoconjunctivitis sicca and diabetes mellitus in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.12, p.1967-1968, 1992.

BEGLEY, C.G.; CHALMERS, R.L.; ABETZ, L.; VENKATARAMAN, K.; MERTZANIS, P.; CAFFERY, B.A.; SNYDER, C.; EDRINGTON, T.; NELSON, D.; SIMPSON, T. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among

patients with dry eye of varying severity. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, n.11, p.4753-4761, 2003.

BEHRENS, A.; DOYLE, J.J.; STERN, L.; CHUCK, R.S.; MCDONNELL, P.J.; AZAR, D.T.; DUA, H.S.; HOM, M.; KARPECKI, P.M.; LAIBSON, P.R.; LEMP, M.A.; MEILER, D.M.; DEL CASTILLO, J.M.; O'BRIEN, T.P.; PFLUGFELDER, S.C.; ROLANDO, M.; SCHEIN, O.D.; SEITZ, P.; TSENG, S.C.; VAN SETTEN, G.; WILSON, S.E.; YIU, S.C. Dysfunctional tear syndrome study group. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. **Cornea**, v.25, p.900-907, 2006.

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.

BLACK, I.B.; WOODBURY, D. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Blood Cells, Molecule and Diseases**, v.27, n.3, p.632-636, 2001.

BONAGURA, J.D.; KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy Small Animal Practice**. Toronto: Wb Saunders CO XII, 2002. 1231-1239p.

BOUNOUS, D.I.; CARMICHAEL, K.P.; KASWAN, R.L.; HIRSH, S.; STILES, J. Effects of ophthalmic cyclosporine on lacrimal gland pathology and function in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, v.5, p.5-12, 1996.

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.

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.

CALONGE, M. The treatment of dry eye. **Survey of Ophthalmology**, v.45, p.227-239, 2001.

CANTLEY, L.G. Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v.1, n.1, p.22-32, 2005.

COLITZ, C.M.H. Doenças do sistema lacrimal. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 3ª edição, 2008. Cap.139, 1416-1421p.

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.

DEL CARLO, R.J.; GALVÃO, S.R.; VELORIA, M.I.V.; SOUZA, T.D.; MAIA FILHO, A. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, n.3, p.121-126, 1999.

DONNENFELD, E.; PFLUGFELDER, S.C. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. **Survey of Ophthalmology**, v.54, p.321-338, 2009.

DREYFUS, D.; WANG, M.; MONROY, D.; LI, D.Q.; LOKESHWAR, B.L.; STERN, M.E.; PFLUGFELDER, S.C. Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.3, p.161-168, 2011.

DURSUN, D.; WANG, M.; MONROY, D. LI, D.Q.; LOKESHWAR, B.L.; STERN, M.E.; PFLUGFELDER, S.C. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.43, n.3, p.632-638, 2002.

FORTIER, L. Stem cells: classifications, controverses, and clinical applications, **Veterinary Surgery**, v.34, p.415-423, 2005.

FUKUDA, K. Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes. **Bone Marrow Transplantation**, v.32, p.25-27, 2003.

GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; ORIÁ, A P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J.L. Oftalmologia clínica e cirúrgica em pequenos animais. São Paulo: Roca, 1ª edição. 2009, 69-96.

GELATT, K.N. Canine lacrimal and nasolacrimal diseases. In: GELLAT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. Cap.7, 276-289p.

GELATT, K.N. Doenças e cirurgia dos sistemas lacrimal e nasolacrimal do cão. In: _____. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo, Manole, 2003. Cap. 4, 73-94p.

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.

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 edição, 2007. V.2, Cap.3, 633-661p.

GOWDAK, L.H.W.; SCHETTERT, I.T.; BECKER, C.; KRIEGER, J.E. Análise crítica da utilização de células-tronco no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.14, n.1, p.179-185, 2004.

GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, M.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWIWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J.R.; BROFMAN, P. Comparison of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infarction. **Brazilian Journal Cardiovascular Surgery**, v.20, n.3, p.270-278, 2005.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, 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.

HELPER, LC. The tear film in the dog. Cause and treatment of diseases associated with overproduction and underproduction of tears, **Animal Eye Research**, v.15, n.1-2, p.5-11, 1996.

HENDRIX, D.V.H. Canine conjunctiva and nictitating membrane. In: GELATT, K.M. **Veterinary Ophthalmology**. Blackwell Publishing, 4^a edição, 2007. 662-689p.

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.

HONG, I.H.; BAE, S.H.; LEE, S.G.; PARK, J.K.; JI, A.R.; KI, M.R.; HAN, S.Y.; LEE, E.M.; KIM, A.Y.; YOU, S.Y.; KIM, T.H.; JEONG, K.S. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the third eyelid conjunctiva in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.1, p.61-65, 2011.

HOWS, J. Adult stem cell therapy beyond haematopoietic stem cell transplantation? An update. **Transplant Immunology**, v.14, p.221-223, 2005.

HUANG, P.P.; LI, S.Z.; HAN, M.Z.; XIAO, Z.J.; YANG, R.C.; QIU, L.G.; HAN, Z.C. Autologous transplantation of peripheral blood stem cell as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, n.3, p.606-609, 2004.

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.

JAMIESON, V.E.; DAVIDSON, M.G.; NASISSE, M.P.; ENGLISH, R.V. Ocular complications following cobalt 60 radiotherapy of neoplasms in the canine head region. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, p.51-55, 2005.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALEZ, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v.418, p.41-49, 2002.

KASWAN RL, MARTIN CL, CHAPMAN WL 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.

KASWAN, R.L.; BOUNOUS, D.; HIRSH, S.G. Diagnosis and management of keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Medicine**, v.90, p.539-560, 1995.

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, 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.

LIGHTOWLER, C.H.; HERRERA, H.D.; GÓMEZ, N.V. Lacrimomimetic effect of topical cyclosporine A in canine KCS. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences**, v.30, p.233-241, 1993.

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.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanism of action of cyclosporine. **Immunopharmacology**, v.47, p.119-125, 2000.

McCULLOCH, E.A.; TILL, J.E. Perspectives on the properties of stem cells. **Nature Medicine**, Boston, v.11, n.10, p.1026-1028, 2005.

MERTZANIS, P.; ABETZ, L.; RAJAGOPALAN, K.; ESPINDLE, D.; CHALMERS, R.; SNYDER, C.; CAFFERY, B.; EDRINGTON, T.; SIMPSON, T.; NELSON, J.D.; BEGLEY, C. The relative burden of dry eye in patient's lives: comparisons to a U.S. normative sample. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.46, p.46-50, 2005.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K.J.; HARTA, G.; MAKI, R.A.; MCKERCHER, S.R. Turning blood into brain: expression of neuronal phenotype in adult mice. **Science**, v.290, p.1775-1779, 2000.

MILJANOVIC, B.; DANA, R.; SULLIVAN, D.A.; SCHAUMBERG, D.A. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. **American Journal of Ophthalmology**, v.143, p.409-415, 2007.

MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3ª edição, 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 and Visual Science**, v.42, 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, p.1043-1046, 1991.

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.

NAKAMURA, T.; ISHIKAWA, F.; SONODA, K.H.; HISATOMI, T.; QIAO, H.; YAMADA, J.; FUKATA, M.; ISHIBASHI, T.; HARADA, M.; KINOSHITA, S. Characterization and distribution of bone marrow-derived in mouse cornea. **Investigation Ophthalmology & Visual Science**, v.46, n.2, p.497-503, 2005.

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.

NEIVA, P. Células que salvam vidas. **Revista Veja**, n.1932, p.118-126, 2005.

NELL, B.; WALDE, I.; BILLICH, A.; VIT, P.; MEINGASSNER, J.G. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.39-46, 2005.

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. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na lesão iatrogênica de tendão de calcâneo em cães**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 106f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

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.

PLUMMER, C.E.; KÄLLBERG, M.E.; GELATT, J.P.; BARRIE, K.P.; BROOKS, D.E. Intranictitans tacking for replacement of prolapsed gland on the third eyelid in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.4, p.228-233, 2008.

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. Anormalidades quali-quantitativas do filme lacrimal de cães. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.568-575, 2008.

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.

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.

SALISBURY, M.A. Keratoconjunctivitis sicca. In: BONAGURA, J.D.; KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy**. Toronto: WB Saunders, 1995. 1231-1239p.

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.

SANSOM, J.; BARNETT, K.C.. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, v.26, p.121-131, 1985.

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.

SEVERIN, G.A. Keratoconjunctivitis sicca. In: SEVERIN, S. **Veterinary Ophthalmology Notes**. Fort Collins: Mawhiney DesignPoint™ Communications, 3ª edição, 1996. 230-233p.

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

SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. **Centro de Estudos Alfa Rio**, p.1-13, 2005.

STEPHEN, C.; PFLUGFELDER, M.D. Antiinflammatory Therapy for Dry Eye. **American Journal of Ophthalmology**, v.13, p.337-342, 2004.

STRAUER, B.E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**, v.107, p.929-934, 2003.

THEISE, N.D.; HENEGARIU, O.; GROVE, J.; JAGIRDAR, J.; KAO, P.N.; CRAWFORD, J.M.; BADVE, S.; SAXENA, R.; KRAUSE, D.S. Radiation pneumonitis in mice. A severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. **Experimental Hematology**, v.30, n.11, p.1333-1338, 2002.

TI, S.E.; ANDERSON, T.; TOUHAMI, A.; KIM, C.; TSENG, S.C. Factor affecting outcome following transplantation of vivo explanted limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.43, n.8, p.2584-2592, 2002.

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 medula 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, jan-fev, 2009.

TOMITA, M.; Yamada, H.; Adachi, Y.; Cui, Y.; Yamada, E.; Higuchi, A.; Minamino, K.; Suzuki, Y.; Matsumura, M.; Ikehara, S. Choroidal neovascularization is provided by bone marrow cells. **Stem Cells**, v.22, p.21-26, 2004.

TURNER, K.; PGLUGFELDER, S.C.; JI, Z.; FEUER, W.J.; STERN, M.; REIS, B.L. Interleukin-6 levels in conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. **Cornea**, v.19, p.492-496, 2000.

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.

WILKIE, D.A. Management of keratoconjunctivitis sicca in dogs. **Continuing Education for the Practicing Veterinary**, p.58-63, 1993.

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 Small Animal Practice**, v.38, p.251-268, 2008.

WILLIAMS, D.L.; PIERCE, V.; MELLOR, P.; HEATH, M.F. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, n.5, p.252-256, 2007.

WILLIAMSON, J.; ALISSON, M. Effect of temperature and humidity in the Schirmer Tear Test. **British Journal of Ophthalmology**, v.57, n.9, p.596-598, 1967.

WILSON, S.E.; STULTING, R.D. Agreement of physician treatment practices with the international task force guidelines for diagnosis and treatment of dry eye disease. **Cornea**, v.26, p.284-289, 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.A.; SOARESII, M.B.P.; MOTAI, A.; PINHO-FILHO, J.A.; ALMEIDA, A.J.G.; ANDRADE, M.V.; CARVALHO, H.G.; OLIVEIRA, A.D.; SANTOS, R.R. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chaga's disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.82, n.2, p.185-187, 2004.

YEH, S.; SONG, X.J.; FARLEY, W.; LI, D.Q.; STERN, M.E.; PFLUGFELDER, S.C. Apoptosis of ocular surface cell in experimentally induced dry eye. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, n.1, p.124-129, 2003.

CAPITULO II

ESTUDO RETROSPECTIVO DE 159 CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença oftálmica crônica comum em cães e consiste na deficiência da fração aquosa do filme lacrimal. Sua prevalência, que varia entre 1 e 3,3%, tem sido correlacionada com a idade do animal e sua incidência parece ser influenciada pela localização geográfica.

Dentre as raças mais acometidas estão cocker spaniel, buldogue inglês, lhasa apso, shih tzu, schnauzer, West Highland white terrier e Yorkshire terrier. Os sinais clínicos mais frequentes são secreção ocular seromucosa a purulenta, quemose, fotofobia, neovascularização e pigmentação corneanas, hiperemia de conjuntiva, blefarospasmo, úlcera corneana e fibrose. Em casos mais graves, há relatos de diminuição da acuidade visual, cegueira e perda do olho, secundários à opacidade ou à perfuração de córnea em pacientes com úlcera.

O diagnóstico da CCS é feito com base em valores do Teste da Lágrima de Schirmer (TLS) menores que 15mm/minuto acompanhados de sinais clínicos relacionados. O teste, que consiste em mensurar a umidade ocular através de uma fita de papel filtro, não requer sedação ou anestesia, sendo suficiente contenção física.

Os protocolos terapêuticos mais indicados para cães com CCS incluem administração tópica de lacrimoestimulante, antiinflamatórios, antibióticos, mucolíticos e lacrimomiméticos, com o objetivo de controlar afecções secundárias e restabelecer a produção lacrimal. Mas, apesar de diminuir os sinais clínicos e ser relativamente simples, o tratamento é paliativo, já que a cura para a doença não existe, e precisa ser realizado por toda a vida do animal.

Atualmente, existe grande acervo sobre a manifestação da CCS em animais domésticos; contudo, a maioria das revisões bibliográficas e relatos de caso vem da literatura estrangeira. Por isso, observa-se a importância de realizar um estudo retrospectivo no Distrito Federal (DF), especialmente se forem considerados o efeito

da CCS sobre a qualidade de vida do animal, sua prevalência e cronicidade, a distribuição geográfica das raças mais acometidas e a possibilidade de fatores ambientais influenciarem nos resultados do TLS.

Ao obter dados sobre os padrões da doença quanto a raça, idade e gênero, estabelecer os sinais clínicos e as doenças concomitantes mais frequentes, analisar os tratamentos empregados e investigar possíveis predisposições, será possível um diagnóstico mais preciso e, eventualmente, o estabelecimento de protocolos terapêuticos apropriados e específicos para cada paciente, bem como ter maior acurácia quanto ao prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado estudo retrospectivo de cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB (FAV-UnB) e diagnosticados com CCS clínica e subclínica. Os dados foram obtidos dos prontuários de animais submetidos a consulta ou retorno entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.

Para a determinação do perfil dos animais atendidos, foram coletados dados referentes a raça, idade, gênero, sinais clínicos apresentados, doenças concomitantes, tratamentos prescritos e resultados do TLS realizado sem colírio anestésico (TLS-1). Nas fichas de retorno, foram também obtidos dados quanto a resposta ao tratamento realizado.

Só foram utilizadas para análise estatística as raças representadas por dez cães ou mais – o N das demais não foi considerado grande o suficiente para gerar informações estatisticamente significativas. Para análise estatística da idade, foram consideradas as datas registradas na primeira consulta e os animais foram divididos em quatro faixas etárias: até dois anos, entre dois e quatro anos, entre quatro e seis anos e acima de seis anos. A incidência da ceratite ulcerativa foi calculada para cada animal, independentemente de ser primeira consulta ou retorno.

Todos os dados coletados foram analisados com o software SAS, utilizando procedimentos General Linear Model (GLM) e Correlação (CORR). A diferença entre eles foi calculada utilizando o teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

1. SINAIS CLÍNICOS

Foram obtidas informações de 157 animais com CCS, que apresentaram entre um e nove sinais clínicos, sendo que a maioria (20%) apresentou três. No total, foram registrados 48 sinais clínicos diferentes e os relatados com maior frequência foram hiperemia conjuntival (48%), secreção mucosa (39%), neovascularização (36%), pigmentação ou melanose (27%), edema de córnea (19%) e opacidade de córnea (18%). À análise estatística, foi observada correlação positiva entre a quantidade de sinais clínicos e a presença de neovascularização (0,66), hiperemia conjuntival (0,60), secreção mucosa (0,54), edema de córnea (0,42), pigmentação (0,37), quemose (0,30), opacidade de córnea (0,27), úlcera (0,21) e triquíase (0,20).

Ao correlacionar as faixas de valores do TLS-1 à quantidade de sinais, foi observada diferença estatística ($P < 0,0001$). Segundo o teste estatístico de Duncan, animais com TLS-1 < 5 mm/minuto tiveram significativamente mais sinais clínicos. Em cães com TLS-1 < 5 mm/minuto, foram observados, em média, 3,5 sinais clínicos; nos com TLS-1 entre 5 e 10mm/minuto, 2,5 sinais clínicos; e nos com TLS-1 entre 11 e 15mm/minuto, 2 sinais clínicos.

Ao analisar a relação entre os valores do TLS-1 e os sinais clínicos individualmente, foram observadas correlações negativas ou nulas. As correlações mais significativas foram com hiperemia conjuntival (-0,33), neovascularização (-0,32) e edema de córnea (-0,30).

Ao comparar o dia zero (consulta nova) com os dias subsequentes (retornos), foi observada leve correlação negativa com a quantidade de sinais clínicos (-0,18).

2. DOENÇAS CONCOMITANTES

Aproximadamente 46% dos cães apresentaram pelo menos uma doença oftálmica concomitante. No total, foram referidas sete doenças: catarata (20% dos cães), ceratite ulcerativa (12%), prolapso da glândula da terceira pálpebra (3%), glaucoma (2,5%), ceratite pigmentar (2%), neoplasia (1%) e olho diamante (0,5%).

Ao correlacionar a presença de doença concomitante aos valores do TLS-1 e à quantidade de sinais clínicos, não foram observadas diferenças significativas. Contudo, o teste de Duncan demonstrou que cães com mais de duas doenças concomitantes apresentaram índice significativamente maior de sinais clínicos que aqueles com uma ou nenhuma doença.

3. TRATAMENTOS

Lacrimoestimulante foi prescrito para a maioria dos animais atendidos (92%), sendo que a frequência de administração variou entre uma vez a cada dois dias (8%), uma vez ao dia (25%), duas vezes ao dia (54%) e três vezes ao dia (13%). Também foram prescritos antibióticos (22%), antiinflamatórios (17%), lacrimomiméticos (11%), mucolíticos (4%), inibidores da anidrase carbônica tipo 2 (2%), cicatrizantes (2%) e soro autólogo (0,2%). Os princípios ativos mais utilizados foram CsA (92%), prednisona (12%), cloranfenicol (7%), sulfato de condroitina A (6%), tobramicina (5%), dexametasona (5%), acetilcisteína (4%) e diclofenaco de sódio (3%). A enucleação foi indicada para apenas 0,2% dos cães.

Ao comparar os tratamentos utilizados e os valores do TLS-1, foram observadas correlações negativas baixas. O tratamento da ceratite ulcerativa apresentou correlações mais elevadas com atropina (0,25), tobramicina (0,22) e cloranfenicol (0,20) e o tratamento de uveíte, por sua vez, apresentou correlações com dexametasona (0,25) e atropina (0,21).

A quantidade de sinais clínicos apresentou baixas correlações positivas com os tratamentos utilizados, sendo a maior delas com a CsA (0,17). A correlação entre a frequência de administração de CsA e a quantidade de sinais clínicos foi de 0,27.

À análise estatística, ao comparar o dia zero (consulta nova) com os dias subsequentes (retornos), observou-se leve correlação positiva com o aumento dos valores do TLS-1 (0,21). Dos animais atendidos, a maioria (60%) retornou ao Hospital Veterinário da FAV-UnB para acompanhamento e, destes, 37% não voltaram mais.

4. PERFIL DOS ANIMAIS

Raça

No estudo retrospectivo, foram atendidas 26 raças diferentes (Tabela 1), sendo as mais frequentes: cocker spaniel (36%), poodle (12%) e Yorkshire terrier (9%) – aproximadamente 7% não tinha raça definida (SRD). Estas raças, representadas por pelo menos dez cães cada uma, foram as utilizadas na análise estatística.

TABELA 1 – Distribuição das raças no estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.

Raça	N	Raça	N
cocker spaniel	56	shih tzu	2
poodle	19	beagle	1
Yorkshire terrier	14	bichon frisé	1
SRD	11	chow chow	1
dachshund	6	dogo argentino	1
lhasa apso	6	terrier brasileiro	1
pug	6	labrador	1
Basset hound	5	maltês	1
bull terrier	4	mastiff	1
akita	2	pastor alemão	1
buldogue inglês	2	samoieda	1
fila brasileiro	2	schnauzer	1
pinscher	2	shar pei	1

N = quantidade de animais

Ao investigar a existência de predisposição à CCS, foi observada diferença altamente significativa ($P < 0,0001$). Segundo o teste de Duncan, animais da raça cocker spaniel foram mais acometidos que todas as outras raças. Ao correlacionar as raças aos valores do TLS-1 e à presença de doenças concomitantes, não foram

observadas diferenças significativas. Ao correlacionar as raças à quantidade de sinais clínicos, foi observada diferença estatística ($P=0,0051$). Segundo o teste de Duncan, os cães da raça cocker spaniel apresentaram mais sinais clínicos que cães de outras raças.

Idade

Os animais avaliados tinham entre dois meses e 16 anos de idade (média de 8 anos) – sendo a maioria com mais de seis anos (69%) e a minoria com menos de dois (6%) (Figura 1). Ao comparar a idade aos valores do TLS-1, foi observada diferença altamente significativa ($P<0,0001$). Segundo o teste de Duncan, quanto mais velho o animal, menores os valores do TLS-1. Ao correlacionar a idade à quantidade de sinais clínicos, não foi observada diferença estatística, mas foi observada diferença quanto à presença de doença concomitante ($P=0,0045$): cães com até dois anos apresentaram mais doenças concomitantes (especialmente ceratite ulcerativa) comparativamente a cães mais velhos. A idade dos animais não apresentou correlação elevada com nenhum sinal clínico, variando de $-0,14$ a $0,09$.



FIGURA 1 – Distribuição da idade no estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.

Ao correlacionar idade e raça, foi observada diferença estatística ($P=0,0166$). Segundo o teste de Duncan, cães da raça Yorkshire terrier foram acometidos significativamente mais cedo que as outras raças. A raça cocker foi acometida com idade média de 9 anos (moda = 10 anos), a raça poodle com 10 anos (moda = 11 anos), a raça Yorkshire terrier com 6,5 anos (moda = 3 anos) e cães SRD com 10 anos (moda = 10,5 anos). Aproximadamente 79% dos cães da raça cocker spaniel atendidos no referido serviço tinham idade superior a 6 anos, assim como 95% dos poodles; 43% dos Yorkshire terriers se apresentaram entre 2 e 4 anos e 43% tinham mais de 6 anos; e 82% dos animais SRD tinham 6 anos ou mais (Figura 2).

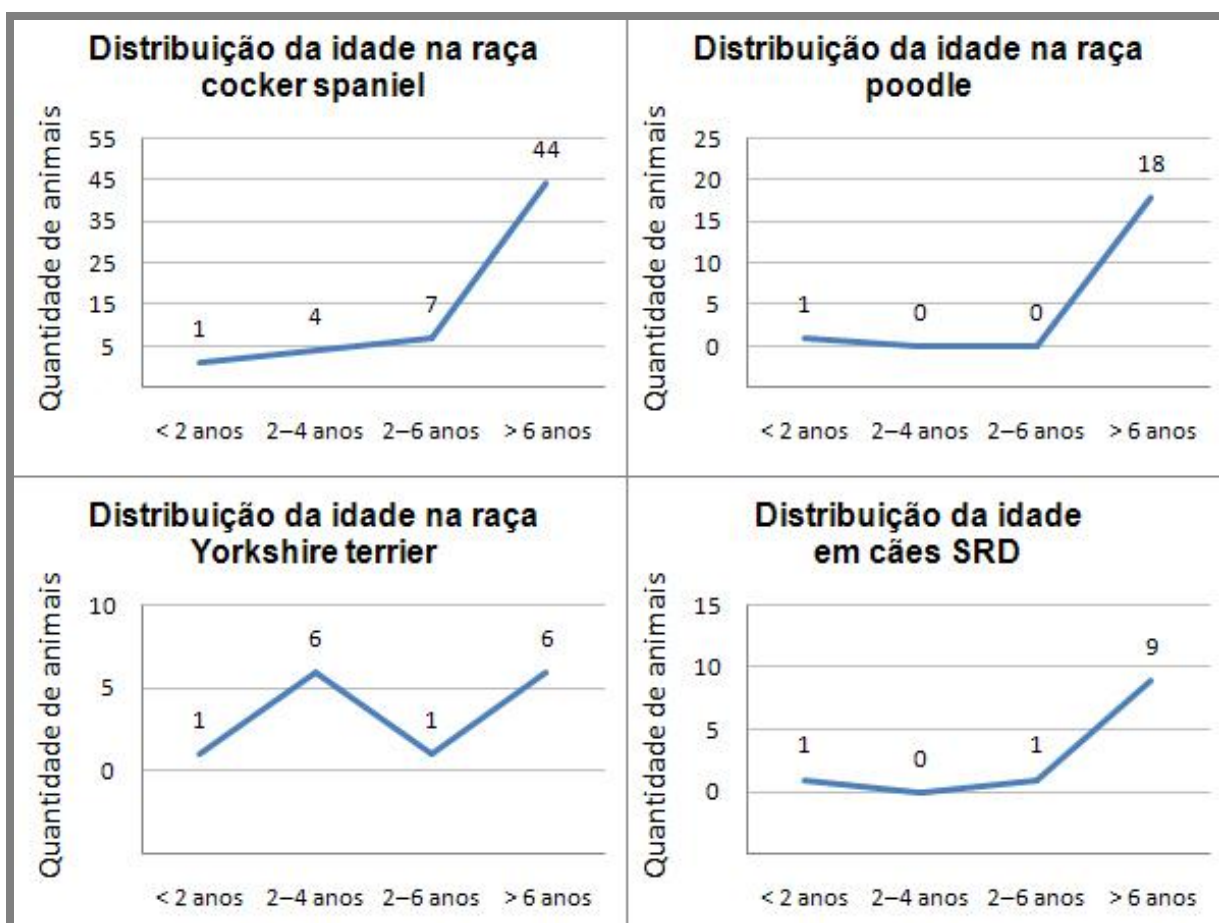


FIGURA 2 – Distribuição da idade nas raças cocker spaniel, poodle e Yorkshire terrier e em cães SRD no estudo retrospectivo de 159 cães com ceratoconjuntivite seca atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.

Gênero

Dos cães atendidos, 48% eram fêmeas e 52% eram machos. Ao correlacionar o gênero aos sinais clínicos, presença de doença concomitante, raça e idade, não foram observadas diferenças significativas. Ao correlacioná-lo aos valores do TLS-1, também não foi observada diferença estatística, mas, pelo teste de Duncan, observou-se que a média dos valores do TLS-1 das fêmeas (11mm/minuto) foi mais baixa que a dos machos (12mm/minuto).

Ceratite ulcerativa

Foram registrados 24 casos de ceratite ulcerativa, sendo que os maiores índices foram observados no grupo de cães com TLS-1 <5mm/minuto, em que 7,5% dos animais foram acometidos. No grupo com TLS-1 entre 6 e 10mm/minuto, 4% dos animais apresentaram úlcera, e no grupo com TLS-1 entre 11 e 15, 6% apresentaram o sinal clínico (Figura 3). Ao analisar a prevalência da ceratite ulcerativa nas raças mais acometidas por CCS, não foi observada diferença estatística entre elas. Ao correlacionar o índice de ceratite ulcerativa à idade, foi observada diferença altamente significativa ($P < 0,0001$). Cães com menos de 2 anos apresentaram índice de úlcera mais alto e cães com mais de 6 anos apresentaram índice mais baixo. Ao correlacionar o índice de úlcera ao gênero, também foi observada diferença estatística ($P = 0,0006$) – machos apresentaram significativamente mais úlcera que fêmeas.

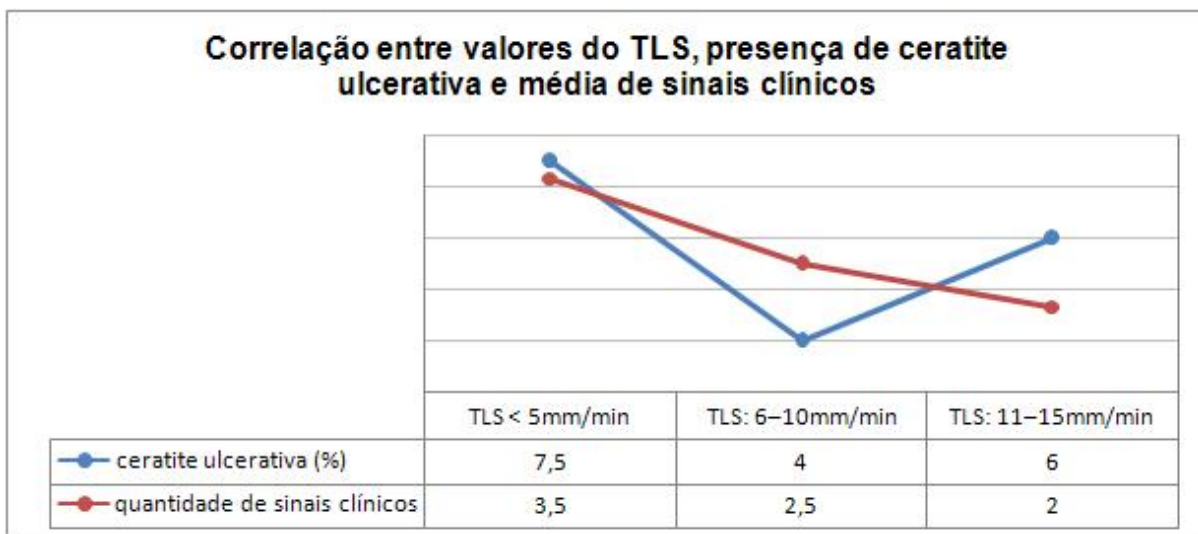


FIGURA 3 – Correlação entre os dados obtidos quanto às faixas de valores do Teste da Lágrima de Schirmer-1, à presença de ceratite ulcerativa e à média da quantidade de sinais clínicos de animais do estudo retrospectivo de ceratoconjuntivite seca realizado no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre outubro de 2004 e janeiro de 2011.

DISCUSSÃO

Foram observados, em média, três sinais clínicos em cada animal com CCS, sendo relatados com maior frequência hiperemia conjuntival, secreção mucosa, neovascularização e pigmentação corneanas. Segundo SLATTER (2005), estes sinais, a exceção da pigmentação, fazem parte dos estágios iniciais da doença e são observados na grande maioria dos cães acometidos. Hiperemia conjuntival e secreção mucosa, presentes em 87% dos cães deste estudo, também foram referidos como os sinais clínicos mais frequentes no estudo retrospectivo de SANCHEZ et al. (2007), que avaliou de 229 cães com a doença. A pigmentação corneana, por sua vez, denota a cronicidade da afecção (SLATTER, 2005).

A análise estatística demonstrou correlação negativa entre os valores do TLS-1 e a quantidade de sinais clínicos, que diminuiu à medida que a produção lacrimal aumentou. Isso significa que, embora tratar afecções secundárias melhore o quadro clínico do animal, tratar apenas a deficiência na produção lacrimal já contribuirá para a diminuição da sintomatologia. Observou-se também que, com a evolução dos casos, a quantidade de sinais clínicos diminuiu levemente, sugerindo sucesso no tratamento. A CsA foi o medicamento mais utilizado, sendo prescrito para 92% dos cães. Segundo SLATTER (2005), entre 60 e 80% dos pacientes mostram aumento na produção lacrimal com o uso deste imunomodulador. Ao utilizá-lo, trabalhos recentes mostraram resultados semelhantes e relataram diminuição da progressão da CCS e dos sinais clínicos da doença (WILSON & PERRY, 2006; OFRI et al., 2009; DURÁN et al., 2010; DODI et al., 2010; SAHLI et al., 2010; TESSE et al., 2010).

No presente estudo, foi possível observar a importância da inflamação na patogenia da CCS, explicada por STEPHEN & PFLUGFELDER (2004) ao observar que três sinais do processo inflamatório (edema de córnea, neovascularização corneana e hiperemia conjuntival) apresentaram correlações negativas com os valores do TLS-1. THOMAS et al. (2009) e RAO (2010) explicaram essa correlação ao demonstrar que, com o aumento da produção lacrimal pelo uso de CsA, observa-se diminuição no infiltrado de linfócitos T CD4⁺ na glândula da terceira pálpebra e aumento na taxa de lisozimas, que atuam na imunidade da superfície ocular.

Além do imunomodulador, também foram prescritos antibióticos (principalmente cloranfenicol), antiinflamatórios (principalmente prednisona) e lacrimomiméticos. As correlações foram baixas entre tratamento e valores do TLS-1, demonstrando que foi seguido um protocolo terapêutico padrão, que não dependeu do nível de produção lacrimal de cada paciente. Segundo STEPHEN & PFLUGFELDER (2004), como não existe um teste capaz de mensurar a gravidade da inflamação, os antiinflamatórios devem ser prescritos quando os sinais clínicos não desaparecerem com o uso de lacrimomiméticos. Estes últimos devem ser utilizados apenas como adjuvantes, para lubrificação da superfície ocular (KOCH & SYKES, 2002). Os antibióticos, por sua vez, devem ser utilizados para controlar a carga bacteriana em animais cuja limpeza ocular não é adequada e/ou que apresentem úlcera corneana (CRISPIN, 2002; GELATT, 2003).

À análise estatística, foi observado padrão de prescrição de atropina associada a antiinflamatório para cães que apresentaram uveíte e de atropina associada a antibiótico para os que apresentaram úlcera corneana. Embora a atropina possa ser utilizada para o tratamento isolado de uveíte e úlcera (SLATTER, 2005), não é recomendada para cães com CCS, pois contribui para o ressecamento da superfície ocular, agravando o quadro clínico do animal. Contudo, em afecções graves, deve-se optar por tratar a úlcera, cuja resolução costuma ser rápida o bastante para que seu tratamento não influencie negativamente a produção lacrimal (BURGALASSI et al., 1999; DURSUN et al., 2002; GELATT, 2003; DARTT, 2009).

Ao correlacionar os sinais clínicos aos tratamentos, não foram obtidas diferenças significativas, mas se evidenciou que, quanto mais sinais clínicos, mais vezes por dia o animal recebeu CsA. Esse padrão segue as recomendações de DASTJERDI et al. (2009), que demonstraram a importância de estabelecer a frequência de administração do imunomodulador com base na gravidade da doença em cada paciente.

Quase metade dos animais com CCS apresentaram pelo menos uma doença concomitante, mas não foi observada correlação importante com os valores do TLS-1, ou seja, o surgimento da doença provavelmente não foi influenciado pela deficiência na produção lacrimal. No caso da catarata, por exemplo, a idade provavelmente influenciou seu surgimento, já que a maioria dos cães do estudo tinha mais de seis anos de idade (GELATT & CURTIR, 1983; KIRK et al., 2005). Ao

correlacionar as doenças concomitantes à quantidade de sinais clínicos, foram observados mais sinais em animais com mais de uma doença; resultado este esperado, já que as doenças relatadas apresentam diferentes sintomatologias.

As raças mais acometidas foram cocker spaniel, poodle e Yorkshire terrier, cuja predisposição à CCS já foi relatada por KOCH & SYKES (2002), GELATT (2003) e SLATTER (2005). Assim como no trabalho de OFRI et al. (2010), a raça cocker spaniel foi significativamente mais acometida e apresentou mais sinais clínicos que as outras. Ao correlacionar as raças aos valores do TLS-1, não houve diferença significativa, demonstrando que, ainda que exista uma predisposição, a doença parece afetar as raças de forma semelhante.

KASWAN et al. (1991) propuseram que a perda dos hormônios sexuais pode predispor cães mais velhos ao desenvolvimento de CCS e, neste estudo retrospectivo, o teste de Duncan demonstrou que, quanto mais velho o animal, menores os valores do TLS-1. No estudo de SANSOM & BARNETT (1985), utilizando 200 cães, a CCS acometeu cães com idade entre duas semanas e 12 anos, com média de 5 anos. SANCHEZ et al. (2007) relataram média semelhante, de 5,6 anos. No presente estudo, a idade variou entre dois meses e 16 anos, com média de 8 anos. Diferente do relato de AGUIRRE et al. (1971), em que foi observada distribuição bifásica da idade (entre 1 e 4 anos e entre 7 e 9 anos), a maioria dos cães tinha mais de 6 anos. Ao analisar as raças individualmente, os cães das raças cocker spaniel, poodle e SRD também ficaram na faixa acima de 6 anos. A raça cocker spaniel, que foi a mais acometida, apresentou média de idade de 9 anos, enquanto no estudo de SANCHEZ et al. (2007) a média foi de 7 anos. A diferença observada pode estar relacionada a um desenvolvimento mais tardio da doença em cães no DF ou, mais provavelmente, à demora em diagnosticá-la, já que poucos proprietários levam seus cães para avaliação anual.

A doença na raça Yorkshire terrier, por sua vez, teve duas distribuições de idade, entre 2 e 4 anos e acima de 6 anos. Assim como foi relatado por KOCH & SYKES (2002) e HERRERA et al. (2007), a raça, quando comparada às demais, foi acometida significativamente mais cedo. Este fato corrobora sua predisposição à CCS congênita, descrita por AGUIRRE et al. (1971), STADES et al. (1999) e WESTERMEYER et al. (2009). Segundo os autores, a doença sempre deve ser considerada em cães jovens de raças miniatura e *toy* com deficiência na produção

lacrimal e sem histórico de trauma, doença infecciosa, intoxicação ou cirurgia oftálmica.

Diferente de alguns autores, que relataram predisposição das fêmeas à CCS (SANSOM & BARNETT, 1985; BARNETT, 1988; LIGHTOWLER et al., 1993; HERRERA et al., 2007), não foi observada diferença entre os sexos, assim como nos trabalhos de AGUIRRE et al. (1971), MARTIN & KASWAN (1985) e OFRI et al. (2009). Contudo, ao teste de Duncan, os valores do TLS-1 das fêmeas foi significativamente menor que a dos machos, sugerindo que, no sexo feminino, a doença pode se apresentar de forma mais grave. Ao correlacionar o gênero à idade, não foi observada diferença significativa, mas, ao correlacionar às raças, observou-se que a maioria dos cockers spaniel era do sexo masculino, assim como no estudo de SANCHEZ et al. (2007).

Cães com TLS-1 <5mm/minuto foram os que mais apresentaram ceratite ulcerativa – segundo LAUS (1999), JONES (2001) e GALERA et al. (2009), a úlcera corneana é frequentemente observada como afecção secundária à CCS. Cães machos e com menos de dois anos apresentaram significativamente mais úlcera que fêmeas e cães mais velhos, respectivamente. Embora se acredite que a doença tenha sido secundária à CCS, a predisposição observada também pode estar relacionada a fatores comportamentais, já que os traumas estão entre os principais agentes etiológicos da úlcera (BRANDÃO et al., 2003) e ocorrem com maior frequência em machos jovens, que são mais ativos e se envolvem mais em brincadeiras e brigas (WRIGHT & NESSELROTE, 1987; HOROWITZ, 2009). Não foi observada correlação entre as raças e a presença de úlcera, diferente do trabalho de SANCHEZ et al. (2007), que relataram predisposição dos Cavalier King Charles spaniels e shih tzus.

Ao avaliar o perfil dos proprietários, observou-se que quase metade não levou o animal para consulta de retorno, demonstrando a importância de explicar detalhadamente para o proprietário, na primeira consulta, os efeitos da doença não controlada sobre a qualidade de vida e acuidade visual dos cães e enfatizar a necessidade de acompanhamento periódico.

CONCLUSÕES

As raças mais observadas foram cocker spaniel, poodle e Yorkshire terrier. A raça cocker spaniel foi a mais acometida e a que apresentou maior número de sinais clínicos.

A idade avançada manifestou-se como fator predisponente ao desenvolvimento da doença.

Não houve predisposição da CSS ao gênero.

Os sinais clínicos mais observados foram hiperemia conjuntival, secreção mucosa, neovascularização e pigmentação. A quantidade de sinais clínicos foi inversamente proporcional aos valores do TLS-1.

Quase metade dos animais apresentou ao menos uma doença concomitante, mas não houve correlação com os valores do TLS-1.

Lacrimoestimulante foi o medicamento mais utilizado. Sua frequência de prescrição apresentou correlação positiva com a quantidade de sinais clínicos.

A progressão dos casos apresentou correlação positiva com os valores do TLS-1.

Apenas 59% dos proprietários realizaram acompanhamento de seus animais.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE G.D.; RUBIN, L.D.; HARVEY, C.E. Keratoconjunctivitis sicca in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.148, p.1566-1579, 1971.

BARNETT, K.C. Keratoconjunctivitis sicca: sex incidence. **Journal of Small Animal Practice**, n.29, p.531-534, 1988.

BRANDÃO, C. V. S. CREMONINI, D. N. RANZANI, J. J. T. RODRIGUES, G. N. Avaliação e tratamento de úlceras de córnea em cães. **Revista Nosso Clínico**. São Paulo. ano 6, n. 34, p. 24-26, 2003.

BURGALASSI S, PANICHI L, CHETONI P, SEATTONE FM, BOLDRINI E. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. **Ophthalmic Research**, v.31, p.229-235, 1999.

CRISPIN, S. The lacrimal system. In: PETERSEN-JONES, S.; CRISPIN, S. (Eds.). **BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology**. England: BSAVA, 2^a edição, 2002. Cap. 6, 105-123p.

DARTT, D.A. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.28, p.155-177, 2009.

DASTJERDI, M.H.; HAMRAH, P.; DANA, R. High frequency topical cyclosporine 0,05% in the treatment of severe dry eye refractory to twice-daily regemen. **Cornea**, v.28, n.10, p.1091-1096, 2009.

DODI, P.L.; BIANCHI,E.; QUINTAVALLA, F. Cyclosporine A topical administration in dogs affected by immune-mediated keratoconjunctivitis sicca. **Acta Ophthalmologica**, v.88, 2010.

DURÁN, L.B.; PALAFOX, J.M.; QUINTELA, E.V.; ALCAZAR, J.A.; ALANÍZ, J.F. A comparative clinical trial of the efficacy of two different aqueous solutions of cyclosporine for the treatment of moderate-to-severe dry eye syndrome. **British Journal of Ophthalmology**, v.94, p.1312-1315, 2010.

DURSUN, D.; WANG, M.; MONROY, D.; LI, D.Q.; LOKESHWAR, B.; STERN, M.E.; PFLUGFELDER, C. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.43, n.3, p.632-638, 2002.

GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; ORIÁ, A P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J.L. Oftalmologia clínica e cirúrgica em pequenos animais. São Paulo: Roca, 1ª edição. 2009, 69-96.

GELATT, K. N. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 3ª edição, 2003. 197-211p.

GELATT, K.N.; CURTIR, R. Late-onset cataract in the Boston Terrier. **Veterinary Record**, v.183, p.99-102, 1983.

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.

HOROWITZ, A. Attention in domestic dog (*Canis familiaris*) dyadic play. **Animal Cognition**, v.12, p.107-118, 2009.

JONES, S. M. Oftalmopatias. Cap. 46. In: DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. Cap.46, 826-830p.

KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A.; LOTHROP, C.D. Interaction of age and occurrence of canine keratoconjunctivitis sicca. **Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology**, v.1, p.93-97, 1991.

KIRK, N.; GELATT, K.N.; MACKAY, E.O. Prevalence of primary breed-related cataracts in the dog in North America. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.2, p.101-111, 2005.

KOCH, S.A.; SYKES, J. Keratoconjunctivitis sicca. In: RIIS, R.C. **Small Animal Ophthalmology Secrets**. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002, cap.10, p.57-60.

LAUS, J. L. ORIÁ, A. P. Doenças corneanas em pequenos animais. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. São Paulo. v. 2, fascículo 1. p. 26-33, 1999.

LIGHTOWLER, C.H.; HERRERA, H.D.; GÓMEZ, N.V. Lacrimomimetic effect of topical cyclosporine A in canine KCS. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences**, v.30, p.233-241, 1993.

MARTIN, C.H.L., KASWAN, R. Distemper associated keratoconjunctivitis sicca. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.21, n.3, p.355-359, 1985.

OFRI, R.; LAMBROU, G.N.; ALLGOEWER, I.; GRAENITZ, U.; PENA, T.M.; SPIESS, B.M.; LATOUR, E. Clinical evaluation of pimecrolimus eyedrops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine. **The Veterinary Journal**, n.179, p.70-77, 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.

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.

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.. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, v.26, p.121-131, 1985.

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.

SLATTER, D. Sistema lacrimal. In: _____. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3ed. São Paulo: Roca. 2005. Cap.10, 259-282p.

STADES, F.C. Aparelho lacrimal. In: _____. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 1999, cap.6, p.54-63.

STEPHEN, C.; PFLUGFELDER, M.D. Antiinflammatory Therapy for Dry Eye. **American Journal of Ophthalmology**, v.13 , p.337-342, 2004.

TESSE, R., SPADAVECCHIA, L.; FANELLI, P.; RIZZO, G.; PROCOLO, U.; BRUNETTI, M.; CARDINALI, F.; MINIELLO, V.L.; BELLIZZI, M.; ARMENIO, L. Treatment of severe vernal keratoconjunctivitis with 1% topical cyclosporine in an Italian cohort of 297 children. **Pediatric Allergy and Immunology**, v.21, p.330-335, 2010.

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.

WILSON, S.E.; PERRY, H.D. Long term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. **Ophthalmology**, v.114, n.1, p.76-79, 2006.

WRIGHT, J.C.; NESSELROTE, M.S. Classification of behavior problems in dogs: distribution of age, breed, sex and reproductive status. **Applied Animal Behavior Science**, v.19, n.1-2, p.169-178, 1987.

CAPÍTULO III

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

INTRODUÇÃO

Descreve-se a ceratoconjuntivite seca (CCS) como a principal anormalidade quantitativa no filme lacrimal de cães. A doença consiste na deficiência da porção aquosa da lágrima e acomete entre um e 3,3% dos cães. Embora sua etiologia implique diversos agentes, a causa imunomediada é a principal delas.

O controle da CCS pode ser realizado com o advento dos lacrimoestimulantes e imunomoduladores, associados ou não a uma terapia de suporte. Contudo, ainda que amenize ou solucione os sinais clínicos, o tratamento é paliativo e, na maioria dos casos, necessita ser continuado por toda a vida do animal – exigindo grande colaboração por parte do proprietário. Além disso, exige não apenas empenho na administração do fármaco, mas também suporte financeiro, uma vez que terapias com imunomoduladores geram despesas mensais significativas, que podem desencorajar o tratamento. Ressalta-se, ainda, a existência de casos refratários à terapêutica adotada, o que reforça a necessidade de alternativas mais efetivas e menos dispendiosas.

Dentre as opções disponibilizadas por novos avanços na medicina humana, destaca-se a pesquisa com células-tronco (CT), cuja proposta no tratamento da CCS consiste em substituir as células originais lesionadas (tecido epitelial glandular) por células novas, capazes de produzir a fração aquosa do filme lacrimal em quantidades adequadas. O êxito na substituição celular implicaria melhora clínica definitiva do paciente, dispensando a necessidade de tratamentos tópicos a longo prazo.

As células de interesse para transplantes autólogos são as mononucleares, que podem apresentar multipotencialidade (células-tronco hematopoiéticas) ou pluripotencialidade (células-tronco mesenquimais). Mas, como ainda não está claro

qual dos dois tipos apresenta maior plasticidade (potencial de diferenciação), sugere-se utilizar a fração completa de células mononucleares (FCM).

A FCM pode ser facilmente obtida da colheita e centrifugação da medula óssea (MO). Com o protocolo descrito por BOYUM (1968) e modificado por TOGNOLI (2007), é possível obter entre 0,63 e $1,24 \cdot 10^8$ células e viabilidade celular acima de 90%. Considerando-se que 0,001 a 0,01% dessas células correspondem a células-tronco mesenquimais (CTM), o protocolo viabiliza estudos de autotransplante, já que a recomendação nesse caso é utilizar ao menos $2 \cdot 10^6$ células.

No início dos estudos com CT, alguns pontos ficaram em aberto, como as técnicas de colheita e separação da FCM, a melhor via para administração e a avaliação da eficiência do transplante. Hoje, sabe-se que a colheita de MO e o protocolo modificado por TOGNOLI et al. (2007) geram quantidade e viabilidade celulares adequadas, que a administração por via intralesional é a mais recomendada e que a utilização da FCM é eficaz, já que a presença das CT no local de implante pôde ser comprovada com a utilização de nanocristais (marcadores celulares).

O presente estudo visa avaliar a utilização da FCM como alternativa terapêutica em cães com deficiência na produção da fração aquosa do filme lacrimal. Contudo, antes de tratar cães acometidos, é importante criar, previamente, um protocolo aplicado ao tratamento da CCS, de colheita de MO, separação da FCM e administração por via subconjuntival palpebral, e descartar efeitos indesejáveis que possam agravar o quadro clínico do paciente.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado inicialmente em coelhos para, além de avaliar alterações na produção lacrimal decorrentes da administração da FCM, certificar que o procedimento não implicaria alterações que contraindicassem sua utilização em cães, como diminuição acentuada dos valores do Teste da Lágrima de Schirmer (TLS) e/ou degeneração da terceira pálpebra. Após obtenção e análise dos resultados dos coelhos, o experimento foi adaptado e realizado em cães.

1. ANIMAIS

Coelhos

Foram utilizados dez coelhos da raça New Zealand, machos e fêmeas, pesando aproximadamente 1kg, cedidos pelo Biotério da Universidade de Brasília (UnB). Os animais foram submetidos a tratamento antiparasitário com ivermectina 10mg.kg⁻¹ e alocados no alojamento da Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, onde passaram por ambientação e receberam água e comida *ad libitum*. Realizaram-se avaliações clínica e laboratorial (hemograma e perfil bioquímico) e exame oftalmológico de rotina (avaliação da superfície externa do olho e anexos e TLS-1¹) a fim de descartar afecções que pudessem contraindicar o experimento ou interferir em seus resultados. Os coelhos foram divididos aleatoriamente em dois grupos com cinco animais cada: R1 (animais controle) e R2 (animais tratados) (R=rabbits).

Cães

Foram utilizados 20 cães sem raça definida (SRD), machos e fêmeas, pesando aproximadamente 8kg, cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Brasília. Os cães foram vacinados (antirrábica e polivalente²) e submetidos a tratamentos antielmíntico³ (praziquantel 5mg.kg⁻¹, pamoato de pirantel 14,4mg.kg⁻¹ e

¹ Schirmer Tear Test – Intervet Schering-Plough Animal Health – Cotia, SP

² Nobivac®Canine – Intervet Schering-Plough Animal Health – Cotia, SP

³ Rico Composto 10kg – Ourofino Pet – Cravinhos, SP

febantel 15mg.kg⁻¹) e ectoparasitário (fipronil tópico e deltametrina⁴). Todos os animais passaram por ambientação de 30 dias para adaptação às condições locais. Durante todo o experimento, permaneceram em canil isolado, recebendo ração comercial de mesma marca e água potável *ad libitum*. Os canis tinham 1x1m de tamanho, com paredes de até 1m de altura, telas, portão de 1x1m e piso com desnível de 5° para frente.

Assim como os coelhos, os cães passaram por avaliações clínica e laboratorial e exame oftalmológico de rotina e foram selecionados apenas animais hígidos. Duas semanas antes da colheita de MO, os cães foram submetidos quatro vezes ao TLS-1 em ambos os olhos, com intervalos de dois dias entre os testes (dias -4, -3, -2 e -1). Em seguida, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, com dez animais cada: D1 (animais controle) e D2 (animais tratados) (D=dogs).

2. COLHEITA DA MEDULA ÓSSEA

Coelhos

Antes da colheita de MO (dia 0), os coelhos foram submetidos ao TLS-1 e posterior tricotomia do membro pélvico. Administrou-se medicação pré-anestésica (MPA) por via intramuscular, constituída de cloridrato de cetamina (30mg.kg⁻¹), associado a diazepam (7mg.kg⁻¹) e, em seguida, procederam-se indução e manutenção anestésica com halotano vaporizado em oxigênio a 100% em sistema aberto, com auxílio de máscara. Posicionados os pacientes, realizou-se antisepsia (protocolo iodo degermante, iodo PVPI e álcool 70%) e foram colocados panos de campo. Para a punção percutânea do fêmur esquerdo, adotou-se como referência o trocanter maior do fêmur, onde foi introduzida uma agulha Steis. O material permaneceu em uma seringa heparinizada (0,4ml de heparina sódica para cada 10ml de MO) até o momento da separação celular (Figura 4A). A analgesia pós-operatória consistiu em aplicações intramusculares de cetoprofeno (1mg.kg⁻¹) durante três dias e sulfato de morfina (1mg.kg⁻¹) a cada seis horas, totalizando 12 administrações.

⁴ Scalibor® - Intervet Schering-Plough Animal Health – Cotia, SP

Cães

No dia da colheita de MO (dia 0), realizou-se novamente o TLS-1 e, em seguida, os cães foram submetidos à tricotomia da região do esterno e à MPA, constituída de acepromazina ($0,02\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e morfina ($0,5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Após preparação de ambiente asséptico para colheita (mesmo protocolo dos coelhos), procedeu-se punção percutânea do esterno. Durante o procedimento, o animal permaneceu sentado, em contenção física, e foi utilizada agulha hipodérmica 40x12mm e seringa de 10ml heparinizada (mesmo protocolo dos coelhos) (Figura 4B). A analgesia pós-colheita consistiu em administração de tepoxalina⁵ ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) por via oral por dois dias consecutivos.

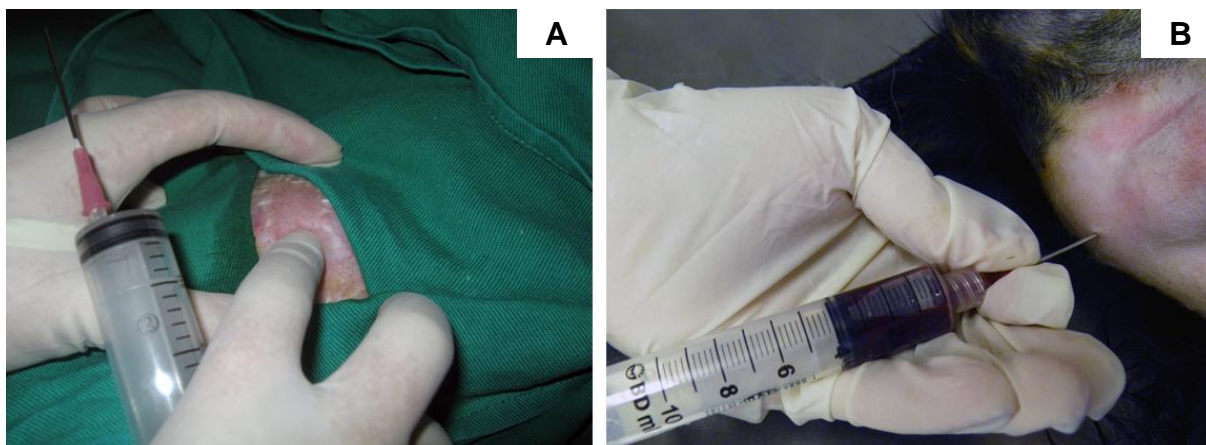


FIGURA 4 – Ilustração fotográfica demonstrando o procedimento de colheita de medula óssea em coelhos a partir do trocanter maior do fêmur (A) e de cães a partir do osso esternal (B).

3. ISOLAMENTO DA FCM

A MO dos coelhos e dos cães permaneceu acondicionada na seringa até a separação da FCM, que foi realizada em seguida. Para isolamento da FCM, utilizou-se a técnica de BOYUM (1968) modificada por TOGNOLI et al. (2007). No interior de uma capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e luz ultravioleta, a MO foi disposta em tubos Falcon de 15ml, com gradiente de

⁵ Zubrin® – Intervet Schering-Plough Animal Health – Cotia, SP

densidade⁶ de 1,077g.dl⁻¹, 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 5A). O halo contendo a FCM foi aspirado com uma pipeta automática (Figura 5B) e submetido a três lavagens com DMEM e soro fetal bovino e centrifugações consecutivas a 680G por 10 minutos, com o objetivo de remover o gradiente de densidade (Figura 6) – no material obtido dos cães, foram realizadas apenas duas lavagens. Obteve-se, então, um *pellet* uniforme no fundo do tubo, contendo a FCM da MO. O *pellet* foi ressuspenso em NaCl 0,9%, totalizando um volume final de 0,5ml.

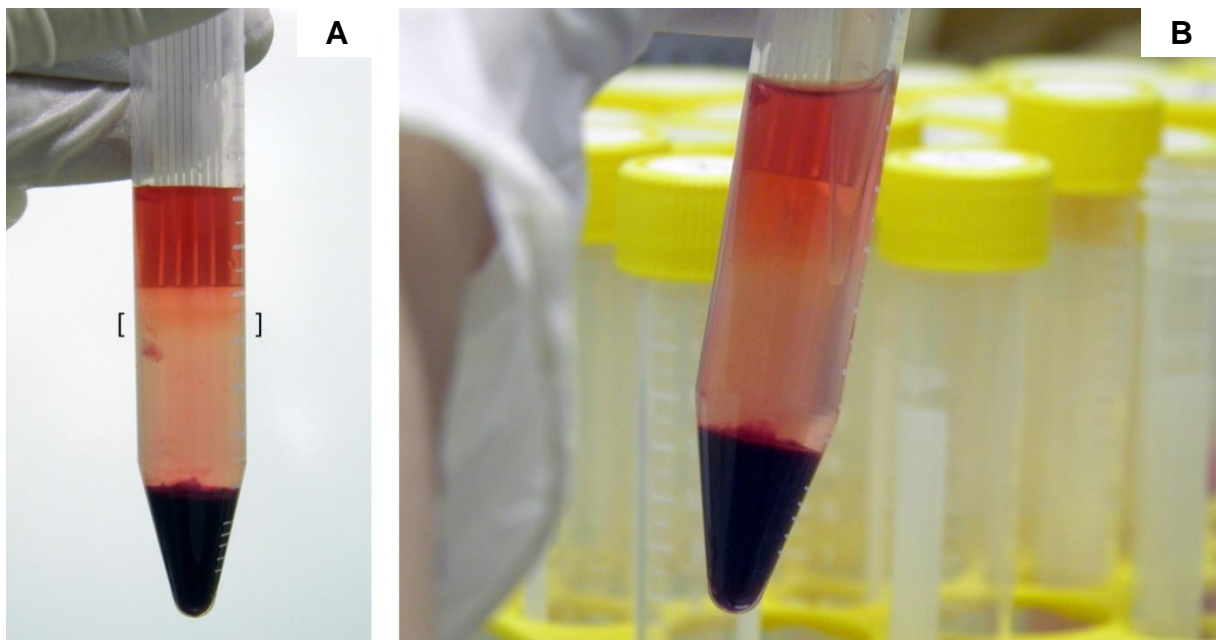


FIGURA 5 – Isolamento da fração de células mononucleares obtidas a partir da medula óssea. **A:** Tubo de Falcon de 15ml após centrifugação em gradiente de densidade de 1077g.dl⁻¹, com destaque para o halo. **B:** Aspiração da FCM com pipeta automática.

⁶ Histopaque 1077® – Sigma® – São Paulo, SP

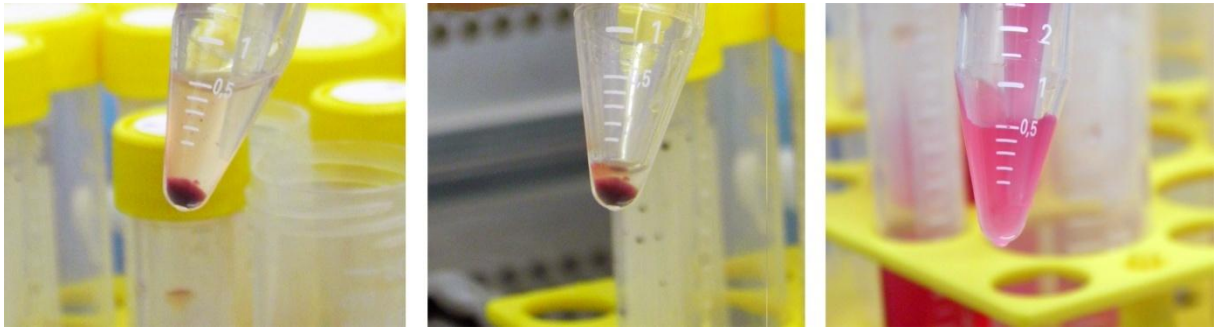


FIGURA 6 – Ilustração fotográfica do processo de lavagem em DMEM e soro fetal bovino do *pellet* obtido da fração de células mononucleares proveniente da medula óssea colhida de coelhos e de cães.

Ao término da incubação, retirou-se uma alíquota de 50µl da solução para quantificação celular e teste de viabilidade. Para tal, utilizou-se tubo individual de hemólise, no qual 0,05ml da FCM foram homogeneizados com um volume de 0,5ml de azul de trypan 1%. Com o auxílio da pipeta automática, a solução foi transferida para câmara de Neubauer para contagem celular e avaliação da viabilidade (Figura 7). Só foram aceitas quantidade maior que 2×10^6 células e viabilidade superior a 70%.

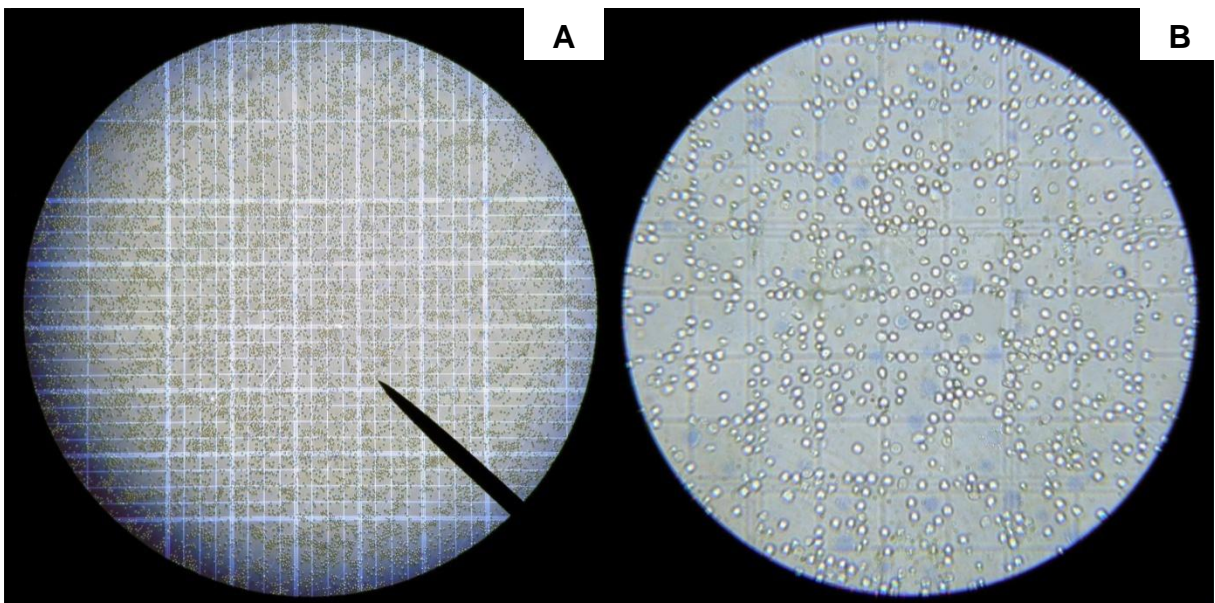


FIGURA 7 – Fotomicrografia em microscópio de luz da fração de células mononucleares submetida ao teste de viabilidade com azul de trypan 1%. Apenas células incolores foram consideradas viáveis. **A**: Aumento de 10x. **B**: Aumento de 40x.

4. ADMINISTRAÇÃO DA FCM

Coelhos

Os animais dos grupos controle (R1 e D1) foram submetidos à administração de solução salina estéril a 0,9% e os dos grupos tratados (R2 e D2), à administração de solução contendo FCM autóloga, ambos por via subconjuntival palpebral sobre a glândula da terceira pálpebra, a partir de sua superfície bulbar. Para o procedimento, foram utilizadas agulha 13x4,5 e seringa de 1ml. Antes da administração, utilizou-se colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%).

5. AVALIAÇÕES CLÍNICA E OFTALMOLÓGICA

Coelhos

Após administração da FCM autóloga, os coelhos foram monitorados diariamente por um mesmo avaliador por um período de 21 dias. A hiperemia ocular, o edema de córnea e a secreção ocular foram classificadas atribuindo-se valores +, ++, +++ e 0 para alterações leves, moderadas, severas e ausentes, respectivamente. O TLS-1 foi realizado nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 (Figura 8).

Cães

Os cães foram monitorados diariamente por um mesmo avaliador durante as duas primeiras semanas e, em seguida, a cada sete dias. Realizaram-se exames clínicos e TLS-1 nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45 e 60 (Figura 8). Assim como nos coelhos, a hiperemia ocular, o edema de córnea e a secreção ocular foram classificadas atribuindo-se valores +, ++, +++ e 0 para alterações leves, moderadas, severas e ausentes, respectivamente.

Em ambas as espécies, o TLS-1 foi realizado utilizando-se apenas contenção física. O teste foi feito com o olho do animal fechado, um olho de cada vez, sempre no mesmo horário.

6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Coelhos

Considerando dia zero o dia do transplante, no vigéssimo primeiro dia, todos os coelhos foram eutanasiados com sobredose anestésica (tiopental sódico na dose de 60mg.kg^{-1} por via intravenosa) e submetidos à exérese da terceira pálpebra para avaliação histológica (Figura 8). A terceira pálpebra foi fixada em formol tamponado a 10% por um período mínimo de dez dias e emblocada em parafina. A seguir, foi submetida a cortes histológicos com micrótomo, que foram dispostos sobre lâminas de microscopia e corados com hematoxilina-eosina.

Cães

Diferentemente dos coelhos, foi realizada colheita apenas de fragmento da terceira pálpebra (0,3mm de diâmetro), pois a retirada completa da glândula comprometeria a produção do filme lacrimal, diminuindo a qualidade de vida dos animais. Para avaliação histológica, os cães foram submetidos à anestesia tópica e intravenosa, com propofol (5mg.kg^{-1}). Realizou-se colheita de fragmento da glândula da terceira pálpebra de aproximadamente 2mm, com auxílio de pinça colibri e tesoura, dos olhos direito nos dias 1, 4 e 7 após a administração de FCM autóloga, utilizando-se doze animais (seis do D1 e seis do D2) nas duas primeiras colheitas e oito animais (quatro do D1 e quatro do D2) na última colheita (Figura 8). As amostras passaram pelos mesmos procedimentos descritos para os coelhos. Após a colheita de fragmento, o olho direito não participou mais do experimento – as avaliações oftálmicas passaram a ser realizadas apenas no olho esquerdo. Ao final do experimento, todos os cães foram doados.

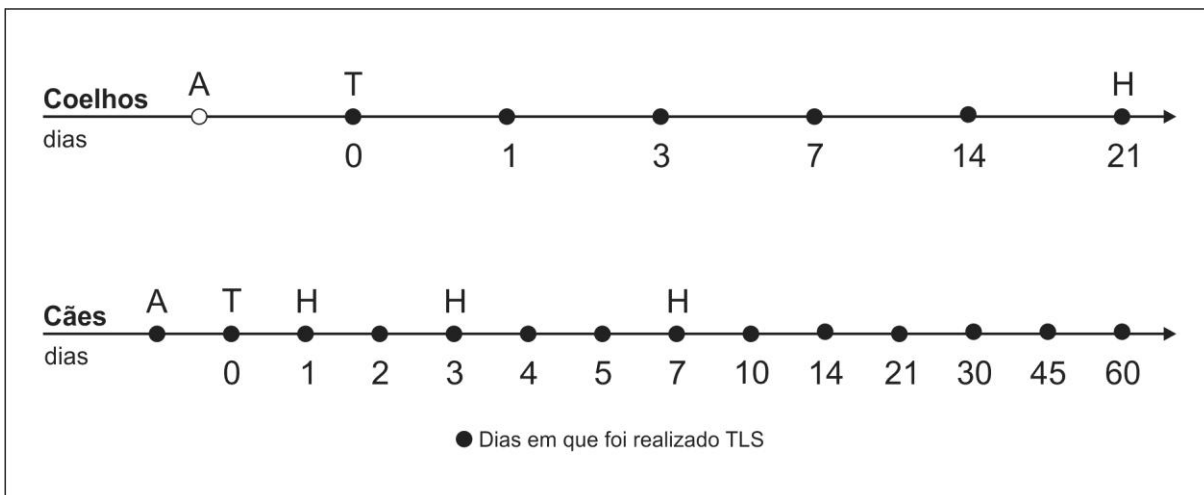


Figura 8 – Cronograma das avaliações clínica, oftalmológica e histológica dos coelhos e dos cães. A=ambientação; T=administração de solução salina no R1 e no D1 e de FCM no R2 e no D2; H=colheita de fragmento para histologia.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do TLS-1 de ambos os olhos foram analisados utilizando-se procedimentos de análise de variância, com medidas repetidas no tempo. Foram avaliados em função do dia, olho, tratamento e de suas interações, bem como da diferença entre a produção média no dia 0 (zero) e nos demais dias de avaliação. As análises foram feitas com o software SAS, utilizando os procedimentos General Linear Model (GLM) e Correlação (CORR). A diferença entre os tratamentos foi calculada utilizando o teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

8. COMITÊ DE ÉTICA

O experimento descrito foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (processo número 36976/2008, do dia 01/10/2008, sob responsabilidade da professora Paula Diniz Galera), por estar de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

RESULTADOS

Coelhos

Às avaliações clínicas realizadas após a administração de solução salina (R1) e solução salina + FCM autóloga (R2), não foram observados sinais clínicos. Durante todo o período de avaliação, os coelhos permaneceram hígidos. Ao TLS-1, foram obtidos os dados apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Resultados do Teste da Lágrima de Schirmer-1 em mm/minuto realizado em coelhos após administração de solução salina (R1) e de solução salina + FCM (R2).

	Animal	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
R1	1	04	06	05	06	07	07
	2	01	03	03	07	08	08
	3	03	09	02	03	06	06
	4	03	03	04	06	06	06
	5	04	10	04	08	03	03
R2	1	04	10	02	05	08	08
	2	03	03	02	05	08	08
	3	04	04	04	06	07	07
	4	06	06	07	05	10	10
	5	03	04	06	11	05	05

Ao analisar estatisticamente cada grupo, houve tendência à diferença no R1 ($P=0,0532$) e diferença no R2 ($P=0,0423$) quanto aos dias de avaliação. Segundo o teste de Duncan ($P\leq 0,05$), após administração de solução salina no R1, foram obtidos valores mais altos do TLS-1 em todos os dias de avaliação. No R2, após administração de solução salina + FCM autóloga, também houve aumento nos valores do TLS-1, que foram significativamente maiores nos dias 14 e 21 (Tabela 3).

TABELA 3: Teste de Duncan aplicado às médias do Teste da Lágrima de Schirmer-1 realizado nos coelhos após administração de solução salina (R1) e de solução salina + FCM (R2) ($P \leq 0,05$).

Dia	Médias R1	Médias R2
0	3,0b	4,0b
1	6,2a	5,4ab
3	3,6ab	4,2b
7	6,0a	6,4ab
14	6,0a	7,6a
21	6,0a	7,6a

À avaliação histopatológica da glândula da terceira pálpebra, foram observados congestão e edema em todas as amostras, infiltrado linfoplasmocítico discreto focal em quatro dos coelhos do R2 (80%), infiltrado polimorfonuclear discreto focal em um coelho do R1 (20%) e presença de fibroblastos em quatro coelhos do R2 (80%) (Tabela 3).

Cães

À contagem celular da FCM, foram observados valores entre $1,59.10^7$ e $8,48.10^7$ células (média de $3,59.10^7$) e viabilidade celular entre 95,65 e 99,37% (média de 98,13%).

Às avaliações clínicas realizadas após administração de solução salina (D1) e solução salina + FCM autóloga (D2), não foram observados edema de córnea ou secreção ocular. Contudo, observou-se hiperemia conjuntival em pelo menos um dia de avaliação em 60% dos cães do D1 e em 70% dos cães do D2. Ao comparar D1 e D2 quanto à presença de hiperemia, não foi observada diferença significativa. Mas, ao analisar as médias dentro dos grupos, foi encontrada diferença significativa entre os dias de avaliação no D1 ($P=0,0009$) e no D2 ($P=0,0161$). Ao aplicar o teste de Duncan ($P \leq 0,05$), detectou-se diferença apenas no D1, em que o índice de hiperemia nos dias 1 e 2 foi significativamente maior que em todo o resto da avaliação (Tabela 4).

TABELA 4 – Teste de Duncan aplicado às médias de hiperemia dos cães observadas após administração de solução salina (D1) e de solução salina + FCM (D2) ($P \leq 0,05$).

Dia	D1	D2
1	0,55a	0,21a
2	0,53a	0,29a
3	0,35abc	0,53a
4	0,47ab	0,47a
7	0,50ab	0,57a
10	0,20abc	0,40a
14	0,20abc	0,40a
21	0,10bc	0,20a
30	0c	0,10a
45	0c	0a
60	0c	0a

Ao TLS-1, foram obtidos os dados apresentados nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - Resultados do Teste da Lágrima de Schirmer-1 em mm/minuto em cães do D1 realizado após administração de solução salina. O primeiro valor representa o olho direito e o segundo, o olho esquerdo. H=fragmento colhido para histologia.

Animal	Dia -4	Dia -3	Dia -2	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	31-26	30-28	30-24	30-28	30-29	19-19	29-31	26-28
2	23-25	26-25	22-26	25-28	24-24	21-19	24-26	24-27
3	27-26	26-28	28-24	26-28	26-21	20-26	28-28	24-23
4	22-23	24-27	22-21	25-22	23-24	20-16	26-28	22-23
5	27-25	21-24	24-27	26-24	25-24	17-18	28-24	23-25
6	22-20	20-24	22-20	22-24	22-24	21-15	H-26	H-25
7	21-25	25-23	24-24	26-24	24-24	17-21	H-21	H-21
8	26-24	28-24	28-19	31-28	28-25	20-25	H-24	H-22
9	31-32	30-27	30-28	30-27	30-27	19-17	29-29	26-31
10	23-23	26-21	22-25	25-24	24-23	21-15	24-23	24-24

Animal	Dia 4	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21	Dia 30	Dia 45	Dia 60
1	30-26	27-26	H-25	H-23	H-25	H-27	H-27	H-25
2	28-28	H-25	H-23	H-21	H-28	H-28	H-25	H-21
3	30-26	H-19	H-24	H-26	H-25	H-30	H-24	H-24
4	22-27	21-24	H-25	H-21	H-21	H-23	H-22	H-23
5	24-29	32-24	H-25	H-25	H-24	H-26	H-24	H-26
6	H-22	H-22	H-22	H-20	H-25	H-23	H-24	H-23
7	H-22	H-16	H-24	H-27	H-24	H-23	H-24	H-23
8	H-27	H-24	H-25	H-25	H-25	H-25	H-24	H-25
9	30-30	27-24	H-28	H-28	H-28	H-28	H-28	H-29
10	28-24	H-24	H-24	H-24	H-24	H-25	H-24	H-26

TABELA 6 - Resultados do Teste da Lágrima de Schirmer-1 em mm/minuto em cães do D2 realizado após administração de solução salina. O primeiro valor representa o olho direito e o segundo, o olho esquerdo. H=fragmento colhido para histologia.

Animal	Dia -4	Dia -3	Dia -2	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	23-20	24-23	21-19	25-23	25-23	23-23	22-23	27-26
2	20-17	23-21	22-18	21-19	25-23	20-20	24-27	23-20
3	24-19	25-17	25-21	25-24	22-20	24-26	25-25	22-27
4	26-22	22-25	20-20	24-21	20-19	26-26	24-25	30-28
5	24-24	27-27	23-23	18-19	23-23	24-24	28-25	29-24
6	24-21	23-24	24-18	23-22	26-28	24-22	19-26	23-23
7	26-29	30-28	21-15	25-20	30-15	26-19	20-20	20-18
8	19-22	23-21	17-17	19-22	22-20	19-20	H-22	H-23
9	17-14	19-19	20-18	18-17	17-14	17-18	H-18	H-20
10	20-20	25-24	20-24	26-23	23-22	20-23	H-25	H-23

Animal	Dia 4	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21	Dia 30	Dia 45	Dia 60
1	23-23	25-24	H-29	H-29	H-29	H-29	H-31	H-31
2	21-23	31-26	H-20	H-21	H-25	H-21	H-30	H-29
3	22-24	22-20	H-27	H-26	H-26	H-21	H-25	H-23
4	24-28	25-25	H-26	H-26	H-28	H-25	H-21	H-27
5	27-24	H-25	H-25	H-26	H-28	H-21	H-24	H-25
6	26-24	H-19	H-28	H-28	H-29	H-24	H-22	H-25
7	21-16	H-18	H-22	H-17	H-18	H-17	H-24	H-21
8	H-21	H-21	H-21	H-24	H-18	H-20	H-25	H-20
9	H-18	H-18	H-18	H-20	H-21	H-20	H-22	H-22
10	H-18	H-18	H-25	H-24	H-24	H-23	H-28	H-30

Ao analisar as médias do TLS-1, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os dias de avaliação no D1 ($P < 0,0001$) e no D2 ($P = 0,0063$). Ao aplicar o teste de Duncan ($P \leq 0,05$) no D1, detectou-se diminuição significativa dos valores do TLS-1 no dia seguinte ao tratamento e aumento significativo nos dias 2 e 4, sendo que, a partir do dia 10, as médias foram consideradas estatisticamente semelhantes às obtidas antes do tratamento. No D2, foi demonstrado aumento significativo na produção lacrimal no dia 60 quando comparado ao dia 0 e, diferente do D1, não houve diminuição dos valores de TLS-1 durante a avaliação (Tabela 7).

De acordo com as correlações de Pearson, no D1, o índice de hiperemia apresentou correlação negativa moderada com os dias de avaliação (-0,45) e leve com os valores de TLS-1 (-0,11). Os valores de TLS-1, por sua vez, não apresentaram correlação relevante com a evolução do caso. No D2, o índice de hiperemia apresentou correlações negativas moderadas com a evolução do caso (-0,34) e com os valores de TLS-1 (-0,21). E os valores de TLS-1 apresentaram correlação positiva moderada com os dias de avaliação (0,23).

À avaliação histopatológica, não houve presença da glândula nas amostras 3, 16 e 18, o que as tornou impróprias para conclusão diagnóstica. Nas amostras viáveis, foram observados congestão em seis cães do D1 (60%) e seis do D2 (60%), hemorragia em quatro cães do D1 (40%) e seis do D2 (60%), infiltrado linfoplasmocítico em um cão do D1 (10%) e cinco do D2 (50%) e infiltrado neutrofílico em dois cães do D2 (20%) (Figura 9).

TABELA 7 – Teste de Duncan aplicado às médias do Teste da Lágrima de Schirmer-1 realizado nos cães após administração de solução salina (D1) e de solução salina + FCM (D2) ($P \leq 0,05$).

Dia	D1	D2
0	25,06ab	21,81c
1	19,05c	22,60abc
2	26,29a	23,41abc
3	24,53ab	23,88abc
4	26,12a	22,53abc
7	23,43b	22,64abc
10	24,50ab	24,10abc
14	24,00ab	24,10abc
21	24,90ab	24,60abc
30	25,80ab	22,10bc
45	24,60ab	25,20ab
60	24,50ab	25,30a

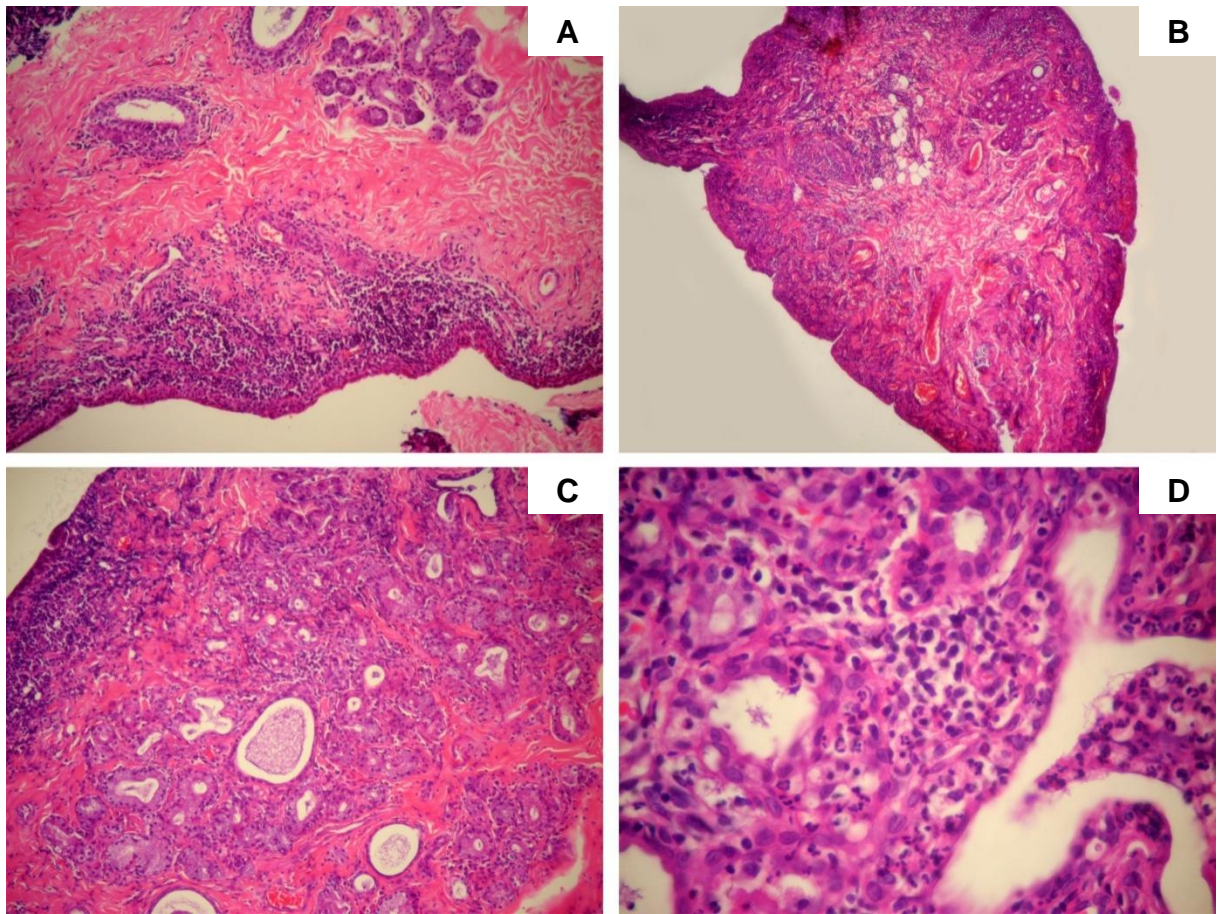


FIGURA 9 – Lâminas de histologia do fragmento da terceira pálpebra de cães em microscópio de luz colhido após administração de solução salina (D1) e solução salina + FCM (D2) ($P \leq 0,05$). **A:** Nada digno de nota (aumento 10x). **B:** Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico difuso (aumento 4x). **C:** inflamatório linfoplasmocítico difuso (aumento 10x). **D:** Infiltrado inflamatório neutrofílico (aumento 40x).

DISCUSSÃO

O sucesso na obtenção de CT, segundo RASKIN (1998) está diretamente relacionado à quantidade do material colhido, determinada pelo tipo de agulha utilizada e do local escolhido para punção. Sabendo disso e almejando um procedimento seguro, foi utilizada agulha Steis nos coelhos, para colheita a partir do trocânter maior do fêmur. Optou-se pela Steis porque, ainda que as agulhas de Jamshidi e de mielograma sejam as de eleição para infusões ósseas (JÚNIOR et al., 2008), em casos de transplante de FCM, em que geralmente é necessário um volume maior de material, sugere-se utilizar agulhas mais calibrosas, que otimizam e agilizam a colheita (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009; MÜLLER et al., 2009; OLSSON, 2009) – a importância de diminuir o tempo cirúrgico ficou nítida no trabalho de EÇA et al. (2009), uma vez que foram a óbito todos os animais cujo procedimento durou mais que uma hora e sobreviveram aqueles em que a duração foi de até 30 minutos.

O trocânter maior do fêmur foi o sítio escolhido para colheita em coelhos por ser de fácil localização e permitir obtenção de grande volume de células mononucleares (KADIYALA et al., 1997; EÇA et al., 2009). Outros sítios frequentemente utilizados são crista ilíaca, área transilíaca e região epifisária proximal do úmero (RASKIN, 1998), sendo que, desses, o primeiro é o mais recomendado. Contudo, apesar de a crista ilíaca também ser de fácil localização, EÇA et al. (2009) e MÜLLER et al. (2009) demonstraram que ela não permite uma colheita segura e eficaz em animais de pequeno porte e, por isso, não foi utilizada no experimento.

Embora o resultado da colheita nos coelhos tenha sido satisfatório, já que a agulha Steis permitiu um procedimento rápido e bem sucedido, ela não se mostrou estritamente necessária para o protocolo aplicado ao tratamento da CCS, pois, para a administração da FCM por via subconjuntival palpebral, é possível conseguir quantidades celulares adequadas com volumes pequenos de MO. Por isso, optou-se por utilizar, nos cães, agulha hipodérmica 40x12mm, recomendada por CASTANIA (2007). Segundo o autor, além de ter custo mais baixo e ser mais facilmente encontrada – o que torna o tratamento mais acessível –, a agulha hipodérmica

causa menor prejuízo vascular à cortical óssea, contribuindo, assim, para um pós-operatório menos doloroso.

Nos cães, o local escolhido para punção foi o osso esterno, local também utilizado por MASSUMOTO et al. (1997) em humanos, cujo trabalho relata ausência de complicações. Por dispensar anestesia geral, a colheita a partir do esterno pôde ser realizada no ambulatório anestésico, tornando o procedimento mais seguro e viável para a rotina da clínica veterinária.

No Hospital Veterinário da FAV-UnB, punções esternais são realizadas com frequência, sem sedação, e servem para fins diagnósticos. Com o procedimento, obtém-se entre 0,5 e 1,5ml de MO por animal, sendo que, ao tentar puncionar volumes maiores, os cães mostram-se inquietos, indicando desconforto e dor. Para viabilizar o experimento, em que eram necessários no mínimo 4ml de MO, administrou-se MPA aproximadamente 30 minutos antes da colheita, o que tranquilizou os animais e permitiu a obtenção de volumes até dez vezes maiores que os da rotina.

Após a colheita de MO, todos os animais de ambas as espécies apresentaram-se hígidos durante todos os dias de avaliação. Diferente do experimento de EÇA et al. (2009), não ocorreram óbitos durante o transoperatório, provavelmente porque a colheita nos coelhos foi rápida (os animais ficaram pouco tempo sob anestesia geral) e porque nos cães foi realizada apenas MPA.

Ao submeter a MO dos cães ao protocolo de separação sugerido por BOYUM (1967) e modificado por TOGNOLI et al. (2007), obteve-se média de $3,59 \cdot 10^7$ células mononucleares – quantidade considerada adequada para transplantes (GENGOZIAN, 2000; GUARITA-SOUZA, 2005). Ao analisar outros trabalhos, observa-se que a quantidade celular é diretamente influenciada pelo volume de MO, pelo volume final da suspensão e pelo local de colheita. TREICHEL (2010) colheu $5 \text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ de MO do fêmur e obteve $2,49 \cdot 10^7$ células, TOGNOLI (2008) e OLSSON (2009) colheram entre 10 e $15 \text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ do fêmur e obtiveram $5,6 \cdot 10^7$ e $4,22 \cdot 10^8$, COLOMÉ (2007) colheu aproximadamente 1,5ml do tubérculo maior do úmero e obteve $1 \cdot 10^6$, enquanto BARROS et al. (2001), SAMOTO (2006) e VAZ (2006) colheram aproximadamente 50ml da crista ilíaca e obtiveram quantidades celulares menores que $2 \cdot 10^5$.

A viabilidade celular foi de 98%, sendo superior às médias de TOGNOLI (2008), ALVES et al. (2009), OLSSON (2009), SALBEGO (2010) e TREICHEL (2010), que obtiveram, respectivamente, 95, 87, 90, 95 e 91%. O aumento na viabilidade celular observado neste experimento pode estar relacionado à realização de apenas duas lavagens do *pellet* com FCM, que diminuiu o tempo do procedimento e, conseqüentemente, o índice de morte celular.

Após administração de solução salina e solução salina+FCM autóloga, a única alteração clínica observada foi hiperemia conjuntival, que acometeu cães do D1 e do D2. A hiperemia surgiu no dia seguinte à inoculação, com diminuição gradativa, desaparecendo completamente entre os dias 30 e 45. Ao comparar os grupos, não houve diferença significativa quanto aos sinais clínicos, demonstrando que a hiperemia conjuntival decorreu do processo de inoculação, cuja perfuração gerou inflamação local (YANOFF & SASSANTU, 2009), e não pela presença de células mononucleares. No D2, grupo que recebeu a FCM autóloga, não foi observada diferença significativa no índice de hiperemia ao comparar os dias de avaliação, ou seja, não houve pico inflamatório. Estes dados viabilizam o modelo experimental de administração de FCM por via subconjuntival palpebral em cães, pois demonstram ausência de rejeição às células transplantadas e de complicações oculares que contraindiquem o procedimento.

Após a inoculação, os resultados do TLS-1 não ficaram abaixo dos valores considerados normais por ABRAMS et al. (1990) e SLATTER (2005) em nenhum dia de avaliação, ou seja, o procedimento não prejudicou a produção lacrimal dos animais. Pelo contrário, observou-se aumento nas médias dos grupos controle e tratado, indicando que o estímulo da administração por via subconjuntival aumentou os valores do TLS-1 independente da presença de células mononucleares na solução. Contudo, foi observado estímulo maior nos grupos tratados, pois, nos coelhos, o aumento dos valores do TLS-1 só foi significativo no grupo R2 e, nos cães, só durou por mais que duas semanas no D2. Enquanto no D1 as médias do dia dez ao dia 60 pós-inoculação foram estatisticamente semelhantes às obtidas antes do tratamento, no D2 houve aumento durante todos os dias de avaliação e, ao comparar as médias do dia zero e do dia 60 após administração de células mononucleares, houve aumento de 3,5mm na produção lacrimal. Ou seja, mesmo num grupo com animais saudáveis, que produzem filme lacrimal em quantidades

consideradas normais, o tratamento aumentou significativamente os valores do TLS-1 ($P=0,0063$).

Recentemente, alguns autores testaram a FCM autóloga no tratamento de doenças ósseas, cutâneas e oftálmicas, mas os resultados não foram tão positivos quanto os relatados acima. Nos experimentos de COLOMÉ (2007), GOMES (2008) e TREICHEL (2010), em regeneração do nervo tibial e cicatrização cutânea de feridas experimentais e do autoenxerto em defeitos mandibulares, todos realizados em coelhos, a FCM pareceu influenciar positivamente o reparo dos tecidos. Mas, em nenhum dos casos, houve efeito estatisticamente significativo. Nos experimentos de TOGNOLI (2008), OLSSON (2009) e SALBEGO (2010), em cicatrização corneana de úlceras experimentais, regeneração do tecido tendíneo e correção de defeito ósseo segmentar femoral, todos realizados em cães, não houve qualquer benefício com a administração da FCM autóloga. Nos trabalhos citados, a ausência de uma resposta favorável à administração das células mononucleares pode ter ocorrido devido ao curto período de avaliação, já que a maioria acompanhou os animais por, no máximo, um mês e as alterações mais significativas observadas no presente estudo ocorreram 60 dias após o tratamento. No estudo de HANS et al. (2005), por exemplo, foi observada melhora do quadro de cardiopatia isquêmica grave em humanos após administração de FCM por via transendocárdica, sendo que os efeitos do tratamento foram avaliados durante um período de seis meses.

Ao exame histológico, foram observados congestão, hemorragia e infiltrado linfoplasmocítico leve a moderado, que, por estarem presentes no D1 e no D2, provavelmente não decorreram da presença de células mononucleares. Estes achados, que foram classificados de leve a moderado, provavelmente surgiram do processo de inoculação, em que houve perfuração da terceira pálpebra e distensão do tecido pela injeção de solução salina e FCM autóloga, desencadeando um processo inflamatório. A presença de leucócitos em duas amostras do D2, contudo, é importante, pois sugere que houve contaminação da agulha ou da FCM durante seu processamento. Apesar de os achados histológicos serem moderados e não terem gerado alterações clínicas, fica evidenciada a importância de isolar a FCM em câmara de fluxo laminar e administrá-la em ambiente asséptico, a fim de evitar contaminações.

CONCLUSÕES

A colheita a partir do esterno, utilizando agulha hipodérmica 40x12mm, em cães submetidos à MPA, é fácil, segura, eficaz e viável para o transplante subconjuntival palpebral na clínica veterinária.

O volume de MO obtido gerou quantidade e viabilidade celulares adequadas.

A administração de FCM autóloga na glândula da terceira pálpebra de coelhos e de cães mostrou-se viável, segura e sem efeitos deletérios.

As administrações subconjuntivais de solução salina e de solução salina + FCM autóloga aumentaram significativamente os valores do TLS-1. Os valores do TLS-1 no grupo de cães tratados foi 3,5mm maior após 60 dias do tratamento.

A aplicação da FCM autóloga na terceira pálpebra é um tratamento promissor para a CCS em cães.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro, que possibilitou a continuidade da pesquisa.

Às empresas Intervet Schering-Plough Animal Health, Ourofino Pet e Brasília Alimentos S.A. (BASA), por cederem os produtos Schirmer Tear Test, Nobivac®Canine, Zubrim®, Rico Composto 10kg e ração Bomguy Premium, utilizados ao longo do experimento.

Ao Dr. Cássio Ribeiro, por oferecer as instalações do canil e pela ajuda ao longo do experimento.

Às médicas veterinárias Mariana, Hetielle, Samara, Carol e Cristiane, cujo auxílio foi fundamental para a realização e a conclusão do projeto.

REFERÊNCIAS

ABRAMS, K.L.; BROOKS, D.E.; FRUNK, R.S.; THERAN, P. Evaluation of the Schirmer Tear Test in clinically normal rabbits. **American Journal of Veterinary Research**, v.12, p.1912-1913, 1990.

ALVES, A.L.G.; VIEIRA, M.E.M.; BARREIRA, A.P.B.; MOTA, L.S.L.S.; SAITO, M.E.; KOHAYAGAWA, A.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J.; OLIVEIRA, P.G.G. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medulla óssea de equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.4, p.650-655, 2009.

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.

CASTANIA, V.A. **Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena**. São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2007. 67f. Tese (Doutorado em Ortopedia. Traumatologia e Reabilitação).

COLOMÉ, L.M. **Avaliação do envolvimento das células-tronco autólogas de medula óssea em associação com a técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração de nervo tibial de coelhos**. Santa Maria, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

EÇA, L.P.; RAMALHO, R.B.; OLIVEIRA, I.S.; GOMES, P.O.; PONTES, P.; FERREIRA, A.T.; MAZZETTI, M.P.V. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.5, p. 400-404, 2009.

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.

GOMES, C. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com autoenxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, M.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWIWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J.R.; BROFMAN, P. Comparison of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infarction. **Brazilian Journal Cardiovascular Surgery**, v.20, n.3, p.270-278, 2005.

HANS, F.R.D.; 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.; DOHMAN, 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.

JUNIOR, I.F.; CARVALHO, M.V.; LIMA, G.M. **Punção e infusão intra-óssea**. Acessado em 28 abr. 2011. Online. Disponível em: www.uff.br/ph/artigos/intraossea.pdf.

KADIYALA S.; YOUNG, R.G.; T.IEDE, M.A., BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplant**, v.6, n.2, p.125-134, 1997.

MASSUMOTO, C.M.S.; MIZUKAMI, S.; CAMPOS, M.F.; SILVA, L.A.G.; MENDRONE Jr., A.; SAKAS.ITA, A.; ZAMBON, E.; OSTRONOFF, M.; MACEDO, M.C.A.; MEDEIROS, R.; DORL.IAC, P.; CHAMONE, D.; DULLEY, F. Criopreservação de

medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.43, n.2, p.93-98, 1997.

MÜLLER, D.C.M.; PIPPI, N.L.; BASSO, 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, p. 2243-2251, 2009.

OLIVEIRA, G.K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

OLSSON, D.C. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medulla óssea na lesão iatrogênica de tendão de calcâneo em cães**. Santa Maria, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 106f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

RASKIN, R. Medula óssea. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de pequenos PAimais**. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 64, 1135-1142p.

SALBEGO, F.Z. **Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea**. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010. 211 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

SAMOTO, V.Y. **Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães e gatos srd**. São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências).

SLATTER, D. Córnea e esclera. In: _____. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 11, 283 – 338p.

TOGNOLI, G.K. **Autotransplante da Fração Mononuclear da Medula Óssea em Úlcera Corneana por Hidróxido de Sódio Experimental em Cães**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2008. 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. Isolamento, quantificação e viabilidade da fração total de células mononucleares da medula 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.; 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: Universidade Federal de Santa Maria, 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

VAZ, C.E.S. **Avaliação do efeito de centrifugação osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas: estudo experimental em coelhos**. São Paulo, Faculdade de Medicina de São Paulo, 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ortopedia e Traumatologia).

YANOFF, M; SASSANTU, J.W. **Ocular Pathology**. Mosby Elsevier, 6ª edição. 2005, 789p.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No experimento, demonstrou-se não haver contraindicações para a administração subconjuntival palpebral sobre a glândula da terceira pálpebra da fração autóloga de células mononucleares obtida da medula óssea. Tendo sido comprovada a viabilidade e a segurança do procedimento e sabendo-se que a inoculação tem efeito positivo na produção lacrimal, o próximo passo é avaliar a influência das células mononucleares na fisiologia da glândula da terceira pálpebra de cães com ceratoconjuntivite seca. Além disto, verificar se, mesmo mediante eventual regeneração da glândula da terceira pálpebra, o caráter imunomediado da CCS afetará esta estrutura novamente.