



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Rodolfo Malagó

**ESTUDO CLÍNICO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES  
PORTADORES DO DEFEITO EPITELIAL CORNEANO CRÔNICO ESPONTÂNEO**

CAMPINAS

2020

RODOLFO MALAGÓ

ESTUDO CLÍNICO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES  
PORTADORES DE DEFEITO EPITELIAL CORNEANO CRÔNICO ESPONTÂNEO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área  
de concentração Oftalmologia.

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO RODOLFO MALAGÓ,  
E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

CAMPINAS

2020

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

M29e Malagó, Rodolfo, 1980-  
Estudo clínico da aplicação de células-tronco mesenquimais em cães portadores do defeito epitelial corneano crônico espontâneo / Rodolfo Malagó. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

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

1. Células mesenquimais estromais. 2. Tecido adiposo. 3. Ceratite. 4. Cão. 5. Terapia celular. I. Vasconcellos, José Paulo Cabral de, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Clinical study of mesenchymal stem cell application in dogs with spontaneous chronic corneal epithelial defect

**Palavras-chave em inglês:**

Stromal mesenchymal cells

Adipose tissue

Keratitis

Dog

Cell therapy

**Área de concentração:** Oftalmologia

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

José Paulo Cabral de Vasconcellos [Orientador]

Mônica de Cássia Alves de Paula

Sueli Matilde da Silva Costa

Ivan Ricardo Martinez Padua

Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

**Data de defesa:** 14-02-2020

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

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8027-2484>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4014581578938243>

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**RODOLFO MALAGÓ**

**ORIENTADOR: JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS**

## **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS**

**2. PROF. DR<sup>a</sup>. MÔNICA DE CÁSSIA ALVES DE PAULA**

**3. PROF. DR<sup>a</sup>. SUELI MATILDE DA SILVA COSTA**

**4. PROF. DR. IVAN RICARDO MARTINEZ PADUA**

**5. PROF. DR<sup>a</sup>. SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 14/02/2020**

## **Dedicatória**

**Oftalmologia,**  
da necessidade à paixão,  
uma especialização,  
a contínua construção do conhecimento,  
a ti dedico.

Ao Professor

**JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS**

*“Haja, pois, o que houver,  
ampliem-se obstáculos,  
agigantem-se problemas,  
intensifique-se lutas ou  
se agravem provocações,  
trabalha sempre no bem de todos...”*

**(Emmanuel)**

## AGRADECIMENTOS

À **Família**, pelos exemplos de dignidade e honestidade.

À **Romília Laurentina Malagó**, pelo apoio incondicional, pelo amor e pela vida.

À Dra. **Maura Krähebühl Wanderley Bittencourt**, pela amizade, pelos desafios propostos, pelas oportunidades profissionais e pelos caminhos da vida.

À **Walter Luiz Nunes**, a quem escolhi amar, meu porto seguro e minha felicidade.

Ao amigo **Alexandre Luiz Pereira**, pela oportunidade de compartilhar experiências científicas.

À **equipe Vetprime Especialidades Veterinárias**, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio e troca de experiência.

Ao **Centro Universitário de Itajubá – FEPI**, instituição que me acolheu e depositou confiança no meu profissionalismo.

Aos **professores e amigos da FEPI**, especialmente a **Ana Carolina Carneiro Lopes** e **Jasiele Aparecida de Oliveira Silva**, pois dividimos momentos e construímos nosso futuro juntos; ao Dr. **Alexandre Sousa e Silva**, no apoio da análise estatística e incentivo a finalização deste trabalho e Dra. **Alba Helena Fernandes Caldas**, na revisão da língua portuguesa.

Ao Dr. **Kaleizu Rosa**, pelo auxílio na reorganização deste caminho e no autoconhecimento.

À **Regenera Medicina Veterinária Avançada**, especialmente aos Drs. **Michele Andrade de Barros**, **João Flavio Panattoni Martins** e **Bruna Pereira de Moraes**, pelo apoio e patrocínio a este projeto científico.

Ao **curso de pós-graduação em Oftalmologia Veterinária da ANCLIVEPA – São Paulo**, especialmente à **Renata Squarzoni e Adriana Lima Teixeira**, por proporcionar o ensinamento em oftalmologia veterinária e pelas amizades construídas (**Amanda, Bruno, Carol, Larissa, Léia e Thiago**).

À **Faculdade de Ciências Médicas FCM – UNICAMP**, especialmente ao **Departamento de Oftalmologia**, pela oportunidade do desenvolvimento científico.

À Dra. **Monica Alves**, pelo exemplo de profissional e apoio científico.

À querida **Eliane Maria Pinheiro**, pela dedicação ao Departamento de Oftalmologia da FCM – UNICAMP.

À querida **Marcinha**, assim carinhosamente chamada, secretária da pós-graduação, pela disposição e auxílio nos assuntos acadêmicos.

Aos **animais da pesquisa e seus tutores**, pela disposição no crescimento científico e voto de confiança em nosso trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** O defeito epitelial corneano crônico espontâneo (SCCED) afeta cães e, clinicamente, é semelhante a erosões recorrentes em humanos. Essa úlcera de córnea crônica tem dificuldade na cicatrização quando comparada à cicatrização epitelial normal, sendo necessário frequentemente tratamento cirúrgico. **Objetivo:** Avaliar a cicatrização da SCCED em cães após aplicação tópica de células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas de tecido adiposo heterólogo e comparar com o tratamento de debridamento por *diamond burr*. **Métodos:** Cães com diagnóstico de SCCED foram selecionados para estudo clínico não randomizado, com caráter intervencionista e prospectivo. Os animais que previamente não responderam ao tratamento clínico compuseram dois grupos, que receberam o debridamento com *diamond burr* (n=8) (Grupo Debridamento) e aplicação tópica de 50 microlitros de suspensão de MSCs ( $1 \times 10^6$  células) no saco conjuntival, com auxílio de micropipeta, uma vez ao dia por 5 dias consecutivos (n=10) (Grupo Células-tronco). Uma avaliação oftalmológica periódica foi realizada antes e após o tratamento dentro de um período de acompanhamento de 28 dias. Os cães foram avaliados quanto à congestão conjuntival, descarga conjuntival, aferição da superfície ocular acometida pela injúria, severidade da opacidade de córnea, vascularização, pigmentação, blefaroespasma e quaisquer complicações oculares ou sistêmicas. O Sistema de Pontuação Ocular *Hackett-McDonald* foi adaptado em relação aos sintomas oculares. **Resultados:** O tempo médio de cicatrização da córnea foi de 23 ( $\pm 9,9$ ) dias após o desbridamento e de 21 ( $\pm 9,8$ ) dias após a aplicação das MSCs, não apresentando diferença estatística ( $p=0,696$ ) na comparação dos grupos. Após o tratamento, foram observadas melhorias clínicas, como demonstrado pela redução significativa da congestão conjuntival, secreção conjuntival e blefaroespasma, nos dois grupos. Em relação à área de opacidade da córnea e à aferição da superfície ocular, houve redução com diferença estatística significativa após o tratamento com debridamento ( $p=0,001$  e  $p=0,020$ ). No Grupo Células-tronco foi observada somente uma tendência de melhora clínica para a opacidade e aferição da superfície ocular acometida no final da cicatrização da córnea desses animais. No Grupo Células-tronco também foi observado um aumento significativo na vascularização da córnea no início do tratamento, com diminuição posterior no final do tratamento. Após a aplicação alogênica das MSCs, foi observada presença de pigmentação da córnea em alguns casos. Ao comparar os grupos em diferentes momentos da avaliação, não foi observada diferença estatística nos sinais clínicos, exceto na aferição da superfície ocular acometida pela injúria no tempo inicial da avaliação. Durante o período de acompanhamento, não foram observadas complicações oculares ou sistêmicas. **Conclusão:** A aplicação tópica de MSCs, derivada de tecido adiposo heterólogo, é uma terapia segura e eficaz com potencial terapêutico para o SCCED em cães.

**Palavras-chave:** Células mesenquimais estromais; Tecido Adiposo; Ceratite; Cão; Terapia Celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** The spontaneous chronic corneal epithelial defect (SCCED) affects dogs and clinically are similar to recurrent erosions in humans. This chronic corneal ulcer has difficulty in healing when compared to normal epithelial wound healing and frequently surgical treatment may be required. **Objective:** To evaluate the healing of SCCED in dogs after topical application of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from heterologous adipose tissue and compare with diamond burr debridement treatment. **Methods:** Dogs with the diagnosis of SCCED were selected for clinical study no-randomized with interventionist and prospective character. The animals previously non-responsive to the clinical treatment composed two groups that received diamond burr debridement (n=8) (Debridement Group) and topical applied of the 50 $\mu$ L of MSCs suspension ( $1 \times 10^6$  cells) in the conjunctival sac, with micropipette, once daily for 5 consecutive days (n=10) (MSCs Group). A periodic ophthalmologic evaluation was performed before and after the treatment within a follow-up period of 28 days. The dogs were evaluated for conjunctival congestion, conjunctival discharge, measurement of the ocular surface affected by the injury, corneal cloudiness severity, corneal vascularization, corneal pigmentation, blepharospasm and ocular or systemic complications. Hackett–McDonald Ocular Scoring System was adapted respecting to ocular symptoms. **Results:** The mean time corneal healing was 23( $\pm$ 9.9) days after debridement and 21 ( $\pm$ 9.8) days after MSCs application, no statistic difference ( $p=0.696$ ) in the comparison the groups. After treatment, clinical improvements were observed, as showed by the significant reduction of conjunctival congestion, conjunctival discharge and blepharospasm for both groups. Regarding the corneal cloudiness severity and ocular surface measurement, there was a reduction with statistical significant difference after treatment with debridement ( $p=0.001$  and  $p=0.020$ ). In the MSCs Group, only a clinical trend toward improvement was observed for opacity and measurement of the ocular surface affected at the end of the corneal healing this animals. In the MSCs Group, a significant increase in the corneal vascularization was also observed in the begning of treatment with subsquent decrease at the end of treatment. After allogeneic MSCs application, presence of pigmentation was observed in some cases. When comparing the groups at different times of evaluation, no statistical difference was observed in clinical signs, except for the measurement of the ocular surface affected by the injury at the initial evaluation time. During the follow-up period, it was not observed any ocular or systemic complications. **Conclusion:** Topical application of MSCs derived from heterologous adipose tissue is a safe and effective therapy with therapeutic potential for SCCED in dogs.

**Keywords:** Stromal Mesenchymal Cells; Adipose Tissue; Keratitis; Dog; Cell Therapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Caracterização dos animais do Grupo Debridamento.....	41
Quadro 2. Caracterização dos animais do Grupo Células-tronco.....	43
Gráfico 1. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do tempo de cicatrização da córnea dos cães dos grupos (GCT e GD) tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	49
Gráfico 3. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para a congestão conjuntival avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p<0,001^*$ ), por tempo (T0 para T4, T1 para T3 e T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	53
Gráfico 4. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para a descarga conjuntival avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p<0,001^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4, T1 para T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	53
Gráfico 5. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para a severidade da opacidade corneana avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	54
Gráfico 6. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para a aferição da superfície ocular avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,020^*$ ), por tempo (T0 para T4, T1 para T3 e T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	54
Gráfico 7. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para a vascularização corneana avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,020^*$ ), por tempo (T0 para T2, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	55
Gráfico 8. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para blefaroespasma avaliado nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4, T1 para T3 e T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	55

Gráfico 9. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para pigmentação corneana avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,406$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	56
Gráfico 10. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para congestão conjuntival avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	58
Gráfico 11. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para descarga conjuntival avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,019^*$ ), por tempo (T0 para T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	58
Gráfico 12. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para severidade da opacidade corneana avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,216$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	59
Gráfico 13. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para aferição da superfície ocular avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,248$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	59
Gráfico 14. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para vascularização corneana avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T2, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	60
Gráfico 15. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para pigmentação corneana avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,017^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	60
Gráfico 16. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para blefaroespasma avaliado nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T2, T3 e T4, $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	61
Gráfico 17. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para aferição da superfície ocular avaliada nos	

cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento (T0, $p=0,034^*$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	62
Gráfico 18. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para congestão conjuntival avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0, $p=0,408$ ; T1, $p=0,237$ ; T2, $p=0,829$ ; T3, $p=0,573$ ; T4, $p=0,762$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	62
Gráfico 19. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para descarga conjuntival avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0, $p=0,101$ ; T1, $p=0,315$ ; T2, $p=1$ ; T3, $p=0,360$ ; T4, $p=0,762$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	63
Gráfico 20. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de Hackett–McDonald para severidade da opacidade corneana avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0, $p=0,203$ ; T1, $p=0,203$ ; T2, $p=0,762$ ; T3, $p=0,460$ ; T4, $p=0,274$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	63
Gráfico 21. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para vascularização corneana avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0, $p=0,573$ ; T1, $p=0,897$ ; T2, $p=0,315$ ; T3, $p=0,573$ ; T4, $p=0,173$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	64
Gráfico 22. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para blefaroespasma avalido nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0, $p=0,762$ ; T1, $p=0,515$ ; T2, $p=0,274$ ; T3, $p=0,897$ ; T4, $p=0,762$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.....	64
Gráfico 23. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado para pigmentação corneana avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0, $p=0,515$ ; T1, $p=0,315$ ; T2, $p=0,203$ ; T3, $p=0,101$ ; T4, $p=0,101$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tratamento no teste de Schirmer e pressão intraocular, entre os grupos (GD e GCT).....	51
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	células amplificadoras transientes
CD4	do inglês, <i>cluster of differentiation 4</i>
CD34	do inglês, <i>cluster of differentiation 34</i>
CD45	do inglês, <i>cluster of differentiation 45</i>
CD73	do inglês, <i>cluster of differentiation 73</i>
CD90	do inglês, <i>cluster of differentiation 90</i>
CD105	do inglês, <i>cluster of differentiation 105</i>
CDT	células diferenciadas terminais
CK3	do inglês <i>cytokeratin 3</i> (marcador para citoqueratina epitelial)
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CPM	células pós-mitóticas
CTA	células-tronco adultas
CTE	células-tronco embrionárias
CT	células-tronco
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetraacético)
EGF	do inglês, <i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidérmico)
FGF	do inglês, <i>fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento fibroblástico)
HGF-1	do inglês, <i>hepatocyte growth factor type 1</i> (fator de crescimento de hepatócito tipo 1)
HLA-II	do inglês, <i>human leukocyte antigen type II</i> (antígeno leucocitário humano tipo II)
HSC	do inglês, <i>hematopoietic stem cell</i> (célula-tronco hematopoética)
IL1	interleucina tipo 1
IL6	interleucina tipo 6
IL8	interleucina tipo 8
IL10	interleucina tipo 10
KCS	do inglês, <i>keratoconjunctivitis sicca</i> (ceratoconjuntivite seca)
LESC	do inglês, <i>limbal epithelial stem cells</i> (célula-tronco epitelial limbares)
LSC	do inglês, <i>limbal stem cells</i> (célula-tronco limbares)
µg	microgramas
MHC I	do inglês, <i>major histocompatibility complex type I</i> (complexo principal de histocompatibilidade tipo I).

MHC II	do inglês, <i>major histocompatibility complex type II</i> (complexo principal de histocompatibilidade tipo II).
MIP-1 $\alpha$	do inglês, <i>macrophage inflammatory protein 1 alpha</i> (proteína inflamatória de macrófago tipo I alfa)
mL	mililitros
mm	milímetros
MMPs	do inglês, <i>matrix metalloproteinases</i> (metaloproteinases da matriz)
MMP-2	do inglês, <i>matrix metalloproteinases types 2</i> (metaloproteinases da matriz tipo 2)
MMP-9	do inglês, <i>matrix metalloproteinases types 9</i> (metaloproteinases da matriz tipo 9)
MSCs	do inglês, <i>mesenchymal stem cells</i> (células tronco-mesenquimais)
PDGF	do inglês, <i>platelet derived growth factor</i> (fator derivado de plaquetas)
PIO	pressão intraocular
PSGAG	do inglês, <i>polysulfated glycosaminoglycan</i> (glicosaminoglicano polissulfatado)
SCCED	do inglês, <i>spontaneous chronic corneal epithelial defects</i> (defeito epitelial corneano crônico espontâneo)
SDF-1	do inglês, <i>stromal cell-derived factor type 1</i> (fator derivado de célula-tronco tipo 1)
TGF $\beta$ 1	do inglês, <i>transforming growth factor beta type 1</i> (fator de transformação do crescimento tipo 1 beta)
TNF $\alpha$	do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i> (fator de necrose tumoral alfa)
VEGF	do inglês, vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)
$\bar{x}$	média aritmética

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	OBJETIVOS .....	21
2.1	Objetivo geral .....	21
2.2	Objetivo específico .....	21
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1	Aspectos morfofuncionais da córnea dos animais .....	22
3.2	Cicatrização de lesão no epitélio da córnea.....	25
	3.2.1 Migração celular .....	25
	3.2.2 Proliferação celular .....	26
	3.2.3 Adesão celular .....	26
	3.2.4 O papel das proteases na cicatrização da lesão de córnea .....	27
3.3	Defeito epitelial corneano crônico espontâneo (SCCED).....	29
	3.3.1 Tratamento do defeito epitelial corneano crônico espontâneo .....	30
3.4	Células-tronco (CT).....	34
	3.4.1 Células-tronco mesenquimais .....	34
	3.4.2 Células-tronco mesenquimais na córnea .....	36
3.5	Potencial terapêutico das células-tronco na cicatrização da córnea e na superfície ocular.....	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	40
4.1	Crerérios de seleção dos animais na pesquisa .....	40
4.2	Crerérios de exclusão dos animais da pesquisa.....	40
4.3	Grupos de animais.....	41
	4.3.1 Grupo Debridamento (GD).....	41
	4.3.2 Grupo Células-tronco (GCT).....	42
4.4	Avaliação clínica dos animais da pesquisa .....	44
	4.4.1 Congestão conjuntival.....	44
	4.4.2 Descarga conjuntival.....	45
	4.4.3 Severidade da opacidade de córnea.....	45
	4.4.4 Aferição da superfície ocular (aplicado para avaliar a área de opacidade corneana e/ou área da córnea corada com fluoresceína) .....	46
	4.4.5 Vascularização .....	46

4.4.6 Blefaroespasma .....	46
4.4.7 Pigmentação .....	46
4.4.8 Tempo de cicatrização .....	46
4.5 Células-tronco mesenquimais .....	47
4.6 Análise estatística .....	48
5. RESULTADOS .....	49
5.1 Análise do tempo de cicatrização da córnea por grupo .....	49
5.2 Análise do teste de Schirmer I e pressão intraocular por grupo, no pré (T0) e pós-procedimento(T4) .....	50
5.3 Análise da superfície ocular por grupo .....	51
5.3.1 Grupo Debridamento (GD) .....	51
5.3.2 Grupo Células-tronco (GCT) .....	56
5.4 Análise comparativa da superfície ocular entre os tempos e grupos .....	61
6. DISCUSSÃO .....	66
7. CONCLUSÃO .....	74
8. REFERÊNCIAS .....	75
9. APÊNDICES .....	87
10. ANEXOS .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

A córnea apresenta uma constituição morfológica única formada de células e fibras de colágeno, que estão dispostas homoganeamente e conferem transparência, assim, tornando-a essencial a visão. A interação morfofuncional de seus elementos garante homeostase a estrutura corneana, contudo, em casos de injúria da superfície ocular, ocorre a perda deste equilíbrio e uma série de eventos interferem na sua função. Dentro desse contexto, torna-se essencial conhecer o mecanismo fisiopatológico das doenças que acometem a córnea de humanos e diferentes espécies animais para a instituição de um tratamento eficaz para o bom desenvolvimento da função ocular.

Deve-se ressaltar que muitos estudos experimentais ou clínicos envolvendo animais são utilizados para o aprimoramento de técnicas em medicina humana, visto que os modelos animais são empregados e aceitos para o entendimento de fatores etiológicos, mecanismos e tratamento das doenças, desde que cumpridos os requisitos éticos e legais da pesquisa<sup>1</sup>.

No que se refere a oftalmologia veterinária, a úlcera de córnea é a oftalmopatia mais comum em cães e podem variar de lesões superficiais a profundas. Entre as diferentes classificações da úlcera de córnea, Miller<sup>2</sup> descreve a úlcera de córnea persistente, atualmente denominada de defeito epitelial corneano crônico espontâneo (SCCED)<sup>3</sup>, como uma oftalmopatia que não responde ao tratamento de rotina e pode requerer intervenção cirúrgica. O tratamento cirúrgico consiste em diferentes técnicas de debridamento epitelial, sendo algumas mais simples, de fácil execução e que não apresentam risco para o olho, enquanto outras necessitam de que o animal esteja anestesiado, habilidade por parte do profissional, apresentando risco de perfuração da córnea. A eficácia dos procedimentos para a cicatrização da úlcera de córnea é variada entre os diferentes casos<sup>2</sup>.

Apesar de existirem relatos de resultados satisfatórios para o tratamento das úlceras de córnea persistentes em cães e em pacientes humanos, a terapia pode ser bastante desafiadora e pode exigir um acompanhamento por período prolongado ou ainda apresentar recidiva. Dessa forma, novas terapias têm sido introduzidas e ganham popularidade, com um olhar mais recente para aquelas que buscam compreensão das doenças da superfície da córnea. Das terapias em

desenvolvimentos pode-se citar a aplicação de células-tronco mesenquimais, que foram recentemente introduzidas como uma potencial terapia inovadora para defeito epitelial da córnea. Essas células são multipotentes e, portanto, têm a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula humana. Embora usado experimentalmente em pesquisas com animais, a primeira aplicação conhecida em córnea humana foi publicada em 2011 de um paciente com ceratocone e um defeito epitelial persistente após o trauma. O defeito foi fechado com sucesso dentro de um mês sem sequelas adicionais. Embora exista várias teorias para a ação das células-tronco mesenquimais (MSCs) no tecido aplicado, o mecanismo de ação permanece obscuro. A secreção de fatores tróficos e citocinas que influenciem as células vizinhas, seus efeitos imunomoduladores ou sua diferenciação direta nas células estromal da córnea são descritos como mecanismos de ação destas células. Contudo, o transplante de MSCs exige uma investigação mais aprofundada sobre esse mecanismo e sua aplicação na terapia regenerativa da córnea<sup>4</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar clinicamente a cicatrização do defeito epitelial corneano crônico espontâneo em cães, após aplicação tópica de células-tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo heterólogo.

### **2.2 Objetivo específico**

Avaliar comparativamente a cicatrização da córnea de cães portadores do defeito epitelial corneano crônico espontâneo tratados com a aplicação tópica de células-tronco mesenquimais e o debridamento superficial com *diamond burr*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Aspectos morfofuncionais da córnea dos animais

A córnea apresenta característica transparente e corresponde a um quinto anterior da túnica fibrosa do globo ocular. Nos animais domésticos, a córnea é de formato elíptico, com diâmetro horizontal maior que o vertical, apesar de cães e gatos apresentam pouca diferença entre esses diâmetros, tornando-as quase de formato circular<sup>3</sup>.

Entre as funções da córnea pode-se citar o suporte ao conteúdo intraocular, a refração e transmissão da luz. Em partes, estas funções são estabelecidas devido a sua composição microscópica, organização molecular e espessura. A espessura da córnea varia entre as espécies, entre as raças e de indivíduo para indivíduo. No entanto, a maioria dos animais domésticos, tem espessura da córnea inferior a 1 mm, sendo que no cão é 0,45-0,55 mm de espessura centralmente e de 0,50 a 0,65 mm de espessura na periferia<sup>3</sup>.

Nos últimos tempos, os perfis de espessura da córnea tem sido avaliado *in vivo* e por novas tecnologias, como a paquimetria ultra-sônica e microscopia confocal, sendo mais espessa na periferia temporal e mais fino de forma centralizada<sup>5,6</sup>. A córnea canina engrossa significativamente com a idade e é consistentemente mais fina em fêmeas do que em machos<sup>5</sup>.

Na composição microscópica da córnea, encontra-se o epitélio estratificado escamoso, sendo que suas células apresentam boa capacidade regenerativa, com tempo de renovação de aproximadamente 7 dias. Porém se houver a remoção da lâmina basal, podem ser necessárias semanas a meses para restabelecer sua estrutura e até que a membrana basal seja completamente reformada, o epitélio pode ser facilmente removido do estroma<sup>7,8</sup>.

As células mais basais estão firmemente ligadas à membrana basal por hemidesmossomos, em arranjo linear nos mamíferos, que ancoram o colágeno fibrilar às glicoproteínas laminina. A membrana basal é composta por colágeno dos tipos IV, VI e VII, além de hialuronato e fibronectina<sup>9,10</sup>. Estas células basais são altas, de formato colunar, estão justapostas e como resultado, os núcleos, que estão localizados na região apical, são muitas vezes forçados para formar duas camadas alternadas. A mitose é confinada às células basais ou às células localizadas imediatamente na camada acima. Adjacente às superfícies celulares, podem ser

encontrados pequenos envoltórios com inúmeros anexos desmossomais. Os linfócitos podem ser encontrados ocasionalmente entre as células basais e nas camadas mais superficiais acima dele, porém os desmossomos estão ausentes entre esta célula de defesa e as células epiteliais adjacentes<sup>11,12</sup>.

As células alares são um grupo de células poligonais localizadas acima das células basais. Podem se organizar em duas a três camadas, até várias camadas mais profundas, dependendo da espécie e da localização na córnea. Estas células formam uma zona de transição entre as células basais e as células escamosas mais superficiais<sup>3</sup>.

As células superficiais achatadas são organizadas em várias camadas profundas. Em microscopia eletrônica de varredura, as células aparecem planas e poligonais, com bordas retas, contudo, as células mais superficiais apresentam microvilos, sendo que contribuem para estabilizar o filme lacrimal na superfície corneana<sup>13,14</sup>.

O epitélio da córnea é mais espesso na periferia do que no centro. Com a junção da conjuntiva bulbar, no entanto, diminui abruptamente e observa-se células pigmentadas. A córnea normalmente não é pigmentada, exceto na periferia, que corresponde ao limbo. No limbo, o pigmento é espalhado em todas as camadas, exceto nas células escamosas superficiais<sup>11</sup>.

Ainda com relação à espessura da córnea, 90% é representada pelo estroma corneano, que possui um arranjo de tecido fibroso, em lamelas, caracterizando a sua transparência. Entre as lamelas estão fixos os fibrócitos, também chamados de queratinócitos, cujas extensões celulares são responsáveis pela manutenção das lamelas estromais. Os queratócitos têm núcleos finos, bordas mal definidas e membranas celulares delicadas e podem se transformar em miofibroblastos quando uma lesão corneana profunda ocorre, e podem produzir tecido cicatricial que não é transparente<sup>15</sup>.

As lamelas estromais são formadas por feixes paralelos de fibrilas de colágeno, sendo que cada lamela se estende ao longo de todo o diâmetro da córnea. Todas as fibrilas de colágeno dentro de uma lamela são paralelas, mas entre as lamelas variam muito em direção. As lamelas do estroma posterior são mais regulares no arranjo do que aquelas do terço anterior do estroma. Na porção anterior do estroma as lamelas são mais oblíquas à superfície, têm mais ramificação e entrelaçamento. O arranjo molecular do estroma corneano é o fator mais importante na manutenção da

transparência da córnea, que envolve a integração das fibrilas de colágeno e substância fundamental, constituída por proteoglicanos, como lumican, keratocan, osteoglicina e decorina<sup>16</sup>.

O colágeno do estroma é constituído de pelo menos cinco tipos (I, III, V, VI e XII), sendo o colágeno do tipo I o mais comum, formando o pequeno e uniforme arranjo das fibrilas. O tipo VI está associado apenas à interface da matriz, formando uma rede em torno das fibrilas. Existem evidências em estudos com ratos adultos que o tipo VI esteja conectado com o tipo I por meio de glicosaminoglicanos. Este tipo de colágeno ainda está próximo dos queratinócitos e parece desempenhar algum tipo de papel nas interações célula-matriz, o que seria especialmente importante durante o desenvolvimento e reparo. Em comparação, o tipo V é combinado com o tipo I, e acredita-se que seja um fator responsável pela formação do pequeno e uniforme diâmetro do arranjo fibrilar. Os tipos III e XII são considerados formas de colágeno em desenvolvimento, por isso em um reparo de lesão corneana eles continuam a ser vistos<sup>17-19</sup>.

É descrito no estroma anterior uma zona fina e livre de células, correspondente, em localização, com a membrana limitante anterior, também conhecida como camada de Bowman. Porém, está ausente nos cães e presentes em humanos, primatas não humanos, alguns herbívoros e animais selvagens<sup>20</sup>.

A membrana de Descemet é uma membrana homogênea e acelular, que forma um limite interno de proteção dentro da córnea, em transição ao endotélio corneano. As células endoteliais são responsáveis pela produção desta membrana ao longo da vida, formando assim uma membrana mais espessa à medida que o animal envelhece. Clinicamente, a membrana mostra elasticidade, mas contém apenas fibrilas de colágeno fina<sup>21</sup>.

O endotélio corneano é uma camada única de células achatadas poligonais, que reveste internamente a córnea. A capacidade regenerativa do endotélio, pode variar de acordo com a espécie e a idade. Em geral, a mitose é mais ativa em animais jovens. As células endoteliais nos caninos jovens (entre 1 e 4 semanas de idade), não apresentam a forma hexagonal típica, sendo que há um pleomorfismo, resultado de aumento da atividade mitótica com crescimento<sup>3</sup>.

### 3.2 Cicatrização de lesão no epitélio da córnea

O epitélio da córnea representa a porção anterior da superfície ocular que está mais exposta ao meio externo e sujeito a um desequilíbrio. Quando há uma erosão, a cicatrização epitelial é a resposta definitiva e envolve um aumento de sua atividade fisiológica, com eventos celulares e subcelulares influenciados por outras células, proteínas extracelulares da matriz e fatores de crescimento<sup>22</sup>.

Os processos envolvidos na cicatrização do epitélio da córnea podem ser divididos em três momentos distintos: migração celular, proliferação celular e adesão celular. Todos eles são parte de um único processo, mas a contribuição de cada um pode variar de acordo com o tamanho, profundidade e natureza da lesão<sup>22</sup>.

#### 3.2.1 Migração celular

Assim que ocorre uma lesão epitelial, as células passam por um processo de migração que envolve duas fases: a fase de latência e de cicatrização linear. Nas primeiras 4 a 6 horas após a lesão epitelial, não há diminuição de seu tamanho, pois são observadas alterações celulares distintas, como a síntese intracelular das proteínas estruturais (filamentos de actina) e sua reorganização na porção apical das células epitelial. Neste momento ainda, a ferida pode até se tornar maior devido à necrose e retração de células na borda da lesão. Pode ser observado um espessamento da borda da ferida e uma separação das células basais e as escamosas. Estudos com coelhos revelam que dentro de 2 horas, os hemidesmossomos entre as células basais e a membrana basal desaparecem por uma área de 50 a 70 micrômetros da borda da lesão. Ainda nesta fase de latência, cerca de três horas após a injúria, há um acúmulo de células polimorfonucleares, chegando a borda desta lesão, principalmente, por meio do fluido lacrimal; descamação de células superficiais e perda do aspecto colunar das células basais, além de aumento nas concentrações de fibronectina, fibrinogênio e fibrina na superfície da ferida entre 1 a 8 horas<sup>23-27</sup>.

A fase latente é seguida por uma fase de cicatrização linear. Durante esta fase, as células epiteliais se achatam, se espalham e realmente se movem por meio do defeito epitelial até que esteja completamente coberto. Isso é um processo ativo de consumo de energia, a partir do glicogênio intracelular, e são as células basais e suprabasais as responsáveis pelo processo de migração. Dessa forma, inicialmente o defeito é coberto por uma única camada de células. Quando isso ocorre, desaparecem

as células polimorfonucleares e a espessura normal do epitélio é restaurado por proliferação e movimento ascendente de células da camada basal<sup>22</sup>.

Vários estudos indicam que a migração de células ocorre de forma centrípeta do limbo em direção ao centro da córnea, não só na cicatrização de feridas, mas também durante o *turnover* da replicação epitelial<sup>22</sup>.

### 3.2.2 Proliferação celular

Embora a migração seja independente da proliferação celular, os dois processos se complementam durante a repitelização. A proliferação celular ajuda a restaurar o número de células e a espessura do epitélio da córnea. Após o processo natural de esfoliação das células da borda da lesão, as células próximas deixam de dividir por até um dia, enquanto as que estão a uma certa distância da lesão sofrem um aumento da taxa de divisão celular<sup>28</sup>.

Uma onda de mitose se move da periferia, de forma centrípeta, até que haja um repitelização e a restauração da espessura do epitélio. As células epiteliais basais são os principais participantes do processo proliferativo. Evidências científicas estabelecem o epitélio basal do limbo como o repositório de células-tronco para células epiteliais da córnea<sup>28</sup>.

A mitose das células-tronco tem dois propósitos: a renovação e manutenção da população de células-tronco, além da produção de células amplificadoras transientes de rápida divisão. Essas células, por sua vez, se diferenciam em células pós-mitóticas e, eventualmente, em células diferenciadas terminais que refletem a funcionalidade em questão. Dentro dessa visão, no reparo do epitélio da córnea, há sugestões de que as células basais e suprabasais correspondem, respectivamente, as TAC e PMC, enquanto que as células escamosas seriam as TDC<sup>28</sup>.

### 3.2.3 Adesão celular

A cicatrização epitelial não está completa até que o epitélio recém-regenerado se fixe firmemente ao tecido conjuntivo subjacente. As unidades de ancoragem permanente não são formadas até que o defeito da ferida esteja completamente coberto. Contudo, os anexos temporários são regularmente formados e liberados durante o processo de migração celular<sup>22</sup>.

Logo após o ferimento, proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, fibrinogênio/fibrina, laminina e tenascina aparecem na superfície lesionada. As células migratórias desenvolvem pontos de contato com as macromoleculares secretadas conhecidos como placas de adesão, que são sítios de interação transmembranas entre as proteínas da matriz extracelular e o citoesqueleto de actina. Na ausência de hemidesmossomos, a actina intracelular mediará esses acessos através de várias moléculas de adesão à superfície celular como vinculina, talina, actina, fimbrina e a família de integrinas de ativação muito tardia. Essas moléculas atuam como receptores de fibronectina, laminina e outros componentes da membrana basal<sup>22</sup>.

A rapidez com que os hemidesmossomos permanentes se anexam, depende se a membrana basal permaneceu intacta no momento da ferida. Pesquisas em coelhos mostram que as células epiteliais migram rapidamente e desenvolvem fortes áreas de anexos permanentes dentro de uma semana, quando a membrana basal foi deixada intacta. Por outro lado, quando há comprometimento da membrana basal, nos experimentos com os coelhos, após a ceratectomia superficial, a adesão não foi restabelecida em até 6 semanas. Assim também, os defeitos epiteliais da córnea causados por álcalis em macacos mostraram um atraso acentuado na adesão, mesmo em áreas em que a membrana basal tinha sido regenerada. Este atraso foi atribuído ao acúmulo de queratinócitos, detritos celulares e amorfos, e a presença de leucócitos polimorfonucleares subepiteliais que impedem a ancoragem da membrana basal ao seu substrato de colágeno<sup>30</sup>.

#### *3.2.4 O papel das proteases na cicatrização da lesão de córnea*

A cicatrização de lesões de córnea é um processo complexo que envolve as ações integradas de proteinases, fatores de crescimento e citocinas produzidas por células epiteliais, queratinócitos estromais, células inflamatórias e glândulas lacrimais. Múltiplas interações autócrinas e parácrinas ocorrem entre células epiteliais, fibroblastos estromais ativados e as ações exócrinas de fatores secretados pelas células das glândulas lacrimais no filme lacrimal pré-corneano. Várias proteinases, inibidores de proteinases, fatores de crescimento e citocinas no filme lacrimal e humor aquoso desempenham um papel no *turnover* natural das células da córnea e da cicatrização da ferida da córnea<sup>31</sup>.

Fisiologicamente, a córnea realiza a manutenção e reparo de sua matriz extracelular, sendo necessário um equilíbrio bem coordenado da síntese, degradação e remodelação dos seus constituintes. As enzimas proteolíticas (proteínases) desempenham funções fisiológicas no processo de renovação e remodelação do estroma corneano. A degradação excessiva do tecido normal e saudável é prevenida por inibidores de proteínases naturais presentes no filme lacrimal pré-corneano e córnea, como o inibidor de  $\alpha$ 1-proteínase,  $\alpha$ 2-macroglobulina e inibidores teciduais de metaloproteínases<sup>3,32</sup>.

As atividades das enzimas proteolíticas que atuam sobre o colágeno, proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular causam uma rápida degradação do estroma corneano associados a algumas úlceras, sendo esta condição referida como ceratomalácia ou *melting* corneano. Contudo, o desequilíbrio com altos níveis de proteínases (metaloproteínases da matriz ou plasmina) também pode contribuir para a patogênese de certos tipos de úlceras superficiais não cicatrizantes em cães<sup>33</sup>.

As enzimas proteolíticas endógenas são produzidas e liberadas por células inflamatórias (leucócitos e macrófagos), células epiteliais da córnea e fibroblastos, enquanto que as proteínases exógenas podem ser produzidas por agentes infecciosos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* e *Fusarium sp.*<sup>3</sup>.

Entre as famílias de enzimas que afetam a córnea, pode-se destacar as metaloproteínases da matriz (MMPs) e as proteases séricas. A neutrófilo elastase é uma protease sérica na lágrima, produzida por leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, que degrada o colágeno III e IV, bem como os componentes da matriz extracelular da córnea, como a laminina e fibronectina<sup>33</sup>. Duas MMPs (MMP-2 e MMP-9) são importantes para o remodelamento e degradação do colágeno estromal da córnea em humanos, cães e outras espécies animais. Estudos apoiam uma origem e um propósito diferentes para essas MMPs, sendo a MMP-2 sintetizada por queratinócitos da córnea e desempenha uma função de vigilância na córnea normal, tornando-se ativa localmente para degradar moléculas de colágeno que se danificam como resultado do desgaste normal, enquanto que a MMP-9 é produzida por células epiteliais e leucócitos após uma lesão da córnea<sup>34</sup>.

### 3.3 Defeito epitelial corneano crônico espontâneo (SCCED)

O defeito epitelial corneano crônico espontâneo, assim intitulado atualmente, é uma ceratite ulcerativa superficial, refratária e crônica que se manifesta em cães. A doença é mais conhecida na oftalmologia veterinária como úlcera indolente ou persistente, pois não se consegue resolver por meio dos processos normais de cicatrização da córnea. Outros termos são utilizados para descrever esta doença, incluindo erosões recorrentes caninas, úlceras corneanas refratárias, úlceras de Boxer, erosões não cicatriciais, erosões persistentes da córnea, erosões epiteliais recorrentes e erosões corneanas persistentes idiopáticas<sup>3</sup>.

Embora originalmente referida como úlceras de Boxer devido a uma predileção para cães da raça Boxer, outros estudos subsequentes documentam a ocorrência em várias raças, como Beagle, Cocker Spaniel, Golden Retriever, Labrador, Lhasa Apso, Pastor Alemão, Schnauzer, Shih-Tzu, Weimaraner, West Highland Terrier, Yorkshire, entre outros<sup>35,36</sup>. O SCCED clinicamente compartilha semelhanças com as erosões recorrentes em seres humanos, sendo muitas vezes causados por trauma superficial e podem estar associados a distrofia da membrana basal e do estroma anterior<sup>37,38</sup>.

Apesar da fisiopatologia da doença não estar totalmente esclarecida, são descritas várias anormalidades morfológicas e funcionais na córnea de cães que retratada uma dificuldade do epitélio da córnea em se fixar ao estroma adjacente. Por meio de estudos em microscopia óptica, microscopia eletrônica e imunohistoquímica foram observadas ausência ou diminuição de hemidesmossomos, perda ou alterações em membrana basal e células basais, um epitélio com desnaturação, deposição de fibronectina na região da lesão, uma zona superficial de material fibrilar amorfo fino ou mal definido, quantidade variável de fibroplasia estromal, vascularização e infiltrado leucocitário<sup>7,36,39</sup>.

O diagnóstico do SCCED é clínico, com a identificação das características da lesão. Uma borda epitelial solta ao redor da lesão principal, sendo a erosão destacada pela coloração difusa com fluoresceína e um anel menos intenso de coloração ao redor do defeito, pois há infiltração do corante abaixo do epitélio. A lesão é superficial, sem perda de estroma e qualquer edema corneano é confinado à área da erosão. É importante levar em consideração a presença da lesão que não cicatrizou num tempo médio de 1 a 2 semanas e o fato de poder ocorrer em qualquer raça de cão com meia idade (8 e 9 anos de idade)<sup>33</sup>.

O exame oftálmico cuidadoso, elimina possíveis causas que contribuam para a cicatrização tardia da lesão, como anormalidades mecânicas, corpos estranhos, infecção, alterações do filme lacrimal, desordens do globo ocular ou ceratopatia bolhosa secundária a edema de córnea. Geralmente, se essas questões forem resolvidas, há resolução da úlcera de córnea<sup>33</sup>.

A intensidade de blefarospasmo, da epífora e da vascularização corneana variam enormemente. Uma lesão corneana central pode geralmente existir de semanas a meses sem qualquer resposta vascular, apesar de que as lesões periféricas são mais propensas a vascularizar<sup>33</sup>. Há estudos que relatam a presença de neovascularização em 58% a 64% dos casos de SCCED<sup>36,40</sup>.

### *3.3.1 Tratamento do defeito epitelial corneano crônico espontâneo*

O tratamento para o SCCED em cães inclui o uso de antibióticos tópicos para a prevenção de infecção secundária, um cicloplégico tópico para controle da dor e colar Elizabetano para prevenção do auto traumatismo. Entretanto, a escolha do tratamento exato depende da preferência do clínico e do tutor, visto que foram realizados poucos ensaios clínicos controlados para auxiliar a decisão baseada em evidências. A maioria dos estudos de medicamentos tópicos para o tratamento da doença consiste em ensaios clínicos pequenos, não aleatórios e não controlados, o que dificulta a interpretação desses resultados<sup>3,33</sup>.

Uma variável quantidade de terapias medicamentosas já foi descrita para o tratamento da doença, entretanto muitos desses tratamentos ainda não estão disponíveis ou exigem uma frequência de aplicação que seja difícil para a maioria dos proprietários, muitas vezes tornando seu uso impraticável em um ambiente clínico normal<sup>33</sup>.

Um estudo único da aplicação tópica de fator de crescimento epidérmico (EGF) em cães com úlcera de córnea persistente encontrou uma taxa de sucesso de 80%. O EGF é um componente fisiológico da lágrima e desempenha um papel predominante na regeneração do epitélio da córnea. Além disso, o EGF aumenta a proliferação e a diferenciação dos ceratócitos da córnea e das células endoteliais. O EGF aplicado topicamente melhora significativamente a repitelização das áreas lesionadas<sup>41</sup>.

A solução de glicosaminoglicano polissulfatado foi indicada como tratamento inicial para SCCED, pois inibe proteases séricas tais como plasmina e os

ativadores de plasminogênio. O glicosaminoglicano polissulfatado (PSGAG) está descrito como eficaz na resolução de aproximadamente 80% das úlceras de córnea persistente<sup>2</sup>.

As úlceras de córnea persistentes em cães tratadas com solução tópica de substância P, com ou sem o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 tiveram resolução completa da lesão de 70% e 75%, respectivamente. A substância P é um neuropeptídeo liberado pela inervação peptidérgica presente na córnea. Em análises imunohistoquímicas de amostras de ceratectomia superficial de cães com as úlceras persistentes foram observadas múltiplas anormalidades na densidade, distribuição e morfologia das inervações da córnea, em comparação com as córneas do grupo controle<sup>40</sup>.

O adesivo de butil-2-cianoacrilato foi testado para o SCCED em cães, gatos e coelhos, a partir do debridamento da lesão e sua aplicação tópica. Esse adesivo é uma cola cirúrgica amplamente estudada na aplicação em procedimentos cirúrgicos e possui boa compatibilidade tecidual. De maneira geral, as úlceras cicatrizaram e o adesivo caiu da superfície ocular em aproximadamente 3 semanas ( $\pm 1$  semana), sendo visível a presença de neovascularização leve da córnea e desconforto leve por vários dias após aplicação, conforme relatado pelos tutores. A terapia foi considerada simples e segura, além de um tratamento não invasivo para este tipo de úlceras<sup>42</sup>.

A fibronectina é uma glicoproteína que auxilia no processo de migração celular e a adesão, sendo importante nos primeiros passos da adesão das células epiteliais após a lesão. Apesar da fibronectina não estar comercialmente disponível para uso tópico, a obtenção de soro autólogo pode ser uma fonte desta molécula. O soro é frequentemente recomendado para o tratamento de úlceras da córnea em animais, mas levando em consideração que estudos mostraram que a fibronectina já está presente no local das úlceras de córnea persistentes, não fica claro o papel da fibronectina tópica para o seu tratamento. Soro autólogo e fibronectina provavelmente são muito mais úteis em úlceras infectadas, em que as antiproteínases do soro melhoram a cicatrização da ferida da córnea<sup>43</sup>.

Outra terapia utilizada foi o ácido aminocapróico, produto comercializado para tratar a intolerância das lentes de contato, visto que o uso de lentes aumenta a atividade de plasmina no filme lacrimal e pode contribuir ao desenvolvimento de lesão epitelial corneana. Os cães com úlcera de córnea persistente, tratados com a ácido aminocapróico após 14 dias, tiveram taxa de sucesso na cicatrização mais

significativa que o grupo controle tratados com gentamicina tópica. Os resultados do estudo sugerem que o ácido pode ser um adjuvante seguro e útil no tratamento da doença<sup>44</sup>.

Os resultados de alguns trabalhos indicaram que as alterações nas metaloproteinases da matriz podem surgir da presença de um defeito epitelial da córnea crônica. Essas enzimas degradam colágeno e componentes da membrana basal, por essa razão o uso de inibidores de matriz metaloproteinases pode ser uma alternativa no tratamento da doença. A doxiciclina e a tetraciclina inibem estas enzimas em culturas de células epiteliais da córnea de humanos e em lágrimas de equinos. Cães de pequeno porte, portadores de SCCED, tratados com pomada oftálmica de oxitetraciclina tiveram tempo de cicatrização (média de 2 semanas) significativamente menor quando comparada com o grupo controle. E apesar de não haver significância estatística, os cães que receberam a doxiciclina por via oral também cicatrizaram mais rapidamente do que a do grupo controle<sup>33,45</sup>.

O soro heterólogo já foi utilizado como adjuvante para o tratamento de cães portadores de SCCED associado a ceratotomia em grade. Mediante as suas propriedades antiproteinases, os pesquisadores avaliaram se o tempo de cicatrização e repitelização da córnea seria menor para este grupo. Apesar de ser bem tolerado pelos cães, o uso adjuvante de soro heterólogo não ofereceu vantagem terapêutica em relação a taxa de repitelização da córnea, quando comparado com o grupo controle<sup>46</sup>.

Outra opção para o tratamento do SCEED é o uso de procedimentos classificados como cirúrgicos, que incluem debridamento simples, ceratotomia em grade, ceratotomia punctata e ceratectomia superficial. O debridamento epitelial simples tem sido o principal suporte para o tratamento da doença, com taxa de sucesso na cicatrização de aproximadamente 50%, sendo que ao adicionar lente de contato terapêutica ou um flap de terceira pálpebra para proteger a córnea, as taxas de cicatrização após o debridamento são de 58% e 64%, respectivamente<sup>33,35,47</sup>. A ceratotomia para correção das úlceras persistentes envolve a realização de pequenas punções ou sulcos lineares no estroma superficial, o que provavelmente cria canais para as células epiteliais penetrarem na zona hialina estromal superficial observada na histopatologia de córnea afetadas pela doença. O procedimento é conhecido como ceratotomia punctata ou ceratotomia em grade. A punção do estroma anterior aumenta as proteínas extracelulares como colágeno IV, laminina e fibronectina que

são importantes na adesão epitelial. Os relatos da aplicação da técnica de ceratotomia em grade em cães com úlcera persistente revelam que 87% dos casos cicatrizam após uma única aplicação, sendo que 75% entre 10 e 14 dias. A complicação observada no pós-operatório foi o edema de córnea e opacificação corneal<sup>33,48</sup>.

A ceratectomia superficial é uma técnica que resulta na maior taxa de sucesso e no tempo de cicatrização mais curto de todos os procedimentos utilizados para tratar a doença. Uma taxa de sucesso de 100% dos casos tratados e tempo de cura pós-tratamento de 9,3 dias estão relatados. A técnica funciona eliminando completamente a zona hialina superficial do estroma que está anormal, permitindo a adesão epitelial<sup>33,48</sup>.

A terapia mais comum para o tratamento do SCCED é o debridamento superficial da córnea com *diamond burr*, que consiste na aplicação de uma broca diamantada acoplada a um motor de baixa rotação, sendo considerável uma terapia favorável em comparação com a ceratotomia em grade. Apesar de incomum, em 3% dos casos, pode ocorrer a ceratomalacia como complicação em cães tratados com *diamond burr*<sup>3</sup>.

Um estudo que utilizou lesões experimentais em córnea de cães saudáveis e receberam a aplicação do debridamento com *diamond burr* tiveram boa avaliação. Ao se utilizar o tempo de 45 segundos para a realização da técnica, foi possível observar na microscopia óptica, que a membrana basal teve maior remoção, quando comparada ao tempo de 30 segundos. O tempo mais longo do procedimento pode permitir uma maior penetração e retirada da zona hialina do estroma anterior que está anormal<sup>49</sup>.

A associação da técnica de debridamento com *diamond burr* e o uso de lente de contato terapêutica é um tratamento seguro e eficaz nas úlceras de córnea persistentes. Os cães do experimento que receberam esse tipo de tratamento apresentaram logo na primeira semana uma taxa de cicatrização de 70%. Em um segundo momento de reavaliação dos casos, entre 10 e 21 dias pós-procedimento, 92,5% apresentaram cicatrização da lesão. Enquanto que ao final da terceira reavaliação, todos os casos estavam resolvidos. Ainda assim, o uso da lente de contato terapêutica pós-desbridamento com *diamond burr* apresenta resultados mais satisfatórios na cicatrização das úlceras de córnea persistentes, quando comparadas aos cães que receberam apenas o uso de antibióticos tópicos. Esse estudo em particular relata que os sinais clínicos observados ao final da avaliação do tratamento

incluíam edema de córnea médio (60% dos casos), vascularização (35% dos casos), hiperemia conjuntival (35%), opacidade de córnea (23%) e grau de quemose (8% dos casos), sendo que a visão se manteve em todos os olhos até esta última avaliação<sup>50</sup>.

### **3.4 Células-tronco (CT)**

A célula-tronco é uma célula indiferenciada, com capacidade de autorrenovação e dependendo das condições fisiológicas ou experimentais a que são apresentadas, podem ser induzidas a sofrerem diferenciação e adotarem funções específicas. Esta célula está presente em todos os tecidos desde a formação do embrião até um indivíduo adulto, contudo sabe-se que sua capacidade de diferenciação diminui progressivamente. Enquanto ainda na formação e no desenvolvimento do embrião é considerada célula totipotente e pluripotente, mas a partir da formação dos tecidos e desenvolvimento de uma função, é considerada multipotente e oligopotente<sup>51</sup>.

As células-tronco embrionárias apresentam alto potencial de diferenciação, mas há riscos de um crescimento desordenado das CT e formações tumorais, fato este que requer atenção na aplicação dessas células na terapia clínica é uma realidade questionável. Ainda deve-se considerar que no Brasil as células-tronco embrionárias (CTEs) apresentam impedimentos legais, éticos e religiosos<sup>52</sup>.

Por outro lado, as células-tronco adultas são utilizadas na terapia clínica experimental com bastante frequência, pois ainda apresentam capacidades de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens, além do alto potencial proliferativo. Essas células estão localizadas em tecidos como o cordão umbilical, pele, rim, medula óssea, tecido adiposo e polpa dentária. São identificados dois grupos principais de células-tronco adultas (CTAs), as células-tronco hematopoéticas que dão origem as células da linhagem sanguínea e as células-tronco mesenquimais que dão origem a várias células do tecido conjuntivo<sup>53,54</sup>.

#### *3.4.1 Células-tronco mesenquimais*

As MSCs constituem uma população de células multipotentes que residem em muitos, se não em todos, tecidos e órgãos, sendo necessário um sistema complexo e altamente regulado para garantir que sejam mantidas em um estado indiferenciado, e proliferem a uma taxa apropriada para as necessidades do organismo e o suporte à autorrenovação intrínseca. Esses sistemas regulatórios são

organizados espacialmente no que são chamados de nichos de células-tronco<sup>55</sup>. Na medicina regenerativa os nichos de células-tronco mais utilizados são a medula óssea (porção estromal), tecido adiposo e tecido do cordão umbilical. No entanto, o número de MSCs isoladas a partir destes tecidos pode variar<sup>56</sup>.

A característica imunogênica das MSCs evita o risco de rejeição no transplante entre indivíduos diferentes da mesma espécie (transplante alogênico) e entre indivíduos de espécies diferentes (transplante xenogênico), visto que não expressam marcadores para as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC II). Apesar de expressarem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade tipo I (MHC I), as MSCs são incapazes de induzir aloreatividade em mamíferos<sup>57</sup>.

O potencial terapêutico das MSCs, especialmente a sua capacidade de regenerar tecidos danificados está sendo estudado em animais e em humanos<sup>58-60</sup>. Ainda apresenta diversos efeitos parácrinos ao produzir moléculas com ação anti-inflamatória, imunossupressora, antiapoptótica, angiogênica, antifibrótica e reparadora endógena, que contribuem para a recuperação e regeneração de outros tipos celulares e tecidos. Tais efeitos ocorrem, pois as MSCs secretam uma variedade diversificada de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas imunomoduladoras<sup>61</sup>.

As MSCs exercem ação ampla e significativa nas condições inflamatórias. Essas células agem tanto regulando de forma negativa a produção de citocinas pró-inflamatórias proveniente das células de defesa do organismo (macrófagos, neutrófilos e mastócitos), como ainda secretando interleucinas com ação anti-inflamatória, como por exemplo as interleucinas 4, 10 e 13<sup>62,63</sup>.

Na ação imunossupressora, as MSCs inibem a proliferação e a citotoxicidade dos linfócitos T, com exceção das células T reguladoras que secretam citocina com ação anti-inflamatória (IL-10). Esse mecanismo, que é multifatorial, ocorre com o aprisionamento destas células em fase do ciclo celular e o controle da produção das citocinas liberadas pelos linfócitos T<sup>57,64-66</sup>.

Além disso, as CTM secretam fatores bioativos envolvidos no processo de formação de novos vasos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento de hepatócito tipo 1 (HGF-1), fator derivado de célula-tronco tipo 1 (SDF-1) e angiopoietina<sup>67</sup>.

### 3.4.2 Células-tronco mesenquimais na córnea

Um nicho de MSCs está localizada na região do limbo da córnea e representa células quiescentes com alto potencial proliferativo. Essas células-tronco limbares residem na paliçada de Vogt, uma série de cristas fibrovasculares orientadas radialmente observadas no limbo humano. Em estudos histológicos relatou-se a presença de criptas epiteliais do limbo e foi proposto que elas abrigassem as células-tronco limbares (LSCs). Entretanto, em animais a paliçada e as criptas foram descritas apenas em porcos e ratos. Já nos animais domésticos de companhia (cães e gatos) a microestrutura do limbo é estudada e descrita com o mesmo detalhe do limbo nos seres humanos, o significado das similaridades interespecies e entre espécies é desconhecida<sup>68</sup>.

As LSCs estão distribuídas entre a região de estroma e epitélio da córnea. Na região do estroma limbal existe várias populações celulares, como fibroblastos, melanócitos, células imunes, incluindo células de Langerhans, macrófagos, células endoteliais vasculares e uma membrana basal<sup>68</sup>.

Os fibroblastos do estromal limbal, originários da crista neural, expressam os marcadores de MSCs e possuem a capacidade de se diferenciar em adipócitos, osteócitos, queratinócitos, células endoteliais vasculares, pericítos e epitélio da córnea *in vitro*. No entanto, não há evidências de que os fibroblastos de estroma limbo possam dar origem a LSCs ou epitélio da córnea *in vivo*<sup>69</sup>. Estas células suportam a autorrenovação das células progenitoras do epitélio límbico e aumentam a regulação de vários marcadores de queratócitos, são imunoprivilegiadas e possuem propriedades imunossupressoras, pois podem suprimir a proliferação de células T por secreção de fator de crescimento transformador tipo 1 beta (TGF- $\beta$ 1). Contudo são necessários mais estudos para compreender suas funções na cicatrização de feridas e regeneração do tecido corneano<sup>70</sup>.

Por outro lado, as células-tronco epiteliais limbares no processo de homeostase da córnea e na cicatrização de feridas proliferam e dão origem as CTA que se dividem, sofrem diferenciação e migram para o centro da córnea com intuito de regenerar as camadas epiteliais. Ocorre uma migração centrípeta dessas células juntamente ao local da lesão, mediada por fatores de crescimento, citocinas, matriz extracelular e receptores de integrinas. Entre os fatores de crescimento que ativam as células-tronco epiteliais limbares (LESC) estão o fator de crescimento de queratinócitos nos fibroblastos do limbo e seus receptores nas células epiteliais, o

fator de crescimento semelhante a insulina (1 e 2) e seus receptores, além do fator derivado do epitélio pigmentado<sup>71</sup>. Esse mecanismo cinético de atuação das LESC, descrito anteriormente, faz parte da hipótese X, Y e Z para a manutenção das células epiteliais da córnea, onde o crescimento celular vertical da camada basal (X) e a migração centrípeta das células (Y) igualam a perda celular na superfície corneana (Z)<sup>72</sup>.

### **3.5 Potencial terapêutico das células-tronco na cicatrização da córnea e na superfície ocular**

As MSCs são células promissoras como ferramenta da terapia celular na medicina regenerativa. Apesar de alguns estudos iniciais demonstrarem que estas células transplantadas para a córnea não eram capazes de se diferenciar em células epiteliais *in vivo*, os estudos mais atuais quebraram este paradigma<sup>73</sup>.

Um estudo desenvolvido com coelhos mostrou uma perspectiva futura promissora para as MSCs. As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea foram marcadas quimicamente, colocadas em gel de fibrina e transplantadas para a córnea com queimadura por álcali. Estas células participaram na cicatrização da córnea e expressaram marcador para citoqueratina epitelial (CK3), implicando que as MSCs da medula óssea se diferenciaram em células epiteliais da córnea<sup>74</sup>.

A cicatrização de úlceras de córnea em ratos, após a queimadura por álcali, foi acelerada e houve inibição da neovascularização com a aplicação subconjuntival de MSCs extraída da medula óssea. Basicamente, os resultados do estudo descobriram que as MSCs podem exercer efeitos terapêuticos, suprimindo a reação inflamatória precoce de células locais da córnea e células da imunidade inata por meio de mecanismos parácrinos. Os grupos tratados com MSCs apresentaram níveis mais baixos e significativos de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e proteína inflamatório de macrófago tipo I alfa (MIP-1 $\alpha$ )<sup>75</sup>.

Em coelhos, úlceras de córnea experimentais por álcalis receberam enxerto autólogo de MSCs derivadas de tecido adiposo, diluídas em solução tampão fosfato-salino e aplicadas intraestromal, subconjuntival e tópica. Foi demonstrado que o uso de MSCs na fase aguda do trauma químico da córnea está associado com menos angiogênese, pois há redução do fator VEGF; menos opacidade, melhor e mais rápida cicatrização da lesão de córnea<sup>76</sup>.

Em úlceras promovidas por queimaduras com etanol e tratadas com MSCs tópica foram avaliados os níveis de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. As MSCs produziram uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que são reconhecidamente importantes na cicatrização de feridas na córnea. Entre os fatores de crescimento, os níveis de VEGF e TGF- $\beta$ 1 foram superiores aos do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e HGF. Entre as citocinas e quimiocinas inflamatórias, proteína quimiotática de monócito tipo 1 (MCP-1), interleucina tipo 8 (IL-8) e interleucina tipo 6 (IL-6) foram detectadas em níveis moderados<sup>77</sup>.

Pesquisas com cães portadores de ceratoconjuntivite seca e tratados com MSCs foram realizadas por alguns pesquisadores. Contudo, apesar da doença envolver a participação direta das glândulas lacrimais, foi possível observar ação sobre a superfície ocular<sup>78-80</sup>. Um dos experimentos iniciais, utilizou a aplicação de MSCs na glândula lacrimal principal ( $5 \times 10^6$  células) e da terceira pálpebra ( $3 \times 10^6$  células). Os pesquisadores observaram aumento significativo dos valores do teste de Schirmer até 9 meses de acompanhamento, quando comparados com os valores basais. Além disso, a descarga ocular, hiperemia conjuntival e alterações da córnea também apresentaram redução durante todo o período de tempo<sup>78</sup>.

Ainda com relação a KCS, em cães que receberam a aplicação de MSCs ( $1 \times 10^6$  células) intra glandulares, foram observados aumento dos valores do teste de Schirmer, regressão da descarga conjuntival e hiperemia conjuntival, apesar de manter a opacidade corneana e a vascularização na maioria dos animais. A terapia foi considerada segura e eficiente para a doença<sup>79</sup>.

Outro estudo mais recente envolvendo cães com KCS, empregou a aplicação tópica das MSCs ( $1 \times 10^6$  células), no saco conjuntival. A pesquisa revelou melhora significativa dos sinais clínicos oculares, como redução da secreção conjuntival, da opacidade corneana, na neovascularização e pigmentação, além de aumento dos valores de teste de Schirmer. Os exames histopatológicos da conjuntiva revelaram aumento do número de células calciformes e redução de polimorfonucleares. Ainda assim, os exames de imunohistoquímica revelaram redução dos marcadores inflamatórios (CD4, IL-6, IL-1 e TNF $\alpha$ )<sup>80</sup>.

Mais recentemente foram empregadas duas aplicações de MSCs ( $2 \times 10^6$  células), por via subconjuntival, no tratamento de ceratite eosinofílica de gatos. Os sinais clínicos da doença apresentaram uma mudança significativa ao longo dos 11

meses de observação dos pacientes. Foi observada uma regressão da proliferação inflamatória da córnea e uma diminuição progressiva da vascularização nas primeiras semanas de tratamento. Não houve complicações local ou sistêmica durante o estudo e a terapia foi considerada segura, efetiva e bem tolerada para a espécie<sup>81</sup>.

Diante do material bibliográfico apresentado, pode-se constatar que nos últimos anos, o uso de células-tronco surgiu como uma ferramenta eficaz, com capacidade para auxiliar e melhorar a cicatrização de feridas para o benefício dos pacientes. Especialmente nos casos de cicatrização tardia, incompleta ou excessiva, que continuam a ser uma preocupação clínica significativa e exige o desenvolvimento de novas terapêuticas eficientes<sup>71</sup>.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa trata-se de um estudo clínico não randomizado em medicina veterinária realizado com 18 cães (*Canis lupus familiaris*) portadores de defeito epitelial corneano crônico espontâneo, de variadas raças, entre machos e fêmeas, com idade média de 9,4 ( $\pm 3,2$ ) anos. O estudo prospectivo e intervencionista foi realizado em uma clínica veterinária especializada em atendimento oftalmológico e todos os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética de Cuidados e Uso Animal da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, sob o protocolo número 3988-1 (Anexo 1). Os tutores dos animais assinaram o termo de consentimento (Apêndice 1).

### 4.1 Critérios de seleção dos animais na pesquisa

Os animais incluídos na pesquisa são da espécie canina (*Canis lupus familiaris*), que buscaram atendimento oftalmológico especializado e apresentaram quadro clínico compatível com a descrição da doença, que inclui: uma lesão ulcerativa de córnea superficial, não infectada, com presença de bordas epiteliais soltas na margem da lesão, positivas para o teste de fluoresceína, com impregnação do corante abaixo do epitélio, que não cicatrizaram após três semanas de tratamento tópico prévio, a base de antibiótico (1 gota de solução oftálmica a base de tobramicina, a cada 6 horas), lubrificante ocular (1 gota de solução oftálmica a base de hidroxipropil guar, a cada 6 horas) e anticolagenolítico (1 gota de solução oftálmica a base de EDTA 0,35%, a cada 6 horas). Os cães não apresentavam alterações hematológicas (hemograma e contagem de plaquetas) e bioquímicas (dosagem de uréia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e proteínas totais) e de imagem (raio-x torácico e ultrassonografia abdominal) que contraindicassem a terapia celular.

### 4.2 Critérios de exclusão dos animais da pesquisa

Os critérios de exclusão adotados para a pesquisa foram a presença de outras condições oculares que pudessem ser a causa ou a perpetuação da doença, tais como: o diagnóstico de olho seco, processos infecciosos da córnea, conjuntiva ou pálpebras; alterações de conformação palpebral congênitas ou adquiridas, assim como distúrbios dos cílios. Além de doença sistêmica, incluindo a presença de neoplasia ou histórico de tratamento de neoplasia, que contraindicassem a terapia celular.

### 4.3 Grupos de animais

Para a realização da pesquisa os animais foram classificados em dois grupos, conforme a tipo de terapia e ou tratamento empregado, a saber:

#### 4.3.1 Grupo Debridamento (GD)

Oito cães com diagnóstico de SCCED submetidos a anestesia geral inalatória e o tratamento cirúrgico de debridamento superficial com *diamond burr*, caracterizados conforme o Quadro 1.

**Quadro 1.** Caracterização dos animais do Grupo Debridamento.

Cães	Raças	Sexo	Olho afetado	Idade
1	Sem raça definida	Fêmea	Esquerdo	5
2	Sem raça definida	Fêmea	Direito	12
3	Whelsi Corgi Pembroke	Macho	Direito	12
4	Golden Retrievier	Fêmea	Direito	14
5	Boxer	Fêmea	Direito	12
6	Boxer	Macho	Esquerdo	11
7	Labrador	Fêmea	Esquerdo	10
8	Buldogue Francês	Macho	Direito	5

Os cães receberam por via intramuscular 3mg/kg de cloridrato de petidina 50 mg/mL e 0,05 mg/kg de acepromazina 0,2%, como medicação pré-anestésica. Após 20 minutos, a indução foi realizado por meio de administração endovenosa de 4 mg/kg de propofol, em 2 minutos. Foi realizada a intubação endotraqueal e manutenção da anestesia inalatória com isoflurano 0,6% em oxigênio a 100%. E, topicamente, foi aplicado 1 gota de solução oftálmica a base de cloridrato de proximetacaína 0,5%.

Os olhos afetados e suas pálpebras receberam assepsia com 10 mL de solução fisiológica 0,9% estéril diluída em polvidine tópico, na proporção de 1:100. Posteriormente foi colocado o campo cirúrgico fenestrado estéril, o blefaroestado Barrequer e realizado o debridamento superficial com *diamond burr*. A conjuntiva bulbar foi pinçada delicadamente, com auxílio de uma pinça anatômica dente-de-rato, para fixação do globo ocular e a broca estéril foi aplicada em toda a superfície corneana por um período de 45 segundos para remoção do epitélio.

Ao final do procedimento, os cães receberam por via subcutânea 0,2 mg/kg de meloxicam 0,2% e foram monitorados até a completa recuperação anestésica, com manutenção de sinais vitais (frequência respiratória, frequência cardíaca e temperatura corporal) dentro dos valores normais para a espécie.

Os animais foram liberados para retorno ao domicílio e receberam no tratamento pós-operatório aplicação tópica de solução oftálmica a base de tobramicina, 1 gota a cada 6 horas; solução oftálmica a base de EDTA dissódico 0,35% colírio, 1 gota a cada 6 horas; e solução oftálmica a base de hidroxipropil guar, 1 gota a cada 8 horas. Esse tratamento oftálmico foi mantido até a cicatrização da córnea.

Para controle de dor, foi prescrito dipirona monohidratada, por via oral na dose de 25 mg/Kg, a cada 8 horas, durante 4 dias consecutivos. Foi indicado, ainda, como parte do tratamento o uso contínuo do colar protetor até a cicatrização da córnea.

#### *4.3.2 Grupo Células-tronco (GCT)*

Dez cães com diagnóstico de SCCED submetidos ao tratamento com MSCs, caracterizados conforme o Quadro 2.

**Quadro 2.** Caracterização dos animais do Grupo Células-tronco.

Cães	Raças	Sexo	Olho afetado	Idade
1	Pequinês	Macho	Esquerdo	13
2	Boxer	Fêmea	Esquerdo	9
3	Boxer	Fêmea	Esquerdo	11
4	Shih tzu	Macho	Esquerdo	13
5	Boxer	Fêmea	Esquerdo	8
6	Golden Retriever	Macho	Esquerdo	8
7	Yorkshire	Fêmea	Esquerdo	10
8	West Highland White	Fêmea	Direito	2
9	Poodle	Macho	Direito	9
10	Lhasa apso	Macho	Esquerdo	6

Os cães foram mantidos no consultório até a preparação da terapia celular. Anterior a aplicação, os olhos afetados eram limpos com solução fisiológica estéril 0,9% e auxílio de compressa de gaze estéril, para retirada de secreção ocular.

As MSCs criopreservadas foram descongeladas e processadas, conforme protocolo descrito adiante, até a obtenção de um botão celular com aproximadamente um milhão de MSCs. Em seguida, essas MSCs foram ressuspensas em 50 microlitros de solução fisiológica estéril 0,9% e aplicadas no saco conjuntival do olho afetado, com auxílio de uma micropipeta volumétrica, uma vez ao dia, por um período consecutivo de cinco dias.

Para maior conforto do aplicador, os animais foram posicionados sobre a mesa de atendimento veterinário para a aplicação da terapia celular.

Os animais foram liberados para retorno ao domicílio e receberam a indicação de lubrificação do olho afetado com solução oftálmica a base de hidroxipropil guar, 1 gota a cada 8 horas, para maior conforto. Foi indicado também como parte do tratamento o uso do colar protetor. Ambos esses tratamentos foram mantidos até a completa cicatrização da córnea.

#### 4.4 Avaliação clínica dos animais da pesquisa

Previamente ao estudo, os cães foram submetidos a avaliações sistêmica e oftalmológica pelo mesmo pesquisador. A avaliação oftalmológica incluiu um exame neuro-oftalmológico (reflexo de ofuscamento, reflexo pupilar fotomotor e teste de resposta à ameaça), teste de lacrimal de Schirmer I (*Schirmer Test*, Ophthalmos®, São Paulo), tonometria de aplanção após instilação de solução oftálmica anestésica (*Tono-Pen*, Reichert Inc®, United States of America), teste de fluoresceína (Tiras de Fluoresceína, Ophthalmos®, São Paulo), exame de biomicroscopia de lâmpada de fenda (*Kowa*, Japan®) e oftalmoscopia indireta com lente de 20 dioptrias após instilação de solução oftálmica midrática (*Ocular Instruments*®, United States of America).

A monitorização dos cães foi prevista em quatro momentos após o debridamento e ao final da terapia celular, com 7 dias (T1), 14 dias (T2), 21 dias (T3) e 28 dias (T4). Durante o acompanhamento clínico dos animais, em caso de necessidade, outras avaliações foram realizadas após T4. A monitorização compreendeu um exame oftálmico realizado por dois médicos veterinários especializados em oftalmologia, para avaliação da superfície corneana de acordo com alguns critérios, adaptado de *Hackett-McDonald Ocular Scoring System*<sup>82</sup> e o teste de fluoresceína.

Os avaliadores tinham conhecimento de que grupo perteciam cada animal envolvido na pesquisa, ou seja, sabiam que tipo de tratamento foi empregado no olho afetado. Contudo, a utilização de dois avaliadores foi empregada para consenso na decisão da pontuação selecionada no critério clínico avaliado presencialmente.

Ao final do tempo de monitorização (28 dias), os cães foram reavaliados para o teste de lacrimal de Schirmer I e tonometria de aplanção após instilação de solução oftálmica anestésica.

Foi realizado o registro fotográfico do olho afetado ao longo das avaliações com o auxílio de uma câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-H300®, a fim de criar um banco de imagem para ilustração da pesquisa.

##### 4.4.1 Congestão conjuntival

- 0 (normal): pode aparecer branco a rosa avermelhado sem injeção perilimbal com vasos da conjuntiva palpebral e bulbar definidos e facilmente observados;

- +1 (suave): uma cor avermelhada, ruborizada, predominantemente confinada a conjuntiva palpebral com alguma injeção perilimbal localizada principalmente a região superior e ou inferior do olho;
- +2 (moderado): a conjuntiva palpebral aparece vermelho brilhante com acompanhamento de injeção perilimbal cobrindo 75% da circunferência perilimbal;
- +3 (severo): tanto a conjuntiva bulbar quanto a palpebral exibem uma cor escura, vermelho carnososa, com injeção perilimbal pronunciada.

#### 4.4.2 Descarga conjuntival

- 0 (normal): pode incluir uma pequena quantidade de material mucoide claro que é normalmente encontrada no canto medial do olho de um grande número de animais;
- +1 (suave): a descarga está acima do normal e presente, na parte interna do olho, mas não nas pálpebras ou pelos das pálpebras;
- +2 (moderado): a descarga está abundante, facilmente observada, e acumulada nos bordos e ao redor dos pelos das pálpebras;
- +3 (severo): a descarga está fluindo acima das pálpebras de modo a molhar substancialmente a pele e os pelos ao redor dos olhos.

#### 4.4.3 Severidade da opacidade de córnea

- 0 (normal): aparece com a lâmpada de fenda como tendo uma linha cinza brilhante na superfície epitelial e uma linha cinza brilhante na superfície do endotélio, com uma aparência cinzenta uniforme semelhante no estroma;
- +1 (mínimo): com iluminação difusa, as estruturas subjacentes são claramente visíveis, embora algumas opacidades possam ser facilmente evidentes;
- +2 (suave): com iluminação difusa, as estruturas subjacentes são visíveis, embora possa haver alguma perda de detalhe;
- +3 (moderado): envolve toda a espessura do estroma. Com secção óptica, a superfície endotelial ainda é visível. Contudo, com iluminação difusa, as estruturas adjacentes são menos visíveis;
- +4 (severo): envolve toda a espessura do estroma. Com secção óptica, a superfície endotelial não é visível. Com iluminação difusa, as estruturas adjacentes são visíveis.

#### 4.4.4 Aferição da superfície ocular (aplicado para avaliar a área de opacidade corneana e/ou área da córnea corada com fluoresceína)

- 0 (normal): não há área de opacidade;
- +1: menos de um quarto de área da córnea;
- +2: um quarto para menos de metade da área da córnea;
- +3: metade para menos que três quartos da área da córnea;
- +4: três quartos ou a maior área da córnea.

#### 4.4.5 Vascularização

- 0 (normal): ausência de vascularização;
- +1: mediamente afetado;
- +2: moderadamente afetado;
- +3: severamente afetado.

#### 4.4.6 Blefaroespasmos

Para esse critério foi considerada a classificação como ausente (0) ou presente (+1).

#### 4.4.7 Pigmentação

Para esse critério foi considerada a classificação como ausente (0) ou presente (+1).

#### 4.4.8 Tempo de cicatrização

O tempo de cicatrização da córnea foi considerado como o tempo transcorrido entre o fim da terapia celular (a partir da quinta e última aplicação das MSCs) ou técnica cirúrgica (debridamento) até o restabelecimento da superfície ocular com o teste de fluoresceína negativo realizado a cada tempo de monitorização dos cães. Definiu-se como cicatrização e melhora clínica dos animais, o reestabelecimento da superfície ocular com ausência de retenção da fluoresceína e de epitélio solto no local de origem da lesão.

#### 4.5 Células-tronco mesenquimais

As MSCs foram fornecidas e processadas por um laboratório privado (Regenera Medicina Veterinária Avançada em Campinas, São Paulo) que cumpre os padrões da Sociedade Internacional de Terapia Celular.

As MSCs derivadas do tecido adiposo foram isoladas de cães fêmeas saudáveis, sem raça definida, com 6 a 12 meses de idade. As amostras de gordura visceral foram coletadas a partir do ovário, durante cirurgias eletivas, independentes da pesquisa. Antes do procedimento, os cães são avaliados na rotina clínica, com a realização de exames hematológicos (hemograma, contagem de plaquetas e proteínas totais) e triagem viral. Após a coleta, os fragmentos de gordura são transportados em meio, sendo as amostras processadas em até 2 horas. As células do tecido adiposo foram isoladas por meio de um protocolo baseado na fragmentação, seguido por digestão, conforme procedimentos descritos por Mambelli e colaboradores<sup>83</sup>. As células isoladas foram plaqueadas para criar a cultura basal. As culturas são incubadas a 37° Celsius em umidade atmosférica contendo CO<sub>2</sub> a 5%. Após 4 a 7 dias as células são lavadas, duas vezes com solução salina fosfatada, dissociada com tripsina 0,25% e expandidas.

As MSCs isoladas de cada animal não apresentaram diferenças nos marcadores para MSCs e no potencial de diferenciação. Todas as linhagens expressam os principais marcadores para MSCs, conforme definido pelo Comitê de Células-tronco Mesenquimais e Tecidos, da Sociedade Internacional de Terapia Celular, como CD34 (-), CD45 (-), HLA-II (-), CD73 (+), CD 90 (+) e CD105 (+), segundo análises específicas<sup>83,84</sup>.

A habilidade das células em se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos foram também confirmadas por meio do protocolo de Dominici e colaboradores<sup>84</sup>. As células são livres de patógenos e contaminantes (bactérias, fungos, vírus, micoplasma e endotoxinas). Após a caracterização as células são criopreservadas em doses de  $1 \times 10^6$  células em temperatura de -80° Celsius e mantidas em nitrogênio líquido.

As MSCs são fornecidas acondicionadas em caixas de isopor preenchidas com gelo seco (dióxido de carbono em estado sólido a -80° Celsius), juntamente com pipetas de Pasteur e 3 tubos plásticos de ensaio com soluções para passagem e lavagem sequenciais. As MSC foram descongeladas (inferior a 2 minutos) em banho-maria a 37° Celsius e transferidas para a primeira solução com meio de cultura basal,

volume de 5 mL, e levadas à centrifugação a 300 xg durante 5 minutos. Depois, as células foram lavadas duas vezes com 4 mL de solução salina balanceada e, novamente, centrifugada com a mesma velocidade de centrifugação. O resultado é um botão de células no fundo do tubo de ensaio com um milhão de MSCs que foram finalmente ressuspensos em 50 microlitros de solução salina estéril 0,9% e aplicado no saco conjuntival do olho afetado, com auxílio de uma micropipeta volumétrica, uma vez ao dia, por um período consecutivo de cinco dias.

#### **4.6 Análise estatística**

Os dados da pesquisa foram analisados por meio de técnicas estatísticas descritivas (mínimo, máximo, média e desvio padrão), assim como a distribuição de frequência por meio de histogramas. Utilizou-se o teste *Shapiro-Wilk* para analisar se os dados eram paramétricos ou não paramétricos.

Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Friedman's two-way ANOVA* para analisar os efeitos do tratamento nas variáveis congestão conjuntival, descarga conjuntival, severidade da opacidade corneana e aferição da superfície ocular e de forma sequencial foi realizado o teste de *Dunnet* para comparação de dois a dois. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney U*.

A análise estatística foi realizada no programa SPSS *Statistics* 20.0. Considerando a rejeição da hipótese de nulidade de 5% ( $p < 0,05$ ) para todas as situações.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise do tempo de cicatrização da córnea por grupo

O tempo médio de cicatrização da córnea, nos grupos Debridamento e Células-tronco, respectivamente, foi de 23,1 ( $\pm 9,9$ ) dias e 21,0 ( $\pm 9,8$ ) dias.

A comparação do tempo de cicatrização não revelou diferença significativa entre os grupos (Gráfico 1).

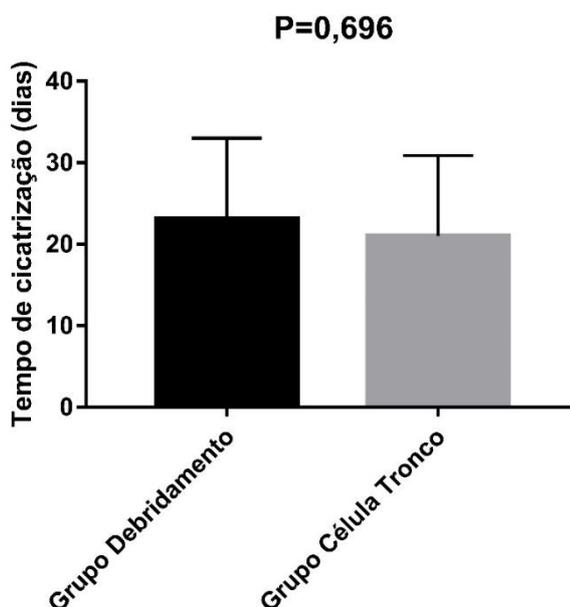


Gráfico 1. Histograma dos valores médio e desvios-padrão do tempo de cicatrização da córnea dos cães dos grupos (GCT e GD) tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.

Ao observar o número de casos cicatrizados ao longo do tempo pode-se constatar a seguinte distribuição para os grupos. No grupo Células-tronco, um total de 1/10 (10%) dos casos estava resolvido até a primeira avaliação (T1). Na segunda avaliação (T2), três casos adicionais estavam cicatrizados até este tempo, levando a um total de 4/10 (40%) casos resolvidos. Já na terceira avaliação (T3), mais três outros casos estavam cicatrizados, levando a um total de 7/10 (70%) casos resolvidos. Enquanto que na avaliação final (T4), mais dois casos adicionais estavam cicatrizados e um total de 9/10 (90%) casos resolvidos. O outro caso não estava completamente resolvido até a última avaliação, sendo necessário estender o acompanhamento até o 42º dia. Este paciente (cão número 6) recebeu intervenção com pomada oftálmica

a base de ciclosporina 0,5%, a cada 12 horas, devido a presença de intenso tecido de granulação no processo de cicatrização da córnea. Ao final de sua avaliação (42º dia), a córnea estava cicatrizada.

Já o grupo Debridamento, apresentou casos cicatrizados somente a partir da segunda avaliação (T2), sendo 2/8 (25%) casos resolvidos. Na terceira avaliação (T3), mais quatro casos adicionais estavam cicatrizados, levando a um total de 6/8 (75%) casos resolvidos. Enquanto que na avaliação final (T4), mais um caso adicional estava cicatrizado e um total de 7/8 (87,5%) casos resolvidos. O outro caso, cão número 4, não estava completamente resolvido até a última avaliação, sendo necessário estender o acompanhamento até o 45º dia. Também houve a formação de tecido de granulação durante a cicatrização deste caso e optou-se pela intervenção com pomada oftálmica a base de ciclosporina 0,5%, a cada 12 horas.

## **5.2 Análise do teste de Schirmer I e pressão intraocular por grupo, no pré (T0) e pós-procedimento(T4)**

O valor médio de produção de lágrima no pré-procedimento (T0), nos grupos Debridamento e Células-tronco, respectivamente, foi de 27,1 ( $\pm 1,8$ ) milímetros e 26,9 ( $\pm 1,9$ ) milímetros. No pós-procedimento (T4), ao final da avaliação, o valor médio de produção de lágrima foi, respectivamente, 20,0 ( $\pm 1,6$ ) milímetros e 19,6 ( $\pm 1,9$ ) milímetros.

O valor médio da pressão intraocular no pré-procedimento, nos grupos Debridamento e Células-tronco, respectivamente, foi de 13,3 ( $\pm 2,0$ ) mmHg e 14,4 ( $\pm 2,0$ ) mmHg. No pós-procedimento, ao final da avaliação, o valor médio da PIO foi, respectivamente, 14,3 ( $\pm 2,1$ ) mmHg e 14,1 ( $\pm 1,7$ ) mmHg.

A comparação do teste de Schirmer mostrou que houve diferença significativa (GD  $p=0,011$  e GCT  $p= 0,004$ ) na produção de lágrima entre o pré e pós-procedimento, para ambos os grupos. Enquanto que a comparação da tonometria mostrou que não houve diferença significativa na PIO entre os grupos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do tratamento no teste de Schirmer e pressão intraocular, entre os grupos (GD e GCT).

Variável	Grupo	Pré	Pós	%	Efeito do Tratamento	<i>P&lt;0,05</i>	
						Comparação do Pré	Comparação do Pós
Teste de Schirmer	Debridamento	27,1±1,8	20,0±1,6	-26,1	0,011*	0,829	0,633
	Célula-tronco	26,9±1,9	19,6±1,9	-27,1	0,004*		
Pressão intraocular	Debridamento	13,3±2,0	14,3±2,1	7,5	0,099	0,315	1,000
	Célula-tronco	14,4±2,0	14,1±1,7	-2,0	0,317		

### 5.3 Análise da superfície ocular por grupo

#### 5.3.1 Grupo Debridamento (GD)

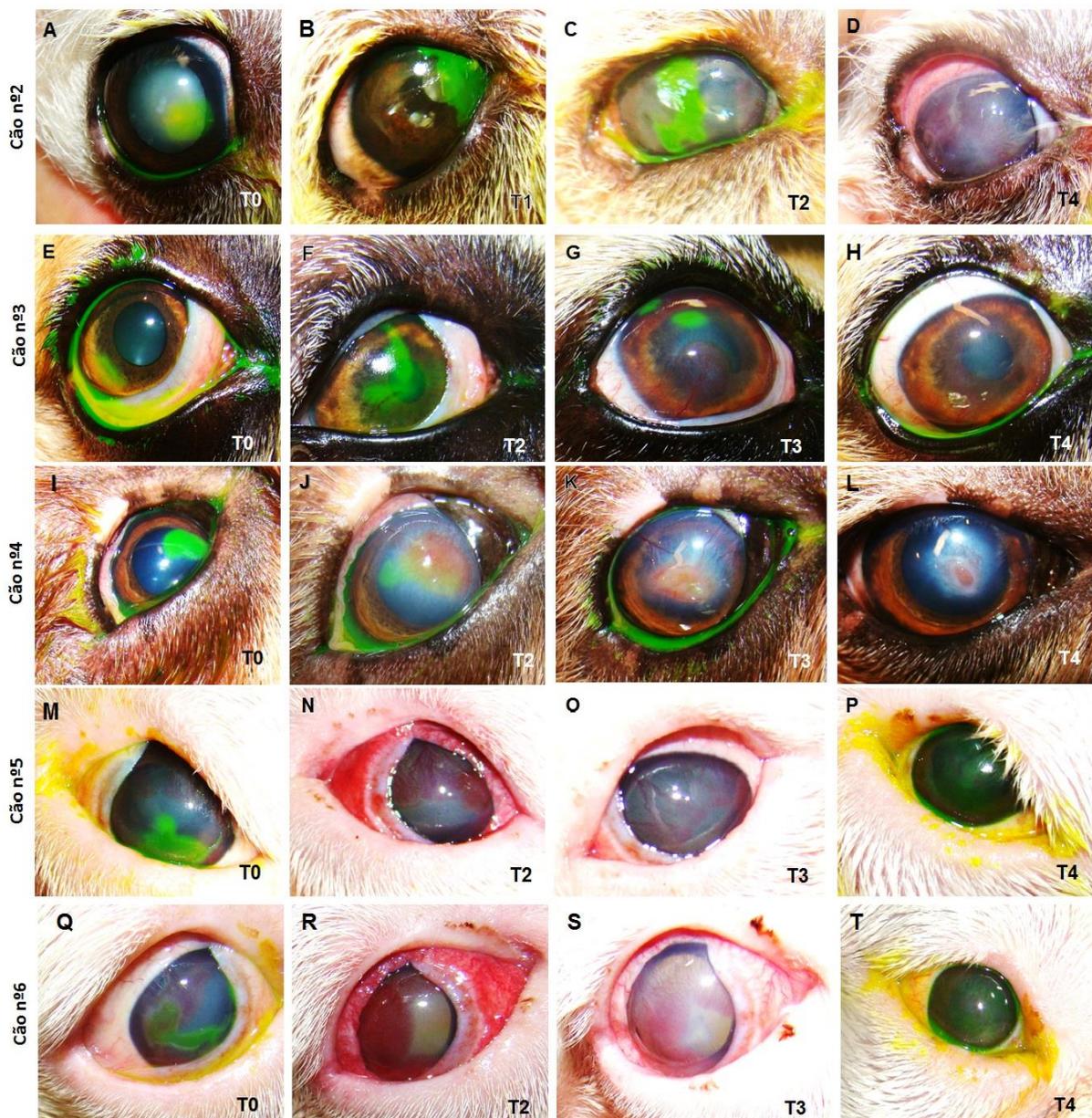
Anterior ao procedimento cirúrgico de debridamento com *diamond burr*, todos os cães (8/8; 100% dos casos) apresentavam congestão conjuntival ( $\bar{x}=1,25$ ), descarga conjuntival ( $\bar{x}=1,125$ ) e opacidade de córnea ( $\bar{x}=1,625$ ), enquanto que vascularização corneana ( $\bar{x}=1,5$ ) foi observada em apenas 5/8 (62,5%) casos e nenhum caso apresentava pigmentação corneana. Estes sinais estavam presentes em diferentes pontuações (Figura 1A, E, I, M, Q e Apêndice 2).

Após o procedimento cirúrgico, foram observadas melhoras nos olhos dos cães, como a redução significativa da congestão conjuntival ( $p<0,001$ ), descarga conjuntival ( $p<0,001$ ), severidade da opacidade de córnea ( $p=0,001$ ) e aferição da superfície ocular ( $p=0,020$ ) (Gráficos 2, 3, 4 e 5).

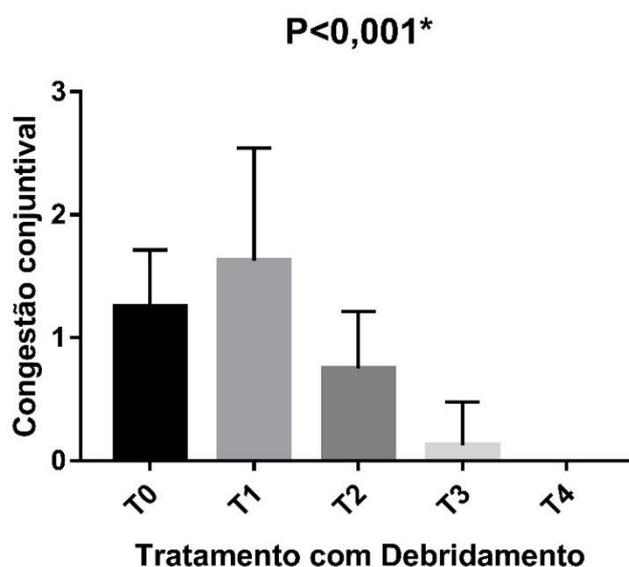
Na comparação entre os critérios clínicos avaliados e os tempos de monitorização (T0 a T4), as diferenças significativas foram na congestão conjuntival de T0 ( $\bar{x}=1,25$ ) para T4 ( $\bar{x}=0$ ) e de T1 ( $\bar{x}=1,625$ ) para T3 ( $\bar{x}=0,125$ ) e T4 ( $\bar{x}=0$ ); na descarga conjuntival de T0 ( $\bar{x}=1,125$ ) para T3 ( $\bar{x}=0,125$ ) e T4 ( $\bar{x}=0$ ), de T1 ( $\bar{x}=1$ ) para T4 ( $\bar{x}=0$ ); na severidade da opacidade de córnea de T0 ( $\bar{x}=1,625$ ) para T3 ( $\bar{x}=0,50$ ) e T4 ( $\bar{x}=0,375$ ); e na aferição da superfície ocular de T0 ( $\bar{x}=2$ ) para T4 ( $\bar{x}=0,75$ ), de T1 ( $\bar{x}=1,75$ ) para T3 ( $\bar{x}=0,75$ ) e T4 ( $\bar{x}=0,75$ ) (Figura 1E-H, M-P, Q-T).

Houve uma diferença entre os tempos de avaliação do critério vascularização corneana ( $p=0,049$ ), apresentando uma diminuição de T0 ( $\bar{x}=1,5$ ) para T4 ( $\bar{x}=0,562$ ) (Figura 1G-H, J-L, N-P, R-T e Gráfico 6). Houve ainda melhoria no blefaroespasma ao longo do tempo, com significativa diferença ( $p<0,001$ ) de T0 ( $\bar{x}=1$ ) para T4 ( $\bar{x}=0$ )

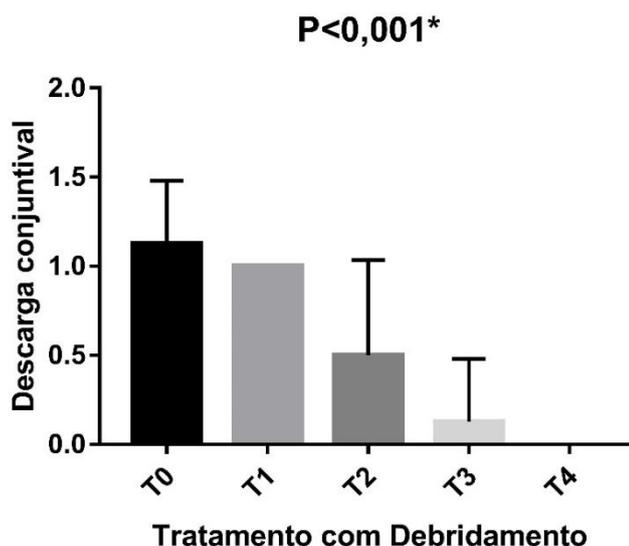
(Gráfico 7) e, após o debridamento, a presença de pigmentação corneana foi observada em alguns casos, mas sem diferença significativa ( $p=0,406$ ) (Gráfico 8).



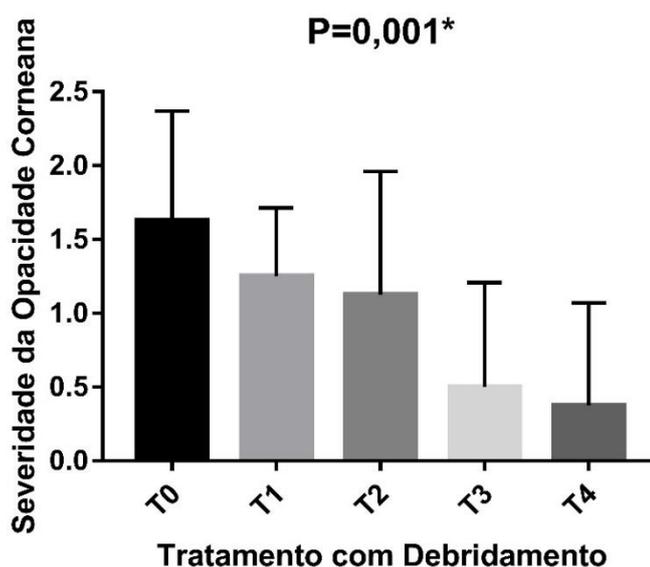
**Figura 1.** Representação da avaliação macroscópica do processo de cicatrização da córnea após debridamento com *diamond burr*. As imagens demonstram os sinais clínicos antes do procedimento (T0) (A, E, I, M, Q) e após o debridamento (B, C, D, F, G, H, J, K, L, N, O, P, R, S, T), em diferentes tempos de avaliação (T1-T4).



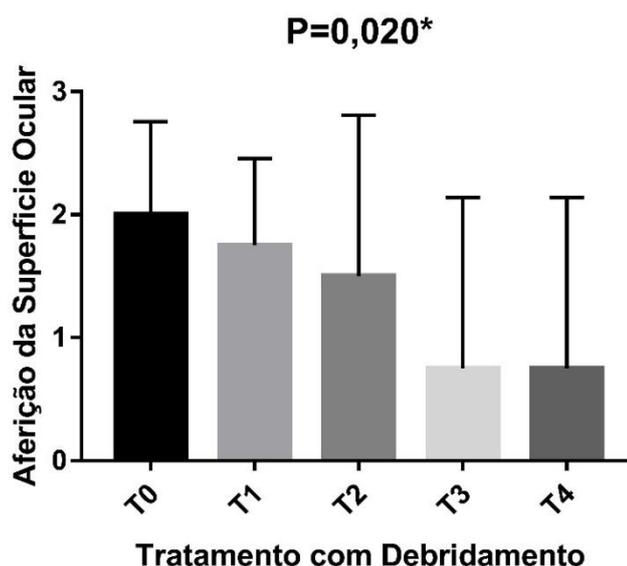
**Gráfico 2.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para a congestão conjuntival avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p<0,001^*$ ), por tempo (T0 para T4, T1 para T3 e T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



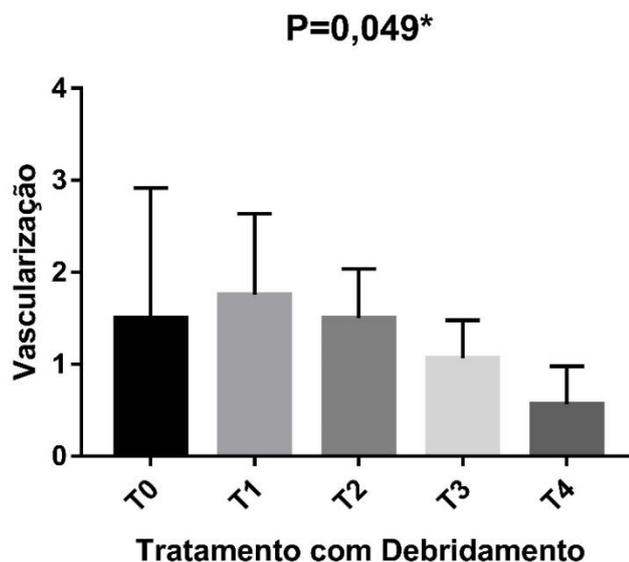
**Gráfico 3.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para a descarga conjuntival avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p<0,001^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4, T1 para T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



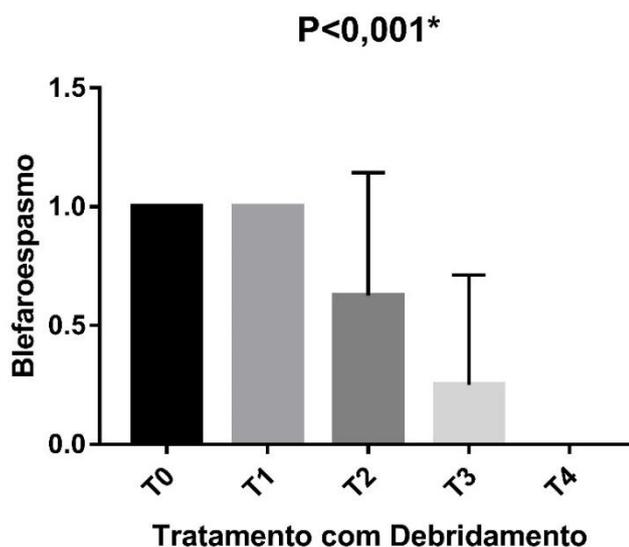
**Gráfico 4.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para a severidade da opacidade corneana avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



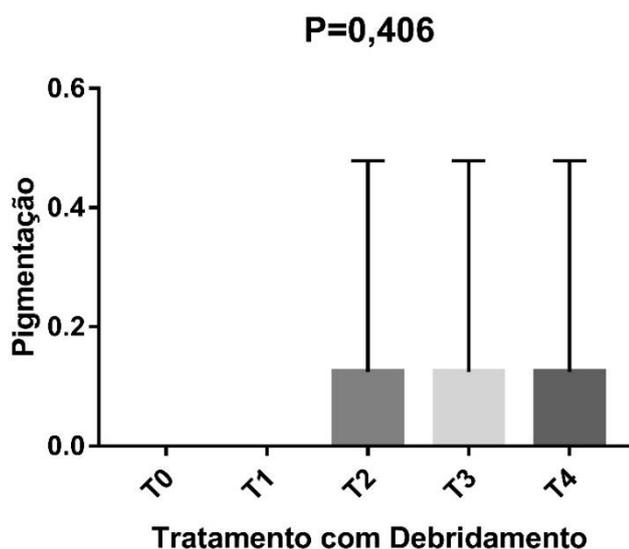
**Gráfico 5.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para a aferição da superfície ocular avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,020^*$ ), por tempo (T0 para T4, T1 para T3 e T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 6.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para a vascularização corneana avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,020^*$ ), por tempo (T0 para T2,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 7.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para blefaroespasmio avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4, T1 para T3 e T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 8.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para pigmentação corneana avaliada nos cães do Grupo Debridamento ( $p=0,406$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.

### 5.3.2 Grupo Células-tronco (GCT)

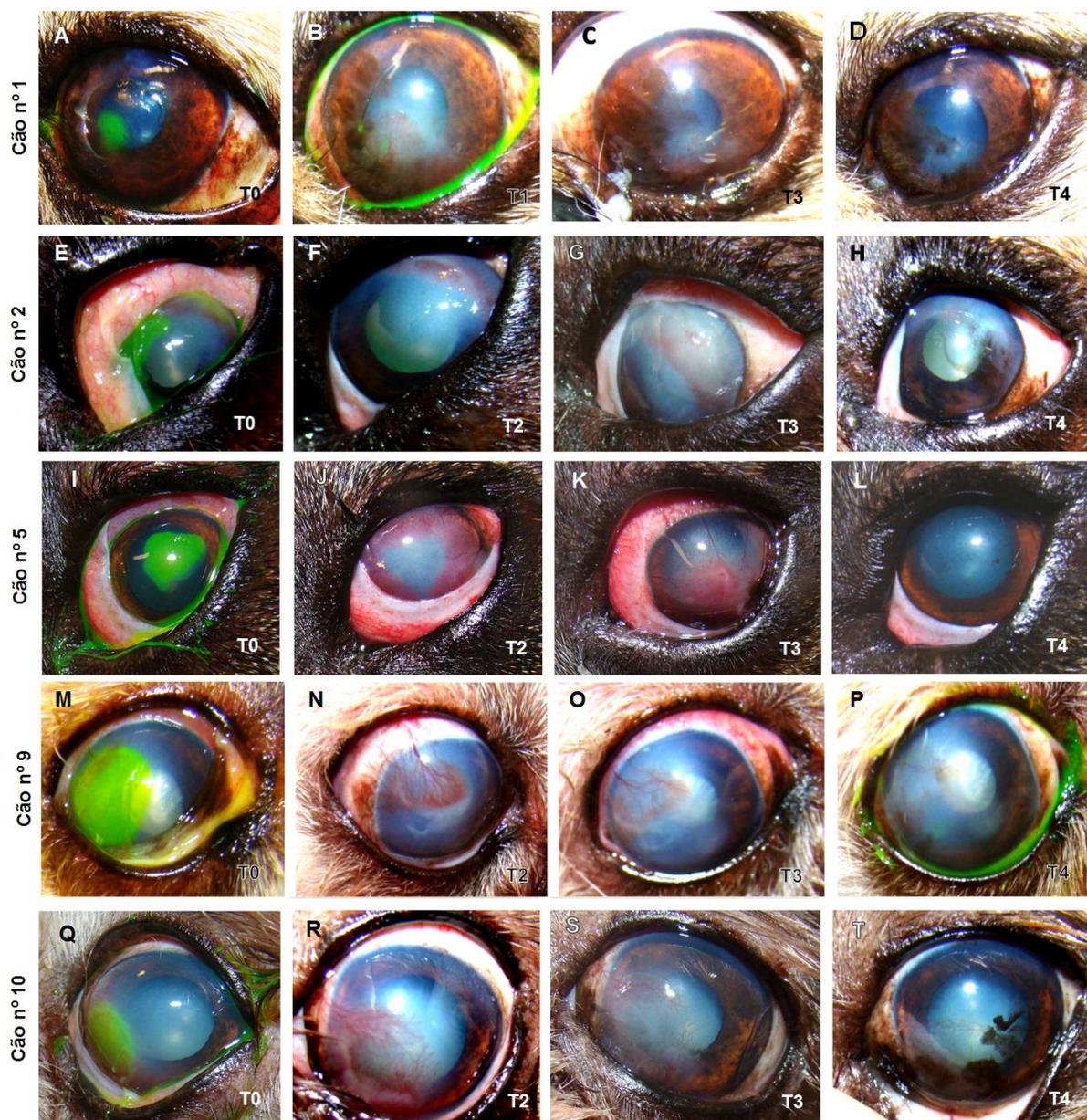
Anterior a aplicação tópica de  $1 \times 10^6$  MSCs por cinco dias consecutivos (T0), todos os cães apresentavam opacidade de córnea ( $\bar{x}=1,2$ ) (10/10; 100% dos casos), enquanto que a congestão conjuntival ( $\bar{x}=0,9$ ) e descarga conjuntival ( $\bar{x}=0,6$ ) estavam presentes em 6/10 (50%) casos, a vascularização corneana ( $\bar{x}=0,9$ ) em 9/10 (90%) casos e pigmentação corneana ( $\bar{x}=0,2$ ) em 2/10 (20%) casos. Estes sinais estavam presentes em diferentes pontuações (Figura 2A, E, I, M, Q e Apêndice 3).

Após a terapia celular, foram observadas melhoras nos olhos dos cães como a redução significativa da congestão conjuntival ( $p=0,001$ ) e descarga conjuntival ( $p=0,019$ ) (Figura 2E-H, I-L, M-P e Gráficos 9 e 10). A análise estatística não revelou diferença significativa na severidade da opacidade de córnea ( $p=0,216$ ) e a aferição da superfície ocular ( $p=0,248$ ) (Figura 2E-H, M-P e Gráficos 11 e 12).

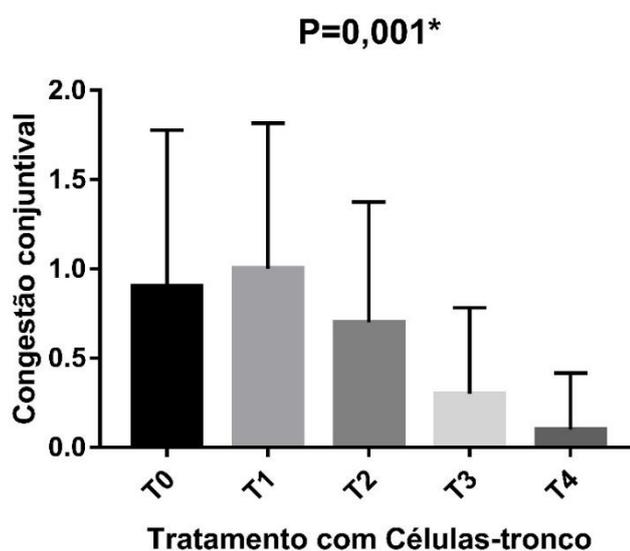
Na comparação entre os critérios clínicos avaliados e os tempos de monitorização (T0 a T4), as diferenças significativas foram na congestão conjuntival de T0 ( $\bar{x}=0,9$ ) para T4 ( $\bar{x}=0,1$ ) e na descarga conjuntival de T0 ( $\bar{x}=0,6$ ) para T4 ( $\bar{x}=0,1$ ).

Um aumento significativo da vascularização corneana ( $p=0,001$ ) foi observado de T0 ( $\bar{x}=0,9$ ) para T2 ( $\bar{x}=1,9$ ), com posterior redução durante as

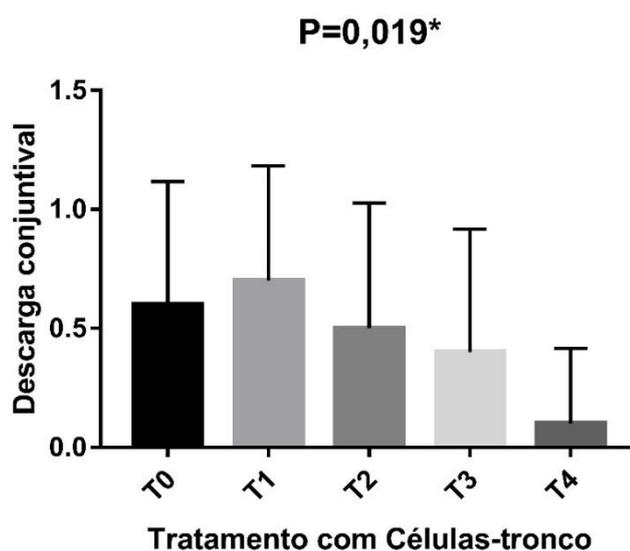
reavaliações, mas sem diferença estatística (Figura 2 I-K, M-O, Q-S e Gráfico 13) e também um aumento significativo da pigmentação corneana ( $p=0,017$ ) de T0 ( $\bar{x}=0,2$ ) para T3 ( $\bar{x}=0,6$ ) e T4 ( $\bar{x}=0,6$ ) (Figura 2D, H, T e Gráfico 14). Houve melhora no blefaroespasma ao longo do tempo, com significativa diferença de T0 ( $\bar{x}=0,9$ ) para T4 ( $\bar{x}=0,1$ ) (Gráfico 15).



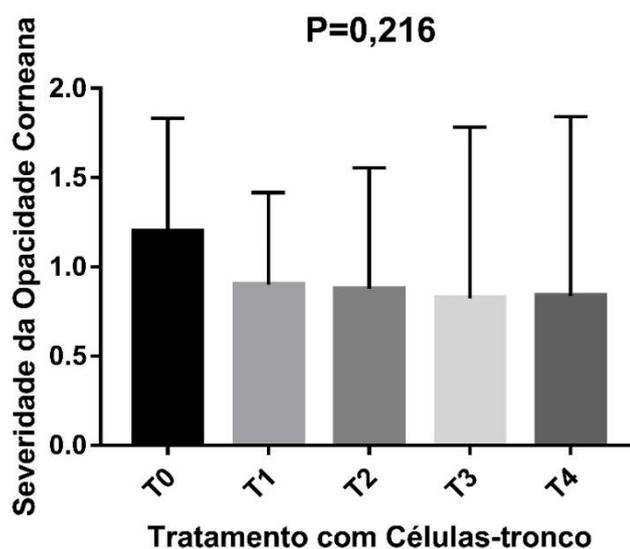
**Figura 2.** Representação da avaliação macroscópica do processo de cicatrização da córnea após MSCs. As imagens demonstram os sinais clínicos antes da terapia celular (T0) (A, E, I, M, Q) e após a aplicação tópica de MSCs (B, C, D, F, G, H, J, K, L, N, O, P, R, S, T), em diferentes tempos de avaliação (T1-T4).



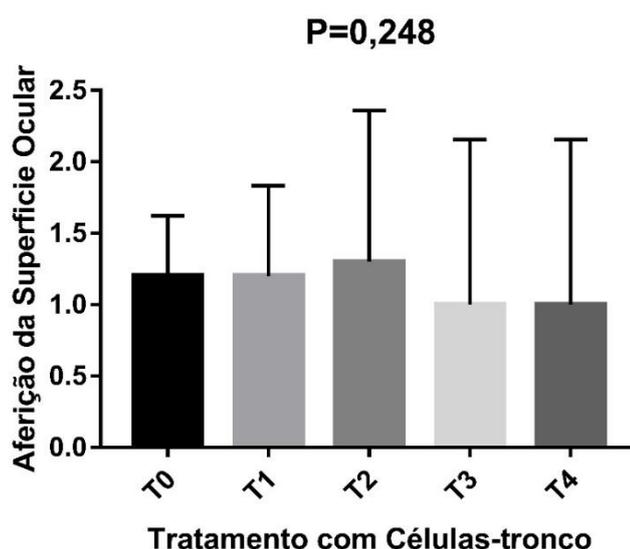
**Gráfico 9.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para congestão conjuntival avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



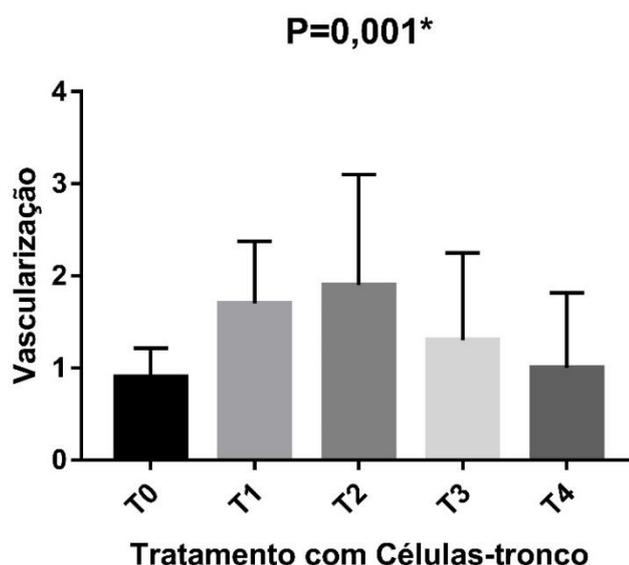
**Gráfico 10.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para descarga conjuntival avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,019^*$ ), por tempo (T0 para T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



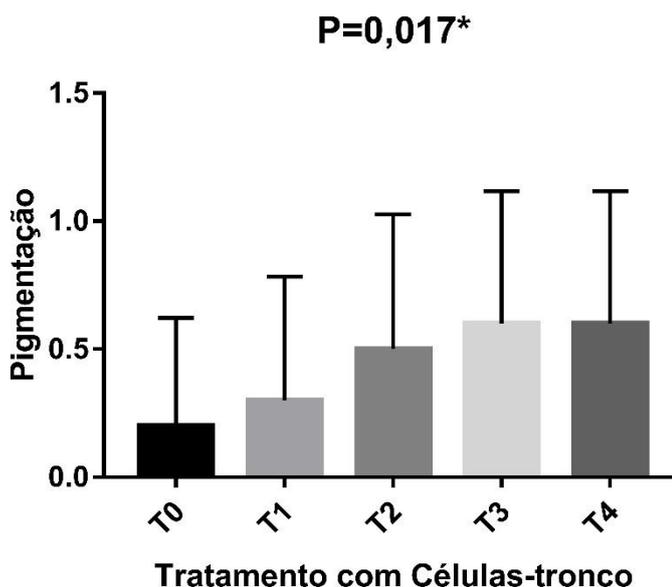
**Gráfico 11.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para severidade da opacidade corneana avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,216$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



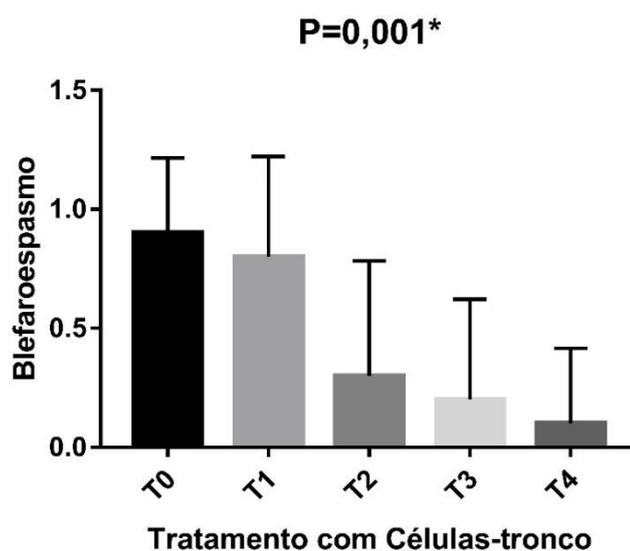
**Gráfico 12.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para aferição da superfície ocular avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,248$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 13.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para vascularização corneana avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T2,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



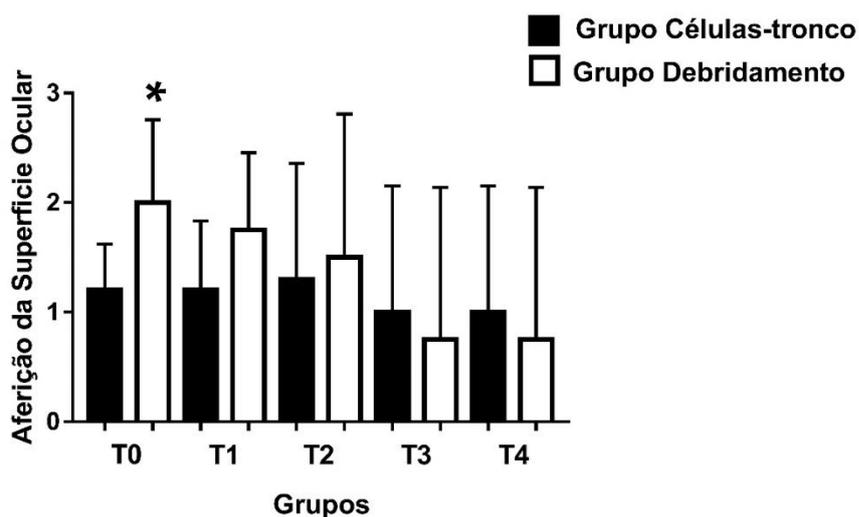
**Gráfico 14.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para pigmentação corneana avaliada nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,017^*$ ), por tempo (T0 para T3 e T4), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



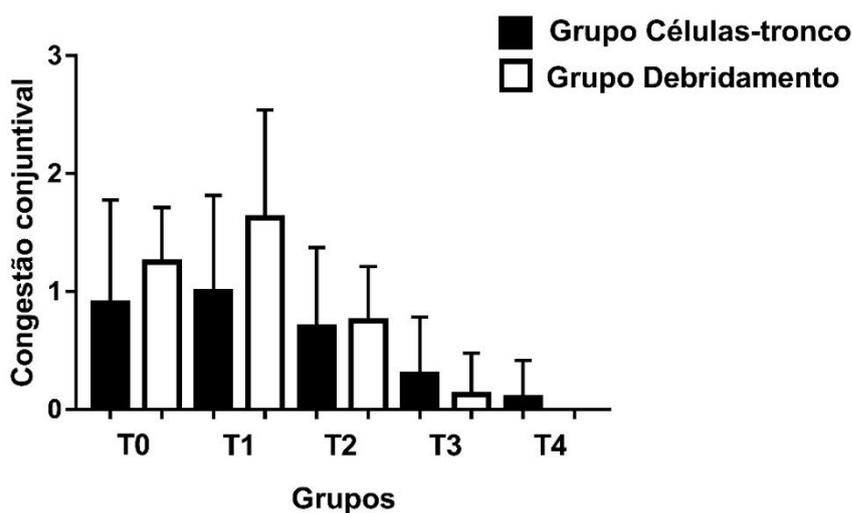
**Gráfico 15.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para blefaroespasm avaliado nos cães do Grupo Células-tronco ( $p=0,001^*$ ), por tempo (T0 para T2, T3 e T4,  $p<0,05$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.

#### 5.4 Análise comparativa da superfície ocular entre os tempos e grupos

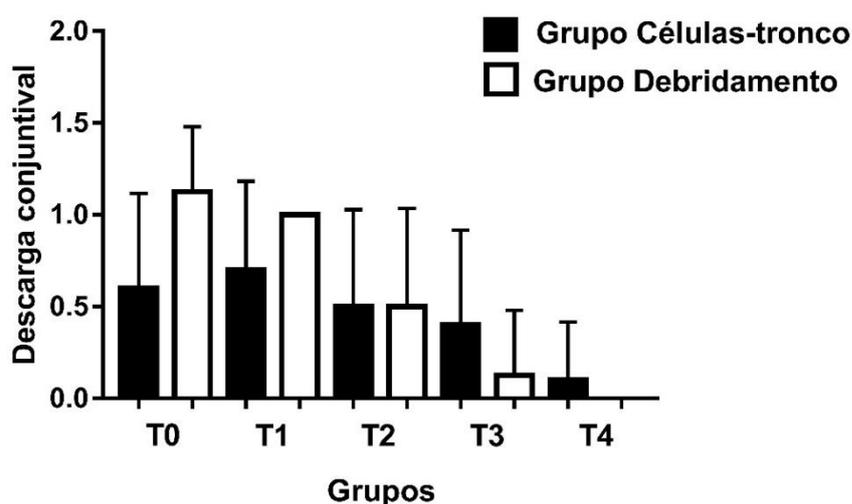
Na comparação dos critérios de avaliação da superfície ocular entre os grupos, nos diferentes tempos (T0, T1, T2, T3 e T4), apenas foi encontrada diferença estatística para a aferição da superfície ocular em T0 ( $p=0,034$ ), enquanto que em T1 ( $p=0,173$ ), T2 ( $p=0,762$ ), T3 ( $p=0,360$ ) e T4 ( $p=0,360$ ) não houve diferença significativa (Gráfico 16). Para os demais critérios (congestão conjuntival, descarga conjuntival, severidade da opacidade corneana, vascularização, pigmentação e blefaroespasm) não houve diferença significativa entre os grupos, nos diferentes tempos avaliados (Gráficos 17,18,19, 20,21 e 22).



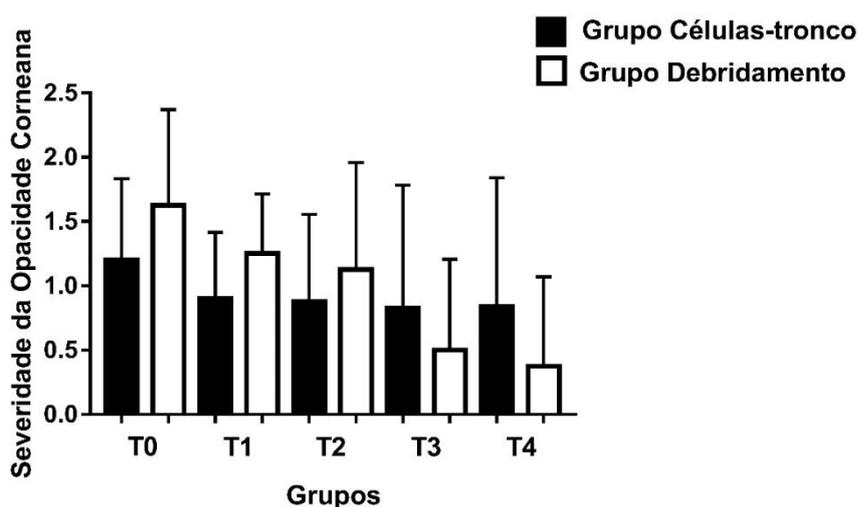
**Gráfico 16.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para aferição da superfície ocular avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento (T0,  $p=0,034^*$ ), por tempo, tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



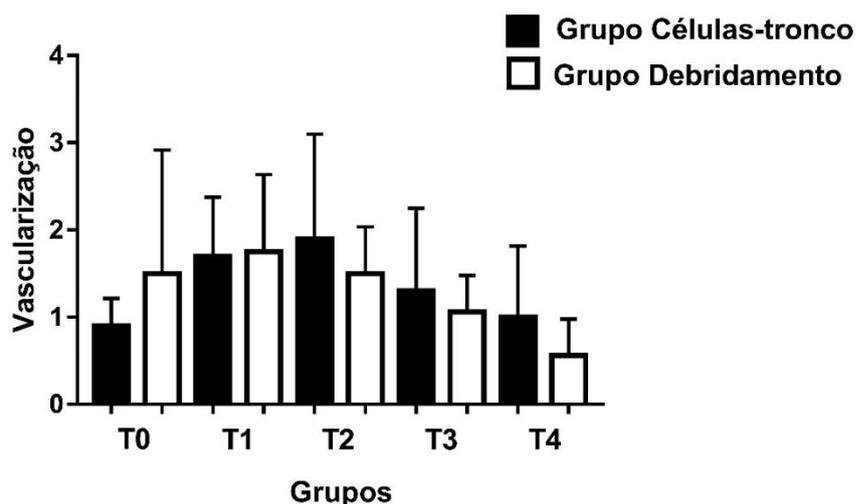
**Gráfico 17.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para congestão conjuntival avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0,  $p=0,408$ ; T1,  $p=0,237$ ; T2,  $p=0,829$ ; T3,  $p=0,573$ ; T4,  $p=0,762$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



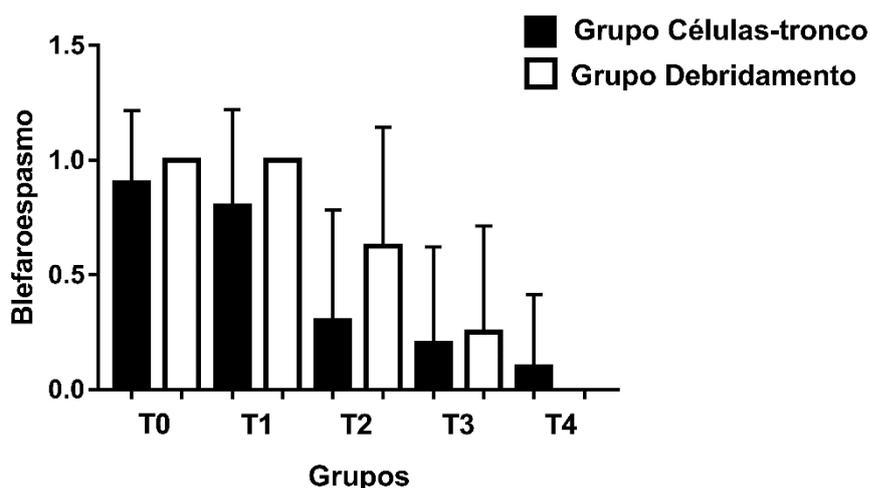
**Gráfico 18.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para descarga conjuntival avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0,  $p=0,101$ ; T1,  $p=0,315$ ; T2,  $p=1$ ; T3,  $p=0,360$ ; T4,  $p=0,762$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



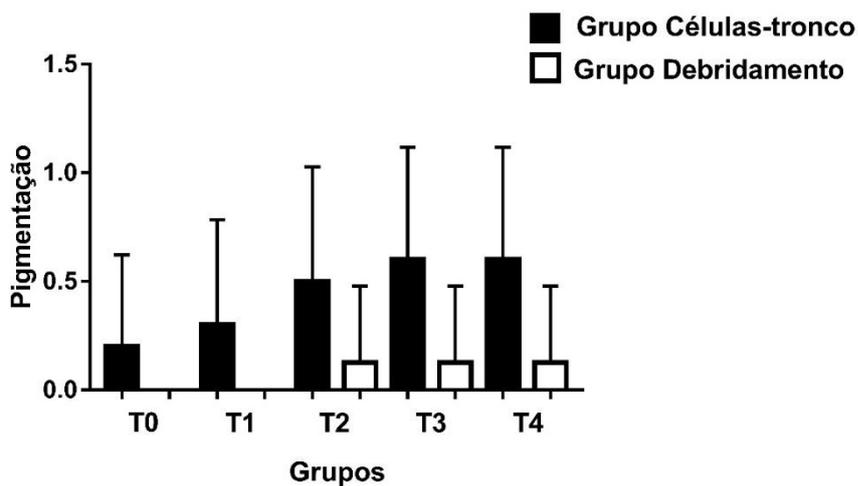
**Gráfico 19.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado de *Hackett-McDonald* para severidade da opacidade corneana avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0,  $p=0,203$ ; T1,  $p=0,203$ ; T2,  $p=0,762$ ; T3,  $p=0,460$ ; T4,  $p=0,274$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 20.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para vascularização corneana avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0,  $p=0,573$ ; T1,  $p=0,897$ ; T2,  $p=0,315$ ; T3,  $p=0,573$ ; T4,  $p=0,173$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 21.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular para blefaroespasmos avaliado nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0,  $p=0,762$ ; T1,  $p=0,515$ ; T2,  $p=0,274$ ; T3,  $p=0,897$ ; T4,  $p=0,762$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.



**Gráfico 22.** Histograma dos valores médio e desvios-padrão do sistema de pontuação ocular adaptado para pigmentação corneana avaliada nos cães e comparação dos Grupos Células-tronco e Debridamento, por tempo (T0,  $p=0,515$ ; T1,  $p=0,315$ ; T2,  $p=0,203$ ; T3,  $p=0,101$ ; T4,  $p=0,101$ ), tratados no serviço particular de oftalmologia veterinária, Campinas, São Paulo, Brasil.

## 6. DISCUSSÃO

Com relação aos animais incluídos no estudo, todos apresentaram o SCCED diagnosticado por meio do teste de fluoresceína e o sinal clínico característico da lesão, que consiste em uma erosão epitelial superficial, não infectada, com presença de epitélio solto em suas bordas e fluoresceína impregnada sob o epitélio, formando um anel ao redor do estroma exposto<sup>3</sup>. Ainda assim, os cães que participaram da pesquisa eram de raças e faixa etária reportadas em outros estudos, dentro do perfil epidemiológico da doença<sup>48,49,50,105,106</sup>.

Este estudo representa a primeira oportunidade de aplicação alogênica de MSCs derivadas de tecido adiposo para o tratamento de SCCED. Nós avaliamos os efeitos terapêuticos da aplicação tópica de MSCs alogênicas, derivadas de tecido adiposo, em cães portadores de SCCED, usando a administração de  $1 \times 10^6$  células por 5 dias consecutivos. Além disso, comparamos os resultados clínicos com o tratamento por debridamento com *diamond burr*, já descrito em literatura científica e empregado na rotina clínica oftalmológica<sup>3,7,33,35,47-50,105,106</sup>.

Esse tipo de terapia celular em doenças oftálmicas está descrito em literatura científica e é bem tolerada por cães, gatos, ratos e coelhos<sup>19,73,76,78,79,80,81,85</sup>. Há, ainda, relato de caso e estudo clínico com sucesso no tratamento da superfície ocular de humanos afetados por defeito epitelial persistente e deficiência de células-tronco limbares<sup>86,87</sup>.

Durante o acompanhamento clínico dos casos, após a aplicação tópica de MSCs, não foi observada nenhum tipo de reação adversa, como desconforto na aplicação, irritação ocular, incidência de tumores ou algum tipo de rejeição tecidual. O uso de MSCs alogênicas em pacientes pode ser uma alternativa possível devido à baixa imunogenicidade na expressão do MHC-II<sup>88</sup>, demonstrando ser um procedimento seguro, conforme relato de estudos anteriores, não sendo necessário o uso de imunossuppressores<sup>89-92</sup>.

Em nosso estudo foi realizada a intervenção com o uso da ciclosporina 0,5% para dois casos, um no Grupo Debridamento e outro no Grupo Células-tronco, após 28 dias do tratamento inicial, pois os mesmos apresentaram intenso tecido de granulação. O tecido de granulação é decorrente da cicatrização vascularizada da córnea, onde há intenso infiltrado celular<sup>93</sup>. Histologicamente, este tecido é caracterizado pelas proliferações de pequenos vasos sanguíneos neoformados e de fibroblastos<sup>94</sup>. Essa angiogênese e a proliferação de fibroblastos é induzida por

fatores de crescimento (FGF beta, VEGF, PDGF, TGF) derivados, principalmente, de fibroblastos e macrófagos do processo inflamatório<sup>95</sup>. Como um imunossupressor, a ciclosporina age especificamente sobre linfócitos, mas também pode atuar sobre o processo inflamatório inibindo a ação dos macrófagos e melhorando, conseqüentemente, a granulação.

A pigmentação da córnea também foi encontrada em ambos os grupos, mas com aumento significativo para o grupo tratado com MSCs. A pigmentação corneana está descrita como um fator também decorrente da cicatrização, assim como o tecido de granulação. Trata-se de uma resposta inespecífica, decorrente da estimulação de melanoblastos límbicos que migram para o estroma durante a inflamação<sup>93</sup>. Apesar de estudos com cães portadores de olho seco tratados topicamente com MSCs mostrarem redução da pigmentação de córnea<sup>80</sup>, este fato não pode ser observado no nosso estudo. Estudos *in vitro*, com culturas celulares de queratinócitos, melanócitos e fibroblastos humanos, que receberam tratamento com fração extracelular aspirado de tecido adiposo, apresentaram aumento da taxa de proliferação celular em comparação com as células não tratadas no grupo controle. O efeito mitogênico foi menor para queratinócitos, quando comparado com as culturas de melanócitos e fibroblastos<sup>96</sup>.

Reações adversas estão relatadas e continuam sendo uma controvérsia, no que diz respeito à aplicação intravenosa de MSCs e a possibilidade de desenvolver alterações pulmonares, por exemplo<sup>92,97,98</sup>. A incidência de efeitos adversos, como o tromboembolismo pulmonar, tem sido relatada em cães após a injeção intravenosa de MSCs. Há relato de um acréscimo na contagem de linfócitos após infusão intravenosa de  $2 \times 10^6$  células, mudanças no parênquima pulmonar com três aplicações consecutivas de  $2 \times 10^6$  células, vômito aguda cinco a 10 minutos após a injeção de MSCs alogênicas, assim como aumento de frequência respiratória sete dias pós-transplantação, sendo que o exame histopatológico do caso revelou hemorragia pulmonar, edema e inflamação<sup>99</sup>. Por essas razões, optamos pelo uso de baixa dose na terapia celular, com  $1 \times 10^6$  células, assim como a aplicação tópica.

Outras vias de aplicação estão descritas na terapia com MSCs, como a injeção intra-estromal, subconjuntival e intra-lesional<sup>73</sup>, contudo a aplicação tópica mostra vantagem pela facilidade de administração da terapia celular na rotina clínica. Além disso, estudos mais recentes descreveram os benefícios da aplicação tópica sucessiva em tratamento do olho seco em cães<sup>80</sup>, enfatizando que o uso dessa via

está baseado nos princípios da absorção pela conjuntiva e, secundariamente, por outras estruturas (córnea, câmara anterior e íris) <sup>100,101</sup>. A eficiência da via tópica na terapia celular é muitas vezes questionada, principalmente com relação a fixação ou manutenção das MSCs no leito da lesão. Em um estudo mais recente, utilizando diferentes rotas de administração de MSCs ( $0,5 \times 10^6$  células) derivadas de medula óssea, os autores aplicaram essas células marcadas em lesões experimentais em camundongos e visualizaram as mesmas na córnea e conjuntiva quatro dias após a injúria, por meio de imagens de imunohistoquímica. Contudo, a frequência das MSCs marcadas nesses tecidos foi maior quando aplicada pela via subconjuntival e intravenosa, seguida da via tópica e intraperitoneal<sup>102</sup>.

Outro fato importante, com relação a administração da terapia celular por via tópica, é que em nosso estudo não foi necessária anestesia geral ou tópica para aplicação das MSCs, apenas para os animais tratados com debridamento com *diamond burr* a anestesia geral foi adotada como protocolo da pesquisa. Outras técnicas cirúrgicas, como a ceratotomia punctata, ceratotomia em grade, ceratectomia superficial também necessitam de algum tipo de anestesia<sup>33,48,50,103,104</sup>. É importante ressaltar que a anestesia geral envolve um maior risco ao paciente, principalmente, para os que apresentam condição clínica grave.

Uma meta-análise do SCCED em cães revelou taxa de sucesso na cicatrização da córnea de 50% após um simples debridamento, seguida da ceratotomia punctata ou ceratotomia em grade que proporcionou um aumento da taxa de cicatrização para 80% e a ceratectomia superficial que teve maior taxa de sucesso, próximo de 100%<sup>33</sup>. Outro estudo descreveu que a cicatrização da córnea apresentou taxa de sucesso de 92,5% após um único tratamento cirúrgico, que consistiu na combinação de debridamento com *diamond burr* e uso de lente de contato terapêutica<sup>50</sup>. Um estudo retrospectivo mais recente com 194 cães portadores do SCCED demonstrou que o debridamento com *diamond burr* possibilitou a cicatrização da córnea em 77,4% dos casos (82 de 106 olhos), da mesma forma, ao utilizar o debridamento associado a ceratotomia em grade, os autores observaram que a taxa de sucesso foi de 77,3% (68 de 88 olhos)<sup>105</sup>. O nosso estudo revelou uma taxa de cicatrização da córnea de 90% para os cães tratados com MSCs e 87,5% no debridamento com *diamond burr*, de acordo com os intervalos descritos na literatura mencionada.

O resultado deste estudo demonstra que a aplicação tópica de MSCs é um tratamento efetivo para cães com SCCED, assim como o debridamento com *diamond*

*burr*. Afinal, tanto a terapia celular como o procedimento cirúrgico, tiveram taxas favoráveis de cicatrização da córnea com tempo médio de 23,1 ( $\pm 9,9$ ) dias e 21 ( $\pm 9,8$ ) dias, respectivamente, sem diferença significativa entre os grupos. Algumas pesquisas revelam menor tempo médio de cicatrização ao observado [13,3 ( $\pm 4,9$ ) dias<sup>105</sup> e 14 ( $\pm 5,9$ ) dias<sup>106</sup>], apesar de se mostrar variável, dependendo da técnica empregada para o tratamento do SCCED em cães. Há relatos de tempo de cicatrização variando de 4 a 40 dias após o debridamento ou ceratectomia superficial com *diamond burr*<sup>105-107</sup> e quando associado ao de uso de lente de contato entre 7 a 35,5 dias<sup>50,108,109</sup>. A maioria dos trabalhos, que estão relacionados ao emprego das técnicas cirúrgicas, leva em considerações o acompanhamento dos casos por meio de avaliações clínicas periódicas, por essa razão o período de cicatrização se mostrar variado. Além disso, pode haver a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, em torno de 22,6%<sup>105</sup> a 25%<sup>107</sup> dos casos relatados.

Especificamente, com relação ao tempo médio de cicatrização da córnea após o tratamento com MSCs, vale ressaltar que a terapia celular tem seus benefícios comprovados também na reconstituição da superfície ocular de queimaduras por álcalis. A reepitelização da córnea se mostra significativamente melhor em ratos que receberam membrana amniótica com MSCs derivada de medula óssea, ao longo de 30 dias do experimento, quando comparado com o grupo controle<sup>110</sup>. As MSCs derivadas de tecido adiposo também foram empregadas nas lesões de córnea por álcalis em coelhos<sup>76</sup> e camundongos<sup>111</sup>, assim como em lesões promovidas por laser em camundongos<sup>112</sup>. As lesões por álcalis em coelhos que receberam a aplicação (intra-estromal, subconjuntival e tópica associadas) de  $2 \times 10^6$  MSCs alogênicas mostraram diferença significativa nos graus de reepitelização da córnea ao longo de 28 dias, quando comparado com o grupo controle. Ao final de 28 dias, a maioria dos animais (10/15) já apresentavam ausência de defeito epitelial, porém o grupo controle apresentavam ainda algum grau de lesão<sup>76</sup>. Já em camundongos, as MSCs derivadas de tecido adiposo humano quando aplicada de forma tópica ( $2 \times 10^5$  células, 2 vezes ao dia) promoveram reepitelização significativa de áreas da córnea a partir do segundo dia de tratamento, quando comparado com o grupo controle<sup>111</sup>. As lesões de córnea promovidas por laser em camundongos e tratadas topicamente com MSCs derivadas de tecido adiposo humano, na frequência de 3 vezes ao dia por 5 dias consecutivos, revelaram no primeiro dia área de fluoresceína significativamente menor quando comparada ao grupo controle. Diferenças significativas individuais entre os

olhos dos animais (olho tratado e olho controle) foram observadas, com cicatrização mais rápida para os olhos que receberam as MSCs<sup>112</sup>.

Nós mostramos que melhorias clínicas ocorreram após a aplicação tópica de baixas doses de MSCs ( $1 \times 10^6$ ) por cinco dias consecutivos em cães com SCCED, assim como o tratamento por meio do debridamento com *diamond burr*. Os critérios ou sinais clínicos avaliados após os tratamentos não apresentaram diferença significativa ao se comparar os grupos, nos diferentes tempos. Apenas o critério aferição da superfície ocular apresentou diferença significativa em T0, que corresponde a avaliação inicial. O SCCED apresenta como principal característica clínica o epitélio não aderido ao estroma adjacente, o que pode predispor a tamanhos variados da lesão nesta avaliação inicial. Sabemos que o defeito epitelial, geralmente, está localizado em córnea axial ou paraxial, contudo pode estar distribuído em qualquer porção<sup>33</sup>. A avaliação dos critérios ou sinais clínicos, em ambos os tratamentos, demonstrou redução significativa da congestão conjuntival, descarga conjuntival e blefaroespasmos, assim como um aumento significativo da vascularização (T0 para T2), colaborando para a cicatrização da córnea. A presença desses sinais clínicos corrobora com o que está descrito na literatura científica, como sendo os mais comuns nos olhos de cães com SCCED e tratados com debridamento com *diamond burr* em associação de lente de contato, sendo eles: blefaroespasmos (72%), seguido de hiperemia conjuntival (68%), vascularização corneal (30%), edema de córnea (24%) e epífora (23%)<sup>50</sup>.

A melhora dos sinais clínicos pode ser atribuída às técnicas empregadas, pois os animais apresentaram tratamento clínico prévio, sem cicatrização das lesões. No caso dos cães tratados com o debridamento com *diamond burr*, o exato mecanismo que influencia a cicatrização do defeito epitelial ainda é desconhecido. Alguns autores sugerem que micro-erosões causadas pelo debridamento na membrana basal pode afetar o restabelecimento das junções de adesão das novas células epiteliais, assim como, outra teoria vinculada a prática do debridamento promoveria a indução e expressão de proteínas pela matriz extracelular, que pode contribuir para fibrose e melhora da adesão epitelial ou que a exposição da membrana basal periférica a erosão influencia positivamente a adesão epitelial<sup>49</sup>. As córneas de cães com SCCED analisadas por técnicas morfológicas, quando comparadas com córneas de cães sadios que tiveram defeitos epiteliais promovidos experimentalmente, mostram com exclusividade, em 92% dos casos, a presença de

uma membrana ou lâmina superficial estromal hialinizada<sup>113</sup>, que pode ser uma barreira para a reconstrução de complexos de adesão das células epiteliais<sup>33</sup>.

O potencial terapêutico das MSCs para o tratamento da superfície ocular tem sido descrito por alguns autores, com uma variedade de mecanismos propostos, especialmente, por meio da atuação parácrina. Sabe-se que as MSCs são capazes de produzir uma série de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que são importantes para a cicatrização da córnea. Amostras de MSCs derivadas da medula óssea de ratos avaliadas *in vitro* por meio de testes imunoenzimáticos detectaram altos níveis de VEGF e TGF- $\beta$ 1, quando comparados com o PDGF e HGF, todos envolvidos na regulação da cicatrização de feridas da córnea. Entre as citocinas inflamatórias e quimiocinas, a MCP-1, IL-8 e IL-6 foram detectadas em níveis moderados. Essas MSCs aplicadas topicamente nas lesões experimentais em camundongos, na frequência de seis vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos, foram responsáveis por melhor regeneração epitelial, quando avaliadas por fluoresceína e comparadas com o grupo controle. Da mesma forma, os exames histopatológicos da córnea revelaram completa regeneração da lesão<sup>85</sup>. Já no tratamento tópico de ceratoconjuntivite seca de cães, as MSCs derivadas de tecido adiposo foram responsáveis pela redução de marcadores inflamatórios, como CD4, IL-1 e IL6 e TNF- $\alpha$ , além de redução de polimorfonucleares, sendo constatada melhora clínica da córnea<sup>80</sup>.

Nas injúrias da córnea, os ceratócitos diferenciam-se em fibroblastos ativos e estes, por sua vez, podem assumir características de miofibroblastos, especialmente na presença de TGF- $\beta$ , produzidos por células epiteliais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, assim como na combinação com fator de crescimento de fibroblasto 2. Ao longo desta transição podem ser observadas alterações nos componentes da matriz extracelular com produção de altos níveis de colágeno, ácido hialurônico, fibronectina e biglicano, de forma, a favorecer a fibrose na córnea e perda de transparência<sup>114</sup>. Essas células inflamatórias podem ser encontradas no estroma adjacente de cães portadores de SCCED<sup>108</sup> e podem ser atraídas após o debridamento, visto que o procedimento promove uma inflamação local. Dessa forma, pode haver a produção de TGF- $\beta$  e favorecimento da fibrose da córnea e opacidade, conforme mecanismo descrito anteriormente. Contudo, no grupo tratado pelo debridamento com *diamond burr*, a severidade da opacidade corneana apresentou redução significativa (T0 para T4) ao longo das avaliações.

A severidade da opacidade corneana não mostrou diferença estatística significativa para o Grupo Células-tronco, ao longo do tempo de avaliação, apesar de ligeira melhora da transparência ser percebida clinicamente. A cultura de ceratócitos tratados com MSCs expressam níveis mais baixos de colágeno do tipo III e actina  $\alpha$ -2, que são considerados importantes marcadores fibróticos presentes na córnea<sup>115</sup>, sendo assim podem conferir menor grau de opacidade.

O estroma de córnea de camundongos que tiveram lesões experimentais promovidas por laser e tratados topicamente com MSCs, derivadas de tecido adiposo, tiveram baixa densidade de miofibroblastos quando comparadas com o grupo controle nos 3º e 7º dia. Apesar de não apresentar diferença significativa para os dados, houve relato de ligeira melhora na transparência<sup>112</sup>. Em lesões experimentais de queimadura por álcalis em coelhos, a opacidade de córnea se mostrou significativamente diferente entre o grupo tratado com MSCs e o grupo controle, entre o 7 e 28º dia, porém esses animais foram tratados por meio de injeção subconjuntival, intra-lesional e tópica<sup>76</sup>. Pode ser que a via de aplicação das MSCs possa influenciar o resultado final da opacidade corneana, apesar da terapia celular promover a cicatrização do SCCED em 90% dos casos. Lesões de córnea experimentais em camundongos tratados com MSCS ( $0,5 \times 10^6$  células), derivada de medula óssea, tiveram maior redução da opacidade quando tratados pela via subconjuntival e intravenoso, seguidos pela via intraperitoneal e tópica<sup>102</sup>.

Estudos *in vivo* mostraram que a aplicação de MSCs na córnea podem inibir a neovascularização relacionada à inflamação após lesões químicas<sup>73,76</sup> ou a inflamação na doença da córnea, como ceratite eosinofílica felina e olho seco em cães<sup>79-81</sup>. Esse fato parece estar relacionado ao aumento da expressão de trombospondina-1 e à redução do fator pró-angiogênico MMP-2<sup>116,117</sup>. Observamos que houve diferença significativa entre T0 e T2, no Grupo Células-tronco, caracterizado por um aumento da vascularização, seguido de sua redução. Pode haver fatores, como demonstrado em alguns estudos *in vitro*, que estimulam a angiogênese como uma combinação de VEGF, MCP-1 e IL-6<sup>114,118</sup>. Ainda vale ressaltar que os monócitos e macrófagos apresentam um importante papel na indução de neovascularização inflamatória por supressão ou amplificação de sinais químicos essenciais para a formação de vasos sanguíneos<sup>119</sup>.

Apesar do aumento significativo da pontuação para o critério vascularização (T0 para T2) para o Grupo células-tronco, a análise comparativa desse

critério com o Grupo Debridamento não revelou diferença estatística. É possível que a metodologia não permitiu quantificar a vascularização a ponto de notar diferença entre os dois tipos de tratamento, visto que córneas lesionadas tratadas com MSCs tem neovascularização atenuada quando comparada com córneas do grupo controle. Esse fato foi observado em estudo com coelhos que tiveram lesão corneana promovidas por queimadura química por álcali e a área de neovascularização determinada em termo de pixels na digitalização das imagens fotográficas<sup>76</sup>. Os autores ainda avaliaram a dosagem de VEGF na córnea desses animais, que revelaram redução em sua secreção, quando comparada com os grupos controles.

Em nosso estudo, a produção de lágrima apresentou diferença estatística significativa entre o pré e pós-procedimento, para ambos os grupos. Houve uma redução da produção de lágrima ao final das terapias, porém dentro do intervalo de valores normais de referência para a espécie (18,64mm a 23,9mm)<sup>120</sup>. Esse fato se deve, provavelmente, ao tratamento que levou a recuperação da superfície corneana e diminuição do reflexo de produção de lágrima, que se encontrava aumentado devido a estimulação das inervações superficiais na lesão de córnea. Com relação a PIO, não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes tempos avaliados, se mantendo dentro dos valores normais de referência para a espécie ( $19,2 \pm 5,9$  mmHg)<sup>120</sup>. As terapias não promoveram uveíte reflexa ou alterações na drenagem no humor aquoso, que pudessem justificar uma possível redução ou aumento da PIO.

A principal limitação deste estudo foi que não incluiu um terceiro grupo de animais não tratados ou tratados com placebo, além da não aleatorização entre os grupos de estudo e do tratamento padrão. Entretanto, o estudo avaliou a resposta clínica em cães tratados com MSCs em comparação com o debridamento por *diamond burr*, em um serviço especializado de oftalmologia. Embora o estudo não tenha sido realizado em um ambiente experimental controlado, relatamos a melhora clínica dos olhos de cães portadores de SCCED tratados com MSCs e com o debridamento, sugerindo que o protocolo da terapia celular será bem-sucedido em outros ambientes. Mais estudos são necessários para comparar a terapia cirúrgica e celular, além de buscar os níveis de fatores de crescimento citocinas e quimiocinas presentes nas lágrimas que evidenciam a ação das MSCs aplicadas por via tópica.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo sugerem que a aplicação tópica de células-tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo heterólogo, é uma terapia segura e efetiva, com potencial terapêutico para o SCCED em cães, pois não houve diferença significativa na comparação do tempo de cicatrização e dos critérios clínicos entre os grupos ao longo do período de avaliação. Ainda assim, a terapia celular foi considerada uma técnica simples, além de um tratamento não invasivo para este tipo de úlcera de córnea.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo de animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras.* 2014; 19(1):59-65.
2. Miller WW. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2001; 16(1):51-7.
3. Ledbetter EC, Gilger BC. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. 5 edith. Iowa: Willey-Blackwell; 2013. p.976-92.
4. Katzman LR, Jeng BH. Management strategies for persistent epithelial defects of the cornea. *Saudi J Ophthalmol.* 2014; 28:168-172.
5. Gilger, BC, Whitley, RD, McLaughlin, SA, Wright JC, Drane JW. Canine corneal hickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am J Vet Res.* 1991; 52:1570–72.
6. Schoster JV, Wickman, L, Stuhr C. The use of ultrasonic pachymetry and computer enhancement to illustrate the collective corneal thickness profiles of 25 cats. *Vet Ophthalmol.* 1995; 5:68–73.
7. Gelatt KN, Samuelson DA. Recurrent corneal erosions and epitelial dystrophy in the boxer dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1982; 18:453-460.
8. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon DR, Dowling JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *Am J Ophthalmol.* 1968; 65(3):339-48.
9. Nakamura M, Mishima H, Nishida T, Otori T. Binding of hyaluronan to plasma fibronectin increases the attachment of corneal epithelial cells to a fibronectin matrix. *J Cell Physiol.* 1994; 159(3):415-22.
10. Buck, R.C. Ultrastructural characteristics associated with the anchoring of corneal epithelium in several classes of vertebrates. *J Anat.* 1983; 137(Pt 4):743–56.
11. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. *Histology of the Human Eye*. Philadelphia: WB Saunders. 1971.

12. Shively JN, Epling GP. Fine structure of the canine eye: cornea. *Am J Vet Res.* 1970; 31(4):713-22.
13. Blumcke S, Morgenroth, K. The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea. *J Ultrastruct Res.* 1976; 18(5), 502–18.
14. Harding C, Bagchi M, Weinsieder A, Peters V. A comparative study of corneal epithelial cell surfaces utilizing the scanning electron microscope. *Invest Ophthalmol.* 1974; 13(12), 906–12.
15. Jester, J.V. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19(2):82–93. Epub 2007 Oct 2.
16. Hassell, JR, Birk, DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010; 91:326–35.
17. Takahashi, T, Cho, HI, Kublin, CL, Cintron, C. Keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans associate with type IV collagen in fetal rabbit cornea. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(10):1447–57.
18. Linsenmayer, TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler MI, et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1 (V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 1993;121(5):1181–9.
19. Zhan Q, Burrows R, Cintron C. Localization of type XII collagen in normal and healing rabbit cornea by in situ hybridization. *Exp Eye Res.* 1995;60(5):551–61.
20. Gordon MK, Foley JW, Birk DE, Fitch JM, Linsenmayer TF. Type V collagen and Bowman's membrane: Quantitation of mRNA in corneal epithelium and stroma. *J Biol Chem.* 1994;269(40): 2459–66.
21. Jakus, M.A. Studies on the cornea. II. the fine structure of Descemet's membrane. *J Biophys Biochem Cytol.* 1956;2(4):243–52.
22. Dua HS, Gomes JAP, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol.* 1994;78(5):401-8.

23. Anderson RA. Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(2):161-6.
24. Hanna C, O'Brien JE. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol.* 1960;64:536-9
25. Robb RM, Kuwabara T. Corneal wound healing, I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds. *Arch Ophthalmol.* 1962;68: 636-42.
26. Crosson CE, Klyce SD, Beuerman RW. Epithelial wound closure in the rabbit cornea: a biphasic process. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(4):464-73.
27. Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest.* 1981;45(2):120-9.
28. Lavker RM, Dong G, Cotsarelis G, Sun T-T. Limbal basal epithelial cells display characteristics consistent with stem cells from various stratifying epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(suppl):191.
29. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3(Pt2):141-57.
30. Hirst LW, Kenyon KR, Fogle JA, Hanninen L, Stark WJ. Comparative studies of cornea surface injury in the monkey and rabbit. *Arch Ophthalmol.* 1981; 99(6):1066-73.
31. Sivak, JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21(1):1–14.
32. Ollivier FJ, Gilger BC, Barrier KP, Kallberg ME, Plummer CE, O'Reilly S, et al. Proteinases of the cornea and preclear tear film. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(4):199–206.
33. Bentley E. Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: a review. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2005;41(3):158–65.

34. Barletta, J.P., Angella, G., Balch, K.C., Dimova HG, Stern GA, Moser MT, et al. Inhibition of pseudomonas ulceration in rabbit corneas by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(1), 20–8.
35. Moore, PA. Diagnosis and management of Chronic Corneal Epithelium Defects (Indolent Corneal Ulcerations). *Clin Tech Smal Anim Practic.* (2003); 18(3):168-77.
36. Bentley E, Abrams GA, Covitz D, Cook CS, Fischer CA, Hacker D. et al. Morphology and immunohistochemistry of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED) in dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2262-9.
37. Reidy JJ, Paulus MP, Gona S. Recurrent erosions of the cornea: epidemiology and treatment. *Cornea.* 2000; 19:767-71.
38. Aitken DA, Beirouty ZA, Lee WR. Ultrastructural study of the corneal epithelium in the recurrent erosion syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1995;79(3):282-9.
39. Kirschner SE, Niyo Y, Betts DM. Idiopathic persistent corneal erosions: clinical and pathological findings in 18 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1989; 25(1):84-90.
40. Murphy CJ, Marfurt CF, Mc Dermott AI, Ellison Bentley E, Abrams GA, Reid TW, et al. Spontaneous Chronic Corneal Epithelial Defects (SCCED) in Dogs: Clinical Features, Innervation, and Effects of Topical SP, with or without IGF-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2252-61.
41. Kirschner SE, Brazzell RK, Stern ME, Baird L. The use of topical epidermal growth factor for the treatment of nonhealing corneal erosions in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1991;27(4):449-52.
42. Bromberg NM. Cyanoacrylate tissue adhesive for treatment of refractory corneal ulceration. *Vet Ophthalmol.* 2002;5(1): 55–60.
43. Brooks DE, Ollivier FJ. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004; 4(3):611-22.

44. Regnier A., Cazalot G., Cantaloube B. Topical treatment of non-healing corneal epithelial ulcers in dogs with aminocaproic acid. *Vet Rec.* 2005;157(17):510-3
45. Chandler HL, Gemensky-Metzler AJ, Bras ID, Robbin-Webb TE, Saville WJA, Colitz CMH. In vivo effects of adjunctive tetracycline treatment on refractory corneal ulcers in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010; 237(4): 378-86.
46. Eaton JS, Hollingworth SR, Holberg BJ, Brown MH, Smith PJ, Maggs DJ, et al. Effects of topically applied heterologous serum on reepithelization rate of superficial chronic corneal epithelial defects in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2017; 250(9):1014-22.
47. Morgan RV, Abrams KL. A comparison of six different therapies for persistent corneal erosions in dogs and cats. *Vet Comp Ophthalmol.* 1994;4(1):38-43.
48. Stanley RG, Hardman C, Johnson BW. Results of grid keratotomy, superficial keratectomy and debridement for the management of persistent corneal erosions in 92 dogs. *Vet Ophthalmol.* 1998;1(4):233-8.
49. Garcia da Silva E, Powell CC, Gionfriddo JR, Ehrhart EJ, Hill AE. Histologic evaluation of the immediate effects of diamond burr debridement in experimental superficial corneal wounds in dogs. *Vet Ophthalmol.* 2011;14(5): 285–91.
50. Gosling AA, Labelle AL, Breaux CB. Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Vet Ophthalmol.* 2013;16(2):83–8.
51. Alvarado SA. Stem cells: time to check our premises. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(1):25-9.
52. Wagayama T. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(26):14984-9.
53. Li L, Xie T. Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605-31.
54. Heo J, Ahn EK, Jeong HG, Kim YH, Leem SH, Lee SJ, et al. Transcriptional characterization of Wnt pathway during sequential hepatic differentiation of

- human embryonic stem cells and adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(2):235-40.
55. Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011;27(2):243–61.
56. Webster RA, Blaber SP, Herbert BR, Wilkins MR, Vesey G. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *N Z Vet J.* 2012; 60(5):265-72.
57. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 105(4):1815-22.
58. Martinez AM, Goulart CO, Ramalho Bdos S, Oliveira JT, Almeida FM. Neurotrauma and mesenchymal stem cells treatment: From experimental studies to clinical trials. *World J Stem Cells.* 2014; 6(2):179-94.
59. Monteiro BG, Serafim RC, Melo GB, Silva MC, Lizier NF, Maranduba CM, et al. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell Prolif.* 2009;42(5):587-94.
60. Pelizzo G, Avanzini MA, Icaro Cornaglia A, Osti M, Romano P, Avolio L, et al. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *J Transl Med.* 2015;13:219.
61. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(5-6):419-27.
62. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cells-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005; 11(7-8):1198-211.
63. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2006;177(4):2080-7.
64. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation

- induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
65. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
66. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755-61.
67. Souza R, Napoli P, Han SW, Lima VC, Carvalho ACC. Células-Tronco Mesenquimais: Células Ideais para a Regeneração Cardíaca? *Rev Bras Cardiol Invasiva*. 2010;18(3):344-53.
68. Gonzalez G, Sasamoto Y, Ksander BR, Frank MH, Frank NY. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018; 7(2):e1-15.
69. Dravida S, Pal R, Khanna A, Tipnis AP, Ravindran G, Khan F. The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005;160(2):239-51.
70. Li, F.; Zhoa, S.Z. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J Stem Cells*. 2014;6(3):296-304.
71. Saghizadeh M, Kramerov AA, Svendsen CN, Ljubimov AV Concise Review: Stem Cells for Corneal Wound Healing. *Stem Cells*. 2017; 35(10):2105-2114.
72. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24(10):1442-3.
73. Zhang L, Coulson-Thomas VJ, Ferreira TG, Kao WWY. Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases *BMC Ophthalmol*. 2015,15(Suppl 1):155.
74. Gu S, Xing C, Han J, Tso MOM, Hong J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis*. 2009;15:99-107.

75. Yao L, Li Z-R, Su W-R, Li Y-P, Lin M-L, Zhang, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One*. 2012;7(2):e30842.
76. Almaliotis D, Koliakos G, Papakonstantinou E, Komnenou A, Thomas A, Petrakis S, et al. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(7):1121-35.
77. Jiang Z, Liu G, Meng F, Wang W, Hao P, Xiang Y, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol*. 2017; 101(11):1583–90.
78. Villatoro AJ, Fernandez V, Claros S, Rico-Llanos GA, Becerra J, Andrades JA. Use of Adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in canine models. 2015; 2015:527926. Epub Feb 23.
79. Bittencourt MK, Barros MA, Martins JF, Vasconcellos JP, Morais BP, Pompeia C, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Cell Med*. 2016;8(3):63–77.
80. Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, Sgrignoli DA, Nai GA, Silva MG, et al. Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2019;39:101525. Epub Jul 31.
81. Villatoro AJ, Claros S, Fernández V, Alcoholado C, Fariñas F, Moreno A, et al. Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. *BMC Vet Res*. 2018;14:116.
82. Munger RJ. Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies. *Vet Ophthalmol*. 2002;5(2):167–75.
83. Mambelli LI, Santos EJ, Frazão PJ, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa AL, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(1):87–94.
84. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

- International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006;8(4):315–7.
85. Jiang TD, Cai L, Ji W, Hui Y, Wang Y, Hu D, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis*. 2010;16:1304-16.
86. Ramírez BE, Sánchez A, Herreras JM, Fernández I, García-Sancho J, Nieto-Miguel T, et al. Stem Cell Therapy for Corneal Epithelium Regeneration following Good Manufacturing and Clinical Procedures. *BioMed Res Int*. 2015; 2015:408495.
87. Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, Komnenou A, Thomas A, Petrakis S, et al. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012;250(3):455–7.
88. Carrade DD, Borjesson DL. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med*. 2013;63(3):207–17.
89. Reinders ME, Dreyer GJ, Bank JR, Roelofs H, Heidt S, Roelen DL, et al. Safety of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stromal cell therapy in renal transplant recipients: The neptune study. *J Transl Med*. 2015;13:344.
90. Togel F, Cohen A, Zhang P, Yang Y, Hu Z, Westenfelder C. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Dev*. 2009;18(3):475–85.
91. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005,105(4):1815–22.
92. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res*. 2009;77(3):370–6.
93. Sllater D. *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Roca; 2005. Capítulo 11, Córnea e Esclera; p.283-338.

94. Vizioli MR. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. *Acta Anat (Basel)*. 1973;85:368-77.
95. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic bases of disease*. 6 edith. Philadelphia: W. B. Sauners Company; 1999. Champer 4, Tissue repair; p.98-112.
96. Bellei B, Migliano E, Tedesco M, Caputo S, Papaccio F, Lopez G, et al. Adipose tissue-derived extracellular fraction characterization: biological and clinical considerations in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1-18.
97. Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, Lee MC, Lee DS. Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med*. 2006;47(8):1295–301.
98. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. 2009;18(5):683–92.
99. Kang MH, Park HM. Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. *Acta Vet Scand*. 2014;56(1):16.
100. Järvinen K, Järvinen T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Deliv Ver*. 1995;16(1), 3-19.
101. Farkouh A, Frigo P, Czejka M. Systemic side effects of eye drops: a pharmacokinetic perspective. *Clin. Ophthalmol*. 2016;10:2433-41.
102. Shukla S, Mittal SK, Foulsham W, Elbasiony E, Singhania D, Shu SK, et al. Therapeutic efficacy of diferente routes of mesenchymal stem cell administration in corneal injury. *Ocul Surf*. 2019;17(4):729-36.
103. Peiffer RJ Jr, Gelatt KN, Gwin RM. Superficial keratectomy in the management of indolent ulcers of the boxer cornea. *Canine Pract*. 1976;Aug:31-33.

104. Soong HK, Farjo Q, Meyer RF, Sugar A. Diamond burr superficial keratectomy for recurrent corneal erosions. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(3):296–298.
105. Spertus CB, Brown JM, Giuliano EA. Diamond debridement vs. grid keratotomy in canine SCCED with scanning electron microscopy diamond burrtip analysis. *Vet Ophthalmol*. 2017; 20(6):505-13.
106. Wu D, Smith SM, Stine JM, Michau TM, Miller TR, Pederson SL, et al. Treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) with diamond burr debridement vs combination diamond burr debridement and superficial grid keratotomy. *Vet Ophthalmol*. 2018;21(6):622-31.
107. Hill, LE, Trbolová A. Treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement. *Folia Vet*. 2015;59(2):91-5.
108. Grinninger P, Verbruggent AMJ, Kraijer-Huver MG, Djajadiningrat-Laanen SC, Teske E, Boevé MH. Use Bandage contact lenses for treatment of spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs. *J Small Anim Pract*. 2015; 56:446-9.
109. Dees DD, Fritz KJ, Wagner L, Paglia D, Knollinger Am, Madsen R. Effect of bandage contact lens wear and postoperative medical therapies on corneal healing rate after diamond burr debridement in dogs. *Vet Ophthalmol*. 2016; 20(5):382-9.
110. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, HANG, Song E, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow–derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:315-21.
111. Yao L, Li ZR, Su WR, Li YP, Lin ML, Zhang WX, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS ONE*. 2012; 7(2):e30842.
112. Zeppieri M, Salvetat ML, Beltrami A, Cesselli D, Russo R, Alcalde I, et al. Adipose derived stem cells for corneal wound healing after laser induced corneal lesions in mice. *J Clin Med*. 2017;6(12):e115.

113. Bentley E, Campbell S, Woo HM, Murphy CJ. The effect of chronic corneal epithelial debridement on epithelial and stromal morphology in dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(7):2136-42.
114. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010;91(3):326-35.
115. Jiang Z, Liu G, Meng F, Wang W, Hao P, Xiang Y, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cell on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(11):1583-90.
116. Parys M, Kruger JM, Yuzbasiyan-Gurkan V. Evaluation of immunomodulatory properties of feline mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2017;26(10):776–85.
117. Kwon HM, Hur SM, Park KY, Kimb C, Kimc Y, Kimc H, et al. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vasc Pharmacol.* 2014;63(1):19–28.
118. Jiang Z, Liu G, Meng F, Wang W, Hao P, Xiang Y, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(11):1–8.
119. Cursiefen C, Chen L, Bogen LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski, C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 2004;113(4):1040-50.
120. Featherstone HJ, Heinrich CL. Ophthalmic Examination and Diagnostics. In: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology.* 5 edith. Iowa: Willey-Blackwell; 2013. p.533-

## 9. APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento para uso de animais em pesquisa

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES PORTADORES DO DEFEITO EPITELIAL CORNEANO CRÔNICO ESPONTÂNEO

Nome do(a) Pesquisador(a) Responsável / Professor(a) Responsável: Rodolfo Malagó e José Paulo de Cabral Vasconcellos

1. O Sr(Sra.) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu animal nesta pesquisa que tem como finalidade avaliar clinicamente a cicatrização da lesão de córnea em cães, após aplicação tópica de células-tronco ou debridamento cirúrgico
2. Identificação do animal: espécie canina, sexo \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, pelagem \_\_\_\_\_.
3. Ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o pesquisador aplique na superfície do olho as células-tronco processadas, uma vez ao dia, por cinco dias consecutivos / debridamento cirúrgico com uma broca diamantada sobre anestesia geral. O animal será acompanhado por um período de 28 dias, semanalmente, ou conforme necessidade. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa/aula através do telefone do(a) pesquisador. Se necessário, poderá entrar em contato com Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).
4. Sobre os dados necessários: serão coletadas lágrimas do seu animal para posterior processamento em laboratório por meio de um microtubo de vidro.
5. Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Em caso de complicações após o procedimento será realizada a intervenção necessária para garantir a saúde do seu animal. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008.
6. Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.
7. Benefícios: esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o uso desta terapia na oftalmologia, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa ser empregado como tratamento alternativo ao debridamento cirúrgico, sendo que o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.
8. Pagamento: o Sr.(Sra.) não terá custo para a terapia com células-tronco, apenas para a realização dos exames complementares / o Sr.(Sra.) terá o custo da anestesia geral e exames complementares para realização do debridamento cirúrgico.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa/aula. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa/aula.

Nome do Proprietário: \_\_\_\_\_

CPF/RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### TELEFONES

Pesquisador: Rodolfo Malagó (35) 98802.1357

Orientador: José Paulo de Cabral Vasconcellos

## APÊNDICE 2 – Sistema de pontuação ocular do Grupo Debridamento

**Tabela 1.** Evolução do sistema de pontuação ocular realizado nos cães da pesquisa do Grupo Debridamento.

Cão	tempo	Congestão conjuntival	Descarga conjuntival	Severidade da opacidade corneana	Aferição da superfície ocular	Vascularização	Blefaroespasma	Pigmentação
1	T0	+2	+1	+2	+3	+2	+1	0
	T1	+1	+1	+1	+2	+1	+1	0
	T2	0	0	+1	+1	+1	0	0
	T3	0	0	0	0	+1	0	0
	T4	0	0	0	0	+0,5*	0	0
2	T0	+1	+1	+1	+2	0	+1	0
	T1	+1	+1	+2	+3	+1	+1	0
	T2	+1	+1	+3	+4	+2	+1	+1
	T3	+1	+1	+2	+4	+2	+1	+1
	T4	0	0	+2	+4	+1	0	+1
3	T0	+1	+1	+1	+2	0	+1	0
	T1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0
	T2	0	0	0	0	+1	0	0
	T3	0	0	0	0	+0,5*	0	0
	T4	0	0	0	0	+0,5*	0	0
4	T0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0
	T1	+2	+1	+1	+2	+2	+1	0
	T2	+1	+1	+1	+2	+2	+1	0
	T3	0	0	+0,5*	+1	+1	0	0
	T4	0	0	+0,5*	+1	+0,5*	0	0
5	T0	+1	+1	+2	+3	+3	+1	0
	T1	+3	+1	+1	+2	+3	+1	0
	T2	+1	+1	+1	+2	+2	+1	0
	T3	0	0	+0,5	0	+1	0	0
	T4	0	0	0	0	0	0	0
6	T0	+1	+1	+2	+2	+3	+1	0
	T1	+3	+1	+1	+2	+3	+1	0
	T2	+1	0	+1	+2	+2	0	0
	T3	0	0	0	0	+1	0	0
	T4	0	0	0	0	0	0	0
7	T0	+2	+2	+3	+2	+3	+1	0
	T1	+1	+1	+2	+1	+2	+1	0
	T2	+1	+1	+1	+1	+1	0	0
	T3	0	0	+1	+1	+1	0	0
	T4	0	0	+0,5*	+1	+1	0	0
8	T0	+1	+1	+1	+1	0	+1	0
	T1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0
	T2	+1	0	+1	+1	+1	+1	0
	T3	0	0	0	0	+1	+1	0
	T4	0	0	0	0	+1	0	0

\*Adaptação da escala de pontuação ocular. Houve mudança clínica, mas não se enquadraram no critério de classificação definida pelo autor ou da pesquisa.

### APÊNDICE 3 – Sistema de pontuação acular do Grupo Células-tronco

**Tabela 2.** Evolução do sistema de pontuação ocular realizado nos cães da pesquisa do Grupo Células-tronco.

Cão	tempo	Congestão conjuntival	Descarga conjuntival	Severidade da opacidade corneana	Aferição da superfície ocular	Vascularização	Blefaroespasma	Pigmentação
1	T0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	T1	0	+1	0,5*	+1	+2	+1	+1
	T2	0	+1	+0,25*	+1	+2	0	+1
	T3	0	+1	+0,25*	+1	+1	0	+1
	T4	0	0	+0,125*	+1	+1	0	+1
2	T0	0	+1	+1	+2	+1	+1	0
	T1	+1	+1	+1	+2	+2	+1	0
	T2	+1	+1	+1	+3	+3	+1	0
	T3	+1	+1	+0,50*	+1	+2	0	0
	T4	0	0	+0,25*	+1	+1	0	0
3	T0	0	0	+1	+1	+1	+1	0
	T1	+1	+1	+1	+1	+2	+1	0
	T2	+1	+1	+1,5*	+2	+3	0	+1
	T3	0	+1	+1,5*	+1	+2	0	+1
	T4	0	0	+1,5*	+1	+1	0	+1
4	T0	0	0	+1	+1	0	+1	0
	T1	0	0	0	0	0	0	0
	T2	0	0	0	0	0	0	0
	T3	0	0	0	0	0	0	0
	T4	0	0	0	0	0	0	0
5	T0	+2	+1	+3	+1	+1	+1	0
	T1	+2	+1	+2	+1	+2	+1	+1
	T2	+1	0	0	0	0	0	+1
	T3	0	0	0	0	0	0	+1
	T4	0	0	0	0	0	0	+1
6	T0	+2	+1	+1	+1	+1	0	0
	T1	+2	+1	+1	+2	+2	0	0
	T2	+2	+1	+2	+3	+3	0	+1
	T3	+1	+1	+3	+4	+3	+1	+1
	T4	+1	+1	+3	+4	+3	+1	+1
7	T0	0	0	+1	+1	+1	+1	+1
	T1	0	0	+0,5*	+1	+1	+1	+1
	T2	0	0	+0,5*	+1	+1	0	+1
	T3	0	0	+0,5*	+1	+1	0	+1
	T4	0	0	+0,5*	+1	+1	0	+1
8	T0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0
	T1	+1	0	+1	+1	+2	+1	0
	T2	0	0	+1,5*	+1	+2	0	0
	T3	0	0	+1,5*	+1	+1	0	0
	T4	0	0	+1,5*	+1	+1	0	0
9	T0	+2	0	+1	+2	+1	+1	0
	T1	+2	+1	+1	+2	+2	+1	0
	T2	+1	+1	+1	+1	+3	+1	0
	T3	+1	0	+1	+1	+2	+1	0
	T4	0	0	+1,5*	+1	+1	0	0
10	T0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0
	T1	+1	+1	+1	+1	+2	+1	0
	T2	+1	0	+1	+1	+2	+1	0
	T3	0	0	0	0	+1	0	+1
	T4	0	0	0	0	+1	0	+1

\*Adaptação da escala de pontuação ocular. Houve mudança clínica, mas não se enquadrou no critério de classificação definida pelo autor ou da pesquisa.

## 10. ANEXOS

## ANEXO 1 - Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais



CEUA/UNICAMP

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO CLÍNICO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES PORTADORES DE ÚLCERA DE CórNEA PERSISTENTE", protocolo nº 3988-1, sob a responsabilidade de Dr. José Paulo Cabral de Vasconcelos / Dr. Rodolfo Malagó, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 27 de outubro de 2015.

Vigência do projeto: 11/2015-10/2016

Espécie/Linhagem: Cão (sem raça definida)

No. de animais: 10

Peso/Idade: 24 meses / 10kg

Sexo: 05 machos / 05 fêmeas

Origem: proprietários (não há eutanásia)

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

Campinas, 27 de outubro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## ANEXO 2 – Artigo submetido para publicação

### **Efficacy of the mesenchymal stem cells in the treatment of dogs with spontaneous chronic corneal epithelial defects**

Rodolfo Malagó<sup>1</sup>  
Maura KW Bittencourt<sup>1</sup>  
Alexandre L Pereira<sup>1</sup>  
Michele A Barros<sup>2</sup>  
Bruna P Morais<sup>2</sup>  
João Flávio P Martins<sup>2</sup>  
Alexandre S Silva<sup>3</sup>  
Jose Paulo C Vasconcelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Regenera Medicina Veterinária Avançada, Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Biologic Science, Centro Universitário de Itajubá, Itajubá, MG, Brazil.

Address correspondence to Rodolfo Malagó (rmalago@hotmail.com)

ORCID 0000-0001-8027-2484

#### **Abstract**

*Purpose* To evaluate the therapeutic effects of topical application of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue in dogs with spontaneous chronic corneal epithelial defect (SCCED).

*Methods* Ten dogs with the diagnosis of SCCED were selected for uncontrolled open study. The animals previously non-responsive to the clinical treatment received topically applied of the suspension the MSCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) in the conjunctival sac, once daily for 5 consecutive days. A periodic ophthalmologic evaluation with photographic documentation was performed before and after the application of MSCs within a follow-up period of 28 days. The dogs were evaluated for conjunctival congestion, conjunctival discharge, corneal cloudiness severity, corneal vascularization, corneal pigmentation, blepharospasm and any ocular or systemic complications. Hackett–McDonald Ocular Scoring System was adapted respecting to ocular symptoms.

*Results* The median time corneal healing was 21 ( $\pm 9,8$ ) days after MSCs transplantation. After allogeneic MSCs application, clinical improvements were observed, as showed by the reduction of conjunctival congestion, conjunctival discharge and blepharospasm for the treated animals. Regarding the area of corneal cloudiness, its ocular surface measurement was not statistically significant after treatment, but a clinical trend toward improvement can be seen at the end of the corneal healing. A significant increase in the corneal vascularization was observed in the beginning of treatment with posterior decrease at the end. After allogeneic MSCs application, presence of cornea pigmentation was observed in some cases. During the follow-up period, it was not observed any ocular or systemic complications.

*Conclusion* The topical application of allogeneic mesenchymal stem cells is a safe therapy and has therapeutic potential for SCCED in dogs.

**Keywords** mesenchymal stem cells, indolent ulcers, dogs, allogeneic cell therapy

## Introduction

The Chronic Spontaneous Corneal Epithelial Defect (SCCED), also known as “indolent ulcers”, is a superficial, refractory and chronic ulcerative keratitis manifested in middle aged dog (8 and 9 years old) [1,2]. Although it refers originally to as Boxer ulcers due to a predilection for Boxer dogs, subsequent studies have documented the occurrence in various breeds such as Beagle, Cocker Spaniel, Golden Retriever, Labrador, Lhasa Apso, German Shepherd, Schnauzer, Shih-Tzu, Weimaraner, West Highland Terrier, Yorkshire, among others [3,4]. The SCCED are similar to recurrent erosions in humans, that may also be associated with epithelial basement membrane dystrophy and anterior stromal dystrophies [5]. Light microscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry have been used to study the morphological features that may contribute to the underlying pathophysiology of SCCED [4,6,7].

Multiple treatment modalities have been recommended for the management of this disease in dogs including several types of topical therapies [8-11]. However, many of these topical therapies are unavailable, have a prohibitive cost, or require a frequency of application that is difficult for the owner, making their use impractical in a private practice setting. Another option for the treatment of the SCCED in dogs is the use of surgical procedures [2, 12-15].

The mesenchymal stem cell therapy has been proposed as a possible treatment in several conditions because they have several characteristics including to be self-renewal, to have a pluripotential capability, low immunogenicity properties, and notable immunomodulatory and anti-inflammatory activities. In ophthalmology, the therapeutic potential of MSCs in corneal wound repair has been studying for many authors [16,17]. The functions of MSCs in corneal wound repair can be attributed to two mechanisms: transdifferentiation and paracrine action [18-20].

However, for clinical applications in humans and another animal's companion care, further studies are necessary to confirm and elucidate the therapeutic effects and mechanisms of MSCs in corneal injury, especially to assess both efficacy and safety of adult stem cell therapies. Thus, the purpose of our study was evaluate the therapeutic effects of topical application of allogeneic MSCs derived from adipose tissue in dogs with SCCED.

## Materials and Methods

This was an uncontrolled open-label clinical study in the treatment of SCCED. All practices adhered to the standards for the care and use of laboratory animals established by the Association for Research in Vision and Ophthalmology's statement and Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Brazil, and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Protocol No. 3988-1). The dogs owners signed and consent before initiation on this experimental procedure and were fully informed about the safety, complications and efficacy of the cell therapy in SCCED were not known.

### Isolation and control of adipose tissue-derived MSCs

Allogeneic derived from canine adipose tissue were supplied by Regenera Laboratory of Campinas, SP, Brazil. The adipose MSCs were isolated of female 6- to 12-month-old healthy mongrel dogs. Visceral (ovary fat) fat samples were collected during elective surgeries (surgery independent of the study). Before enrollment, the dogs underwent to a routine clinical examination, hematologic evaluation (plasma proteins, red blood cells count, white blood cells count, platelet number and hemoglobin concentration), and viral screening. After collection, fat fragments were transported in a cooler box, under strict control of temperature, in transport medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM-H) and 500 U/ml streptomycin and 500 U/ml penicillin (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) – the samples were processed within 2 h. Adipose tissue cells were isolated using a standard protocol based on fragmentation followed by collagenase IV digestion, following procedures described in Mambelli and coauthors [22]. The isolated cells were plated at  $1 \times 10^5$  on 36-mm dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland) with DMEM-H supplemented with 15% HyClone fetal bovine serum (Catalog No. SH30070-03; Logan, UT, USA), 100 U/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin, 2 mM L-glutamine, and 1% nonessential amino acids (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA), which were designated as basal culture medium. The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After 4 to 7 days, cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), dissociated with 0.25% trypsin (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) and expanded in 75-cm<sup>2</sup> culture flasks (TPP).

The stem cells isolated from each animal did not present any differences in MSC markers and differentiation potential. All lineages express the principal MSC markers as defined by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, such as CD34 (-), CD45 (-), HLA-II (-), CD73 (+), CD 90(+) and CD105 (+) based on analysis [21,22]. The ability of the cells to differentiate into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes was also confirmed following the protocols of Dominici et al. (2006) [22]. The cells were screened for pathogens and contaminants (e.g., bacteria, fungi, virus, mycoplasma, and endotoxins), and no contamination was. After characterization, cells were cryopreserved at  $1 \times 10^6$  cells/ml in -80° Celsius [10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 40% fetal bovine serum,

and DMEM-H] and maintained in liquid nitrogen. Adipose canine MSCs were generated for clinical usage, and no differences were detected among the three MSC lineages; thus the lineages were used interchangeably.

### **Animals**

A total of 10 eyes from 10 adult dogs diagnosed with SCCED with different sexes, breeds, aged between 2 and 13 years old, participated in this study (Table 1).

SCCED was defined as the presence of superficial, noninfected erosion surrounded by a sheet of nonadherent or loose epithelium. The epithelium sometimes appears thickened, and fluorescein stain often leaks beneath the abnormal, nonattached epithelium. This fluorescein leakage results in a less intense ring of staining around the exposed stroma<sup>(2)</sup>. Dogs had SCCED diagnosis for at least three weeks and they were non-responsive to previous treatment with tobramycin 0.3% ophthalmic solution, one drop of q6h and artificial tears, one drop of q6h.

The exclusion criteria were corneal ulceration with identifiable causes and/or the presence of any other ocular or systematic disease.

### **Clinical evaluation**

Prior to the enrollment, dogs received all the essential clinical evaluations: physical and imaging evaluations (abdominal ultrasound and thorax X-ray radiology), hematocrit and biochemical analyses, which were performed in order to exclude other systemic diseases.

Furthermore, ocular structures were evaluated by indirect ophthalmoscopy and direct ophthalmoscopy. The STT values were recorded using commercial sterile test strips placed in the lower conjunctival fornix of each eye and maintained there for one minute before readout there. The presence of corneal ulcers was diagnosed using fluorescein staining. A comprehensive physical and ophthalmologic evaluation with photographic documentation was performed before and after the implementation of MSCs. All examinations and data acquisition were executed by the same researcher.

We adapted the Hackett–McDonald Ocular Scoring System respecting to ocular symptoms [23]. The symptoms evaluated were conjunctival congestion and conjunctival discharge, which were classified as normal (0), mild (+1), moderate (+2), severe (+3). The corneal cloudiness severity was classified as normal (0), minimal (+1), mild (+2), moderate (+3), severe (+4) and ocular surface measurement (applied to corneal clouding) as normal (0), less than one fourth of the corneal area (+1), one fourth to less than one half of the corneal area (+2), one half to less than three fourths the corneal area (+3), three fourths or greater of the corneal area (+4). The presence of the corneal vascularization was classified as normal (0), mildly affected (+1), moderately affected (+2), or severely affected (+3); blepharospasm and pigmentation as absent (0) or presence (+1).

The dogs were evaluated weekly for at least one month or until healing the cornea. The day of the MSCs application was denominated T0, followed by T1 to T4 times to recheck systemic and eye examinations after topical application of MSCs. The treatment of SCCED was defined as successful when biomicroscopy evaluation showed a fluorescein-negative, stable epithelial surface with no evidence of ocular discomfort as evidenced by either blepharospasm or ocular discharge.

### **MSCs application in dogs with SCCED**

The cryopreserved MSCs were rapidly thawed according to company portocol. Briefly, cryovials were placed (<2 min) in a 37°C water bath and washed with 3 ml of basal culture medium followed by centrifugation at 300 × g for 5 min. Afterward, cells were washed twice with 3 ml of PBS. One million (1 × 10<sup>6</sup> cells) MSCs were resuspended in 50 µL (equivalent to 1 drop of eye drops) of 0.9% NaCl, and this volume of suspension was topically applied in the conjunctival sac using a micro volume pipette, once daily for 5 consecutive days. The ophthalmic topical route via eye drops based on the principle of absorption mainly by the conjunctiva and secondarily by other structures of the eye (cornea, anterior chamber, and iris) [24-26].

### **Statistical analysis**

The data was analyzed using descriptive statistical techniques (minimum, maximum, mean and standard deviation) as well as the frequency distribution (histogram). The normality of the data was verified by the Shapiro-Wilk test. The Friedman's two-way ANOVA test was used to analyze the effects of the treatment on conjunctival congestion, conjunctival discharge, severity of corneal opacity, ocular surface measurement, vascularization and blepharospasm in non-parametric data. Dunnet was used for a comparison of two to two. Analyses were performed with statistical software (SPSS version 20.0 KO, IBM Corp, Armonk, NY, USA). Considering the rejection of the null hypothesis of 1% (p <0.01) for the correlations and 5% (p <0.05) for all other situations.

## Results

### Safety of MSCs application

No side effects, such as corneal infection, corneal melting, chemosis or photophobia, were observed with the eyes following after MSCs application. No changes were detected with respect to appetite, fecal output, weight, or body temperature, and no allergic reaction was noticed. Vision was present in all eyes at the date of last recheck examination.

### Time corneal healing

The median time corneal healing was 21 ( $\pm 9,8$ ) days after MSCs application. A total of 1/10 (10%) of cases was resolved at the first recheck examination. In the second recheck examination (T2) a total of three additional cases was resolved at this time, bringing a total number of resolved cases to 4/10 (40%). In the third recheck examination (T3) a total of three additional cases was resolved at this time, bringing the total number of resolved cases to 7/10 (70%). In the final recheck examination (T4) two additional case was resolved at this time, bringing a total of resolved cases to 9/10 (90%). The other case wasn't completely resolved, until the last evaluation performed 28 days after the MSCs application, this patient has received intervention with cyclosporine 0,5% ophthalmic ointment, because the wound healing corneal presented intense granulation tissue. The time corneal healing for this case was 42 days.

### Ocular surface changes

Prior to MSC application, dogs presented conjunctival congestion (hyperemia) in 6/10 cases (60%), conjunctival discharge in 6/10 cases (60%), corneal cloudiness (corneal opacity) in 10/10 cases (100%), corneal vascularization in 9/10 cases (90%) and pigmentation in 2/10 cases (20%) with varying scores (Fig. 1).

After MSCs application, improvements were observed, as showed by the reduction of conjunctival congestion and conjunctival discharge for the treated animals (statistical difference from T0 for T4) (Fig. 1a-d, Fig. 1m-p and Fig. 2). The corneal cloudiness severity and ocular surface measurement statistical analysis indicated that there was not a significant difference, but a clinical trend toward improvement can be seen at the end of the corneal healing (Fig. 1b-d, Fig. 1f-h, Fig. 1o-p and Fig. 3). An increased of the vascularization was observed (statistical difference from T0 for T2) until the second recheck examination (T2) with posteriorly reduction during the follow-up (Fig. 1b-c, Fig. 1f-g, Fig. 1n-o and Fig. 4). There was improvement to the blepharospasm, being significantly different, compared T0 for T4 (Fig. 4). After MSCs application, presence of pigmentation was observed in some cases (Fig. 1d,h,p).

## Discussion

This study represents the first published report of the use of allogeneic MSC topical application for treatment of canine SCCED. We evaluated the therapeutic effects of topical application of allogeneic MSCs derived from adipose tissue in dogs with SCCED, using topical administration of  $1 \times 10^6$  MSCs for 5 consecutive days. This type of cell therapy in ocular injury has been described in the literature and is well tolerated by dogs, cats, rats and rabbits [17-20,27,28]. There are case report and clinical study with successful treatment for the ocular surface in humans affected by persistent cornea epithelium defect and limbal stem cell deficiency [29,30].

During the follow-up after MSCs topical application there was no occurrence of any type of adverse events, as well as no tumor incidence or tissue rejection. The use of allogeneic MSC transplantation in patients has become an possible alternative due to their low immunogenicity by lack of MHC-II [31] and it has been shown to be a safe, procedure with no rejection as reported by many previous studies, not requiring use of immunosuppressant drugs [32-35].

The results of this study suggest that allogeneic MSCs topical application is an effective treatment for canine SCCED. The overall healing after the treatment was 90% and the median time corneal healing was 21 ( $\pm 9,8$ ) days. However, the precise time to healing in these cases is unknown, because patients were not evaluated daily and proportion of cases healed at each recheck examination were chosen as outcome measures in this study [36]. A meta-analysis of the SCCED resolution rate through surgical techniques reported the success rate of corneal healing after single debridement was approximately 50% followed by punctate keratotomy or grid keratotomy increasing healing rates up to 80% and superficial keratectomy associated with superficial keratectomy had the highest success rate approaching 100%[2]. Other study described the overall healing after a single treatment was 92.5% using a combination of the technique of diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. Especially in this study, the results (92.5%) were observed  $15.5 \pm 5.5$  days after the initial presentation [36].

One advantage of MSCs topical transplantation is the facility with which it can be applied, when compared to other forms of application, such as intrastromal injection, subconjunctival injection or cornea lesion injection[18]. General or topical anesthesia was not required to perform cell therapy in this study, nevertheless it is requeried in the punctate keratotomy, grid keratotomy, superficial keratectomy or diamond burr debridement [2, 14,15,36,37].

The adverse reaction of the intravenous MSCs infusion remain contentious issues, with pulmonary entrapment, vascular occlusion, and thrombus formation as described by some authors [35,38,39]. The incidence of adverse reactions has been related in dogs, including the formation of pulmonary thromboembolism after intravenous injection of MSCs. There is an increase lymphocyte count after intravenous infusion of the  $2 \times 10^6$  MSCs, pulmonary parenchymal changes detected by multi-detector computed tomography scanning ( $2 \times 10^6$  MSCs for three consecutive days), acute vomiting (5–10 minutes after the injection of allogeneic MSCs), as well as respiratory increase rated 7 days post-transplantation and the histopathologic examination in this case revealed pulmonary hemorrhage, edema, and inflammatory reaction[40] These reason were considered when we decided to use a low dose of MSCs ( $1 \times 10^6$ ) and most importantly a topical application. Due the nasolacrimal drainage system and high tears turnover we used this MSCs dosage for five consecutive days [41]. The results of dry eye dogs treated with low dose of MSCs ( $1 \times 10^6$ ) suggest that the prescription of multiple doses of MSCs can help the clinical amelioration of the animals even further [17]. Subsequently, the benefits of successive topical applications were demonstrated in dry eye treatment in dogs [26].

We showed that clinical amelioration occurs after a single topical application of low quantities ( $1 \times 10^6$ ) of MSCs for five consecutive days in dogs with SCCED. The assessment of symptoms showed reduction in conjunctival congestion, conjunctival discharge and blepharospasm, besides a vascularization increase which contributed to the healing of the cornea indicating therapeutic potential of MSCs. The molecular mechanisms treatment with MSCs remains largely unclear, but several possible mechanisms have been proposed [18]. The therapeutic effect of MSC is at least attributed partially to either the supplementation or substitution of corneal cells (congenital cornea diseases) [42]. MSCs can produce a set of signalling effectors that resulted in a decrease of host pro-inflammatory cytokines (interleukin-2, matrix metalloproteinase-2, interferon gamma) and an increase of anti-inflammatory cytokine (interleukin-6, interleukin-10) as well as growth factor (transforming growth factor beta) [20]. The other mechanisms have been proposed including exosome-mediated intercellular trafficking [43] and regulation of the recipient immune response by modulating the maturation and the function of multiple immune cells[18]. For example, it was observed that MSCs ( $1 \times 10^6$ ) used as topical application for 7 consecutive days for dry eye in dogs led a reduction in inflammatory markers (CD4, interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha) [26].

There was a clinical amelioration of the corneal opacity after MSCs topical transplantation in the final recheck examination, although some animals still show a small degree of opacification at the area of corneal healing. This result is in agreement with the clinical models of cornea chemical burn treated with MSCs (intrastromal, subconjunctival injections and topical application) in which corneal opacity was improved after 1-month of follow-up [20,44]. It is possible that MSCs transplantation restore the morphology of the keratocytes and endothelial cells, as observed in corneal defects of Mucopolysaccharidosis VII mice treated with intrastromally transplantation of umbilical mesenchymal stem cells (UMSCs). Confocal microscopy revealed reduced corneal haze in these mice suggesting that transplanted UMSCs could participate in both extracellular glycosaminoglycans (GAGs) turnover and enable host keratocytes to catabolize accumulated GAGs products [43].

Previously *in vivo* studies, it was showed the application of MSCs on the cornea can inhibit either inflammation-related neovascularization after chemical injuries [18,44] or inflammation in corneal disease such as feline eosinophilic keratitis and dry eye in dogs [17, 27,28]. This fact seems to be related to the increase of the expression of thrombospondin-1 (TSP-1) and the reduction of proangiogenic factor MMP-2 [45,46]. We observed that until the second recheck examination there was an increased of the vascularization followed by its subsequent reduction. There may be factors, as showed in some *in vitro* study, that stimulate angiogenesis as a combination of vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and IL-6 [47,48].

The pathophysiology of SCCED has been reported in a number of previous studies, but there seems to be a consensus that there is a loss of the basement membrane leading to the increases of epithelial wound healing time and may be associated with an adhesion complex abnormality [2]. Therefore, the MSCs transplantation may act modulating the components of the basement membrane or over the cells that produce them. The MSCs paracrine competence has also been reported as having an important role in this mechanism, secreting several signalling molecules such as neurotrophic factors, growth factors and cytokines, which can diffuse into tissue environment interacting with the surrounding cells. In addition, a new mechanism of MSCs in treating corneal disease has been related, which concerns the exosome-mediated intercellular trafficking [18]. Exosomes are microvesicles, which originate from the fusion of intracellular multivesicular bodies with cell membrane and are released into the extracellular spaces. They are composed of proteins, acid ribonucleic messenger (mRNA) and micro acid ribonucleic messenger (miRNA), secreted by many types of cells including MSCs and have been reported to have many important biological functions [49,50].

The major limitation of this study was that it did not include a group of nontreated or placebo-treated animals. Besides, the study only evaluated the clinical response in dogs treated with MSCs transplantation in a serie of cases design performed in a standard ophthalmologic veterinary clinic. Although the study was not conducted in a controlled experimental setting, we report clinical amelioration of the eyes treated with MSCs suggesting that the protocol will be successful in other settings. Further studies are necessary to compare the

surgical therapies and determine which technique is most effective in the treatment of canine SCCED, beyond the levels of growth factors or cytokines presentes in the tears that evidence of the action of MSCs aplicated by topical route.

### **Conclusion**

The results of this study suggest that the topical application of allogeneic mesenchymal stem cells is an effective and safe therapy and has therapeutic potential for SCCED in dogs.

### **Ethical standards**

The study was approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Protocol No. 3988-1) and have been performed in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology's.

### **Conflict standards**

The authors declare that there were no conflicts of interest.

### **References**

1. Ledbetter EC, Gilger BC (2013) Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. 5nd ed. Iowa: Willey-Blackwell, p 976-92.
2. Bentley E (2005) Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: a review. *J Am Anim Hosp Assoc* 41(3):158–65. <https://doi.org/10.5326/0410158>.
3. Moore, PA (2003) Diagnosis and management of Chronic Corneal Epithelial Defects (Indolent Corneal Ulceractions). *Clin Tech Small Anim Pract* 18(3):168-77. [https://doi.org/10.1016/s1096-2867\(03\)90013-2](https://doi.org/10.1016/s1096-2867(03)90013-2).
4. Bentley E, Abrams GA, Covitz D, et al (2001) Morphology and immunohistochemistry of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED) in dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10):2262-9.
5. Aitken DA, Beiruty ZA, Lee WR (1995) Ultrastructural study of the corneal epithelium in the recurrent erosion syndrome. *Br J Ophthalmol* 79(3):282-9. <https://doi.org/10.1136/bjo.79.3.282>.
6. Gelatt KN, Samuelson DA (1982) Recurrent corneal erosions and epithelial dystrophy in the boxer dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 18:453-60.
7. Kirschner SE, Niyo Y, Betts DM (1989) Idiopathic persistent corneal erosions: clinical and pathological findings in 18 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 25(1):84-90.
8. Miller WW (1996) Use of polysulfated glycosaminoglycans in treatment of persistent corneal erosions in dogs—a pilot clinical study. *Vet Med* 91:916-22.
9. Murphy CJ, Marfurt CF, McDermott A, et al (2001) Spontaneous chronic corneal pithelial defects (SCCED) in dogs: clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10):2252-61.
10. Heather L, Chandler HL, Gemensky-Metzler AJ, et al (2010) In vivo effects of adjunctive tetracycline treatment on refractory corneal ulcers in dogs. *JAVMA Ophthalmol* 237(4): 378-386. <https://doi.org/10.2460/javma.237.4.378>.
11. Regnier A., Cazalot G., Cantaloube B (2005) Topical treatment of non-healing corneal epithelial ulcers in dogs with aminocaproic acid. *Vet Rec* 157(17):510-3. <https://doi.org/10.1136/vr.157.17.510>.
12. Morgan RV, Abrams KL (1994) A comparison of six different therapies for persistent corneal erosions in dogs and cats. *Vet Comp Ophthalmol* 4(1):38-43.
13. Champagne ES, Munger RJ (1992) Multiple punctate keratotomy for the treatment of recurrent epithelial erosions in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 28(3):213-26.
14. Stanley RG, Hardman C, Johnson BW (1998) Results of grid keratotomy, superficial keratectomy and debridement for the management of persistent corneal erosions in 92 dogs. *Vet Ophthalmol* 1(4):233-238. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.1998.00045.x>.
15. Peiffer RJ Jr, Gelatt KN, Gwin RM (1976) Superficial keratectomy in the management of indolent ulcers of the boxer cornea. *Canine Pract* Aug:31-33.
16. Li, F.; Zhao, SZ (2014) Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *Word J Stem Cells* 6(3):296-304. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.296>.
17. Bittencourt MK, Barros MA, Martins JF, et al (2016) Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Med* 8(3):63–77. <https://doi.org/10.3727/215517916X693366>.
18. Zhang L, Coulson-Thomas VJ, Ferreira TG, et al (2015) Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *BMC Ophthalmol* 15(Suppl 1):155. <https://doi.org/10.1186/s12886-015-0138-4>.
19. Jiang TS, Cai L, Ji WY, et al (2010) Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 16:1304–16.

20. Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al (2008) The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells Transl Med* 26(4):1047–55.
21. Mambelli LI, Santos EJ, Frazão PJ, et al (2009) Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods* 15(1):87–94. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0186>.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315–7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
23. Munger RJ (2002) Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies. *Vet Ophthalmol* 5(2):167–75. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2002.00243.x>.
24. Järvinen K, Järvinen T, Urtti A (1995) Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 16(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00010-5](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00010-5).
25. Farkouh A, Frigo P, Czejka M (2016) Systemic side effects of eye drops: a pharmacokinetic perspective. *Clin. Ophthalmol.* 10:2433–41. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S118409>.
26. Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, et al (2019) Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$  in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research.* 39, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101525>.
27. Villatoro AJ, Claros S, Fernández V, et al (2018) Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. *BMC Vet Res* 14(116):1-13. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1413-4>.
28. Villatoro AJ, Fernandez V, Claros S, et al (2015) Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int* 2015:527926.
29. Ramírez BE, Sánchez A, Herreras JM, et al (2015) Stem Cell Therapy for Corneal Epithelium Regeneration following Good Manufacturing and Clinical Procedures. *BioMed Res Int* 2015: 408495. <https://doi.org/10.1155/2015/408495>.
30. Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, et al (2012) Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 250(3):455–7. <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1841-3>.
31. Carrade DD, Borjesson DL (2013) Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 63(3):207–17.
32. Reinders ME, Dreyer GJ, Bank JR, et al (2015) Safety of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stromal cell therapy in renal transplant recipients: The neptune study. *J Transl Med* 13:344. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0700-0>.
33. Togel F, Cohen A, Zhang P, et al (2009) Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Dev* 18(3):475–85. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0092>.
34. Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4):1815–22. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>.
35. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, et al (2009) Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res* 77(3):370–6. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.02.001>
36. Gosling AA, Labelle AL, Breaux CB (2013) Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Vet Ophthalmol* 16(2):83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01026.x>.
37. Soong HK, Farjo Q, Meyer RF, Sugar A (2002) Diamond burr superficial keratectomy for recurrent corneal erosions. *Br J Ophthalmol* 86(3):296–298. <https://doi.org/10.1136/bjo.86.3.296>.
38. Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, et al (2006) Tissue distribution of <sup>18</sup>F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 47(8):1295–301.
39. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al (2009) Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 18(5):683–92. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0253>.
40. Kang MH, Park HM (2014) Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. *Acta Vet Scand* 56(1):16. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-16>.
41. Gum GG, MacKay EO (2013) Physiology of the eye. In: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. 5nd ed. Iowa: Willey-Blackwell, p 175.

42. Liu H, Zhang J, Liu CY, et al (2010) Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One* 5(5):e10707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010707>.
43. Coulson-Thomas VJ, Caterson B, Kao WW (2013) Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells cures the corneal defects of mucopolysaccharidosis VII mice. *Stem Cells* 31(10):2116–26. <https://doi.org/10.1002/stem.1481>.
44. Almaliotis D, Koliakos G, Papakonstantinou E, et al (2015) Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253(7):1121–35. <https://doi.org/10.1007/s00417-015-3042-y>.
45. Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al (2009) Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells. *Cytokine* 46(1):100–3. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.011>.
46. Parys M, Kruger JM, Yuzbasiyan-Gurkan V (2017) Evaluation of immunomodulatory properties of feline mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 26(10):776–85. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0041>.
47. Kwon HM, Hur SM, Park KY, et al (2014) Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vasc Pharmacol* 63(1):19–28. [10.1016/j.vph.2014.06.004](https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.004).
48. Jiang Z, Liu G, Meng F, et al (2017) Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol* 101(11):1–8. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-310012>.
49. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, et al (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3(5):321–30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x>.
50. Tan SS, Yin Y, Lee T, et al (2013) Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* 23:2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.22614>.

## **Legends**

**Table 1** Characterization of the research group (M, male; F, female; L, left eye; D, right eye).

**Fig. 1** Macroscopic evaluation of the clinical signs at different times. Representative photographs demonstrate the condition of the eyes in the T0 (a, b, i, m) before MSCs and different times after allogeneic MSCs application (b, c, d, f, g, h, j, h, k, l, n, o, p).

**Fig. 2 a,b** Evaluation of conjunctival congestion and conjunctival discharge pre (T0) and post-MSCs application (T1, T2, T3 and T4). Values represent means±SEM from measurements obtained from the dogs eyes in the successive times (conjunctival congestion  $p=0,001^*$  and conjunctival discharge  $p=0,019^*$ ).

**Fig. 3 a,b** Evaluation of corneal cloudiness severity and ocular surface measurement pre (T0) and post-MSCs application (T1, T2, T3 and T4). Values represent means±SEM from measurements obtained from the dogs eyes in the successive times (corneal cloudiness severity  $p=0,216$  and conjunctival discharge  $p=0,248$ ).

**Fig. 4 a,b** Evaluation of vascularization and blepharospasm pre (T0) and post-MSCs application (T1, T2, T3 and T4). Values represent means±SEM from measurements obtained from the dogs eyes in the successive times (vascularization  $p=0,001^*$  and blepharospasm  $p=0,017^*$ ).

## ANEXO 3 – Comprovante de submissão

07/12/2019

Email – Rodolfo Malagó – Outlook

GRAE-D-19-01333 : Submission Confirmation for Efficacy of the mesenchymal stem cells in the treatment of dogs with spontaneous chronic corneal epithelial defects

Graefe's Archiv - Editorial Office <em@editorialmanager.com>

Sáb, 07/12/2019 17:37

Para: Rodolfo Malagó <rmalago@hotmail.com>

Manuscript No. GRAE-D-19-01333

Title: Efficacy of the mesenchymal stem cells in the treatment of dogs with spontaneous chronic corneal epithelial defects

By: Mr Rodolfo Malagó

Dear Mr Malagó,

Thank you for submitting your manuscript to Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. We follow a strict editorial policy of submitting all manuscripts to peer review.

The submission id is: GRAE-D-19-01333

Please refer to this number in any future correspondence.

Submissions will only be further processed if they are in full accordance with the journal's instructions for authors.

You may check the status of your paper by logging into Editorial Manager at

<https://www.editorialmanager.com/grae/>. You may also edit your information as appropriate.

Springer offers authors the option of making their articles available with open access via the Open Choice programme. We advise you to familiarise yourself with the details of Springer Open Choice in advance, in order to decide quickly should your paper be accepted for publication. Further information can be found on <http://www.springer.com/openchoice>

Yours sincerely,

Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology

<https://www.editorialmanager.com/grae/>

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/grae/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQMkADAwATZiZmYAZC04ZTM3LT0yYTYQIMDAcLTAwCgBGAAAD%2FX18Pxr0Y0ehXhw2vAtRrgcARh...> 1/2