

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

TRANSPLANTE LIMBAL COMO TRATAMENTO DA
CERATITE PIGMENTAR EM CÃES

Francimery Aparecida Fachini

Ma. Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSPLANTE LIMBAL COMO TRATAMENTO DA
CERATITE PIGMENTAR EM CÃES**

Discente: Francimery Aparecida Fachini

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária.

F139t

Fachini, Francimery Aparecida

Transplante limbal como tratamento da ceratite pigmentar em cães / Francimery Aparecida Fachini. -- Jaboticabal, 2023
48 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes

1. Braquicefálicos. 2. Células tronco. 3. Melanose corneana.
4. SLET alógena. 5. Superfície ocular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

Essa tese visa auxiliar em pesquisas futuras sobre a ceratite pigmentar e sua patogênese, uma vez que a afecção é causa de frustração no quesito tratamento no âmbito veterinário e, conseqüentemente, na vida do tutor de cada animal portador da doença devido à ausência de cura conhecida até o momento. O objetivo dessa foi buscar um possível tratamento de sucesso e factível na rotina do Médico Veterinário, a fim de diminuir o impacto no número crescente de pacientes com perda da capacidade visual ocasionada pela pigmentação total corneana promovida pela enfermidade.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

This thesis aims to assist in future research on pigmentary keratitis and its pathogenesis, since the condition is a cause of frustration in terms of treatment in the veterinary field and, consequently, in the life of the owner of each animal with the disease due to the absence of a known cure. until now. The objective of this was to seek a possible successful and feasible treatment in the Veterinarian's routine, in order to reduce the impact on the growing number of patients with loss of visual capacity caused by the total corneal pigmentation promoted by the disease.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TRANSPLANTE LIMBAL COMO TRATAMENTO DA CERATITE PIGMENTAR EM CÃES

AUTORA: FRANCIMERY APARECIDA FACHINI

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente

Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Data: 05/07/2023 15:25:24-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPESHI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente

ANNELESE CARLA CAMPESHI DOS SANTOS
Data: 05/07/2023 16:52:09-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. RENATA MARIA MONÇÃO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Centro Universitário de Extensão
Santana/BA

Documento assinado digitalmente

RENATA MARIA MONÇÃO DA SILVA
Data: 05/07/2023 09:11:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. TIAGO BARBALHO DE LIMA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Veterinária / UEMA - São Luís/MA

Documento assinado digitalmente

TIAGO BARBALHO DE LIMA
Data: 04/07/2023 08:37:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 04 de julho de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Francimery Aparecida Fachini - nascida em 7 de fevereiro de 1995, na cidade de Joinville, Santa Catarina. Graduiu-se em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense (IFC) – Câmpus de Araquari, em fevereiro de 2018. Mestra em Cirurgia Veterinária, área de oftalmologia veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Fabrício Singaretti de Oliveira. Atualmente, é aluna regular do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, nível de doutorado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes.

“Para receber amor,
encha-se dele, até se
tornar um imã.”

Charles Hoanel

DEDICO

Aos meus pais,

Gilson e Rosane Fachini.

A todos os meus pacientes.

A todos que foram luz na minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque Tu, meu Deus, nunca me abandonaste, me deu a força mesmo quando eu não podia tê-la. Me trouxe a luz, mesmo quando eu não a quis enxergar. Me deu a fé, mesmo quando eu quis desacreditar. Me estendeu a mão, mesmo quando eu não a quis tocar. Gratidão à ti Senhor, todos os dias da minha vida.

Aos meus pais Gilson e Rosane, que sempre estiveram torcendo e orando por mim. Por sempre cuidarem de mim, mesmo com tantos quilômetros de distância. Por sempre acreditarem em mim. Não seria nada sem vocês, meu amor é eterno. Eu honro a vida de vocês e por me proporcionarem o melhor que vocês tiveram a me oferecer.

Ao meu irmão Gilson Jr., que do seu jeito, abriu o coração, se tornou meu melhor amigo, me estendeu a mão e sempre esteve ao meu lado.

Aos meus padrinhos, em especial ao Jackson e à Juceli que nunca mediram esforços para me ajudarem a alcançar os meus sonhos e que por tantas vezes tomaram decisões pensando em mim. Madrinha querida, obrigada por me amar incondicionalmente e ter sido cura quando mais precisei.

A minha Luna, minha fiel companheira. Lulu: doce, meiga, amável e amada por todos, carinhosa, especial. Deus reservou você especialmente para mim e eu tenho essa convicção de maneira muito forte no meu coração. Mamãe sempre fará tudo por você. Você foi minha força na solidão. Te amo princesa.

Ao meu parceiro de vida Kayro, por todo apoio e paciência nessa reta final do doutorado, por me fazer companhia nas horas seguidas sentada escrevendo, por compreender minhas limitações de tempo e ausência nesses dias. Obrigada por ter vindo transformar os meus dias e vida. Te amo!

A professora Paola Castro Moraes, que foi muito além de uma orientadora, foi minha mãe fisicamente quando eu estava distante da minha. Você é uma das pessoas mais iluminadas que eu já tive a oportunidade de conhecer. Obrigada.

A minha coorientadora Karina Kamachi Kobashigawa. Por vezes me pergunto, será que ela sabe o quanto eu a amo? Ah, essa japonesa! Obrigada por tudo que você significa em minha vida, em todos os aspectos, não sou capaz de traduzir em palavras tudo que sinto. Amo você, gratidão todos os dias da minha vida.

A minha amiga melhor amiga e instrutora de oftalmologia, Gabriela Madruga. Amiga, professora, conselheira, irmã, tudo em uma pessoa só. Gabi, você faz parte inteiramente de mim, não importa de você estiver no Japão e eu no Brasil, ainda assim,

você será meu par nessa vida. Te amo tanto que você nem pode imaginar. Simplesmente obrigada por tudo.

A minha estagiária, orientada e AMIGA, Larissa Marchini. Lari, tu vieste na minha vida para me mostrar a tradução de doçura e coração puro. Você me mudou, para melhor. Que alegria saber que Deus me presenteou com você em minha vida e permitiu que eu te trouxesse para essa área linda dentro da oftalmologia. Você me mostrou que temos um propósito aqui nessa vida terrena, e você foi um dos meus propósitos. Obrigada por tudo, todos os dias de minha vida. Que eu possa estar presente em ti para sempre, minha casa será sempre sua. Te amo.

Ao grupo do Serviço de Oftalmologia por todo o auxílio, ensinamentos, momentos de boas risadas e acima de tudo pela amizade. Vocês contribuíram todos os dias para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada Ivan Martinez, Karina Herência Alexandre Sobrinho, Gabriela Madruga, Laís Sargi, Cinthya Gujanwski por tantos momentos lindos colecionados até aqui. Agradeço também aos estagiários que passaram pelo Setor.

Um parágrafo especial de agradecimento à Lais Sargi, que muito além de colega de profissão se tornou uma das minhas amigas e dividiu momentos inesquecíveis comigo. Obrigada por ter me permitido te ensinar, por acreditar em mim e sempre me elevar. Você se tornou extremamente especial no meu coração. Obrigada.

A minha irmã de alma: Monique Paludetti. Mo, o que teria sido de mim sem você? Entre os presentes da vida, Deus te enviou à minha e como sou grata por isso. Obrigada por ter me levantado quando nem eu queria levantar. Por me estender a mão em absolutamente todos os momentos. Você é a luz mais linda que eu já vi brilhar.

A minha pequena pipoca Letícia Warde, por ter estado ao meu lado quando precisei e quando não precisei também. Amiga, sua doçura me ganhou desde o primeiro dia em que te vi. Sua luz tem poder de cura e, foi exatamente o que você fez, me auxiliou no meu processo de cura. Obrigada.

A minha afilhada Manoela Machado – agora Zanirato. Ah meu amor, quanta jantinha fitness, vinhos e desabafos né? Que delícia foi viver tudo aquilo ao teu lado, que delícia foi ter você como minha confidente. Até mesmo levar uns tapas da Tutu! Como prometido diante de Deus, estarei sempre aqui por você. Te amo, os quilômetros de distância nunca importarão. Obrigada por tudo.

A minha companheira de café, Marcella Filézio. Minha amiga querida, quanta saudade física eu tenho de ti. Quantas risadas gostosas nós compartilhamos. Quantos cappuccinos e momentos na Recanto Doce. Quanta saudade. Não importa que esteja na Espanha, para mim, você está sempre aqui. Te amo.

As minhas vizinhas mais especiais: Tryssia e Stella. Ah meninas, como foi bom né? Nossos cafés de domingo, nossas risadas... E quanta risada! Mas também quanto choro teve e ombro amigo. Queria pode voltar no tempo e reviver alguns momentos. Me resta carregar as lembranças no coração. Amo vocês!

A minha psicóloga Gislene. Gi, você deixou de ser apenas a psicóloga, profissionalmente falando, em minha vida. Afinal, quem te presta terapia na van do transfer em Cancún? Quem faz isso é porque acima de tudo, tem amor. E eu AMO você e tua vida. Obrigada por me auxiliar nessa caminhada. Sem você eu não teria conseguido.

As minhas amigas de Joinville que nunca deixaram de estar presentes: Samantha, Ana Cristina e Raquel. Sa, café do meu leite, você é a prova viva de que nada nem ninguém passa em nossa vida por acaso, sempre existe uma razão por trás de tudo aquilo que nos rodeia. Obrigada por ser meu alicerce e melhor amiga! Te amo. Ana, tu sabes o quanto eu te admiro, faço questão de reforçar isso em cada oportunidade que tenho. Você é uma inspiração de mulher para mim, me espelho em ti e, se eu me tornar um pouquinho do que tu és, já me sinto realizada, amo você. Raquel, meu grudinho, nunca deixou de ter um horário na agenda para mim, minha amizade doce e serena, te levo comigo sempre, te amo.

Aos amigos de Jaboticabal que fiz em Lucas do Rio Verde: Rozeta, Pão, Guêta, Toda-Toda.

Aos amigos e veterinários do Mato Grosso que me receberam de braços abertos: Érica, Mayelli, Mayara, Thainá, Fernando, Marcielly, Maria Patrícia, Cristiano, Gustavo, Ana, Mateus, Waléska, Jhulie, Janaína, Rayanne, Brenda, Larissa, Thaís, Luana, Naila, Viviane, Elias, Janine, Dani Londero, Lara.

In memoriam: Érica Fernandes. Admito que escrever sobre você é uma missão difícil. Ah Ferzinha, como tu partiu cedo desse plano. Quanta bondade tinha nesse teu coração. Como sou grata a você. O que teria sido de mim sem você aqui no Mato Grosso? Quantas portas tu me abriste, quantos sorrisos compartilhamos, quantas verdinhas, não é? Queria ter feito mais por você, queria ter dito mais vezes o quanto eu te amo. Você será para sempre a minha eterna saudade.

Aos queridos de Jaboticabal: Nú-lepo, Bruna, Puberdade, Ju, Repôio, Parça, Fran, Gadão, todos os moradores da república Litrasso que passaram em minha vida.

Aos meus ex-sogros, Sueli e Binho, que fizeram tanto por mim durante essa jornada, tanto cuidado e zelo comigo. Minha eterna gratidão sempre.

A todos aqueles que contribuíram positivamente desde o início do doutorado e/ou me ajudaram a aliviar momentos de estresse com boas risadas.

Aos tutores do Bob, Ozzy e Dilan, por confiarem seus bens preciosos em minhas mãos e possibilitar a concretização do meu doutorado, mesmo com as adversidades da pandemia.

Aos meus pacientes do projeto que foram instrumento de conhecimento, ciência e respeito, minha eterna gratidão por terem passado por minhas mãos com tanta doçura e abanar de rabo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Anatomia do limbo e fisiologia das células-tronco limbais.....	9
2.2. Cães braquicefálicos e particularidades	10
2.3. Deficiência limbal em cães.....	10
2.4. Deficiência de células epiteliais corneais limbais	12
2.5. Condutas para o tratamento LSCD	13
2.6. Transplante de células limbais	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Considerações quanto à ética	15
3.2. Grupos e protocolos experimentais	16
3.2.1. Obtenção de explantes de limbo	16
3.3. Procedimentos	17
3.3.1. Avaliação pré-cirúrgica.....	17
3.3.2. Confecção das lâminas para avaliação citológica.....	18
3.3.3. Cirurgia dos anexos.....	19
3.3.4. Coleta e processamento das córneas.....	19
3.3.4.1. Confecção das lâminas para avaliação histopatológica	20
3.3.5. Transplante limbal.....	20
3.3.6. Avaliação pós-transplante.....	21
3.4. Descrição Estatística	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Animais selecionados	23

4.3. Análises Inferenciais	27
4.4. Avaliação citológica.....	32
4.5. Avaliação histopatológica.....	32
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	41
7. AGRADECIMENTOS.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Transplante limbal como tratamento da ceratite pigmentar em cães"**, protocolo nº 4330/20, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paola Castro Moraes, 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 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de setembro de 2020.

Vigência do Projeto	10/09/2020 a 31/07/2022
Espécie / Linhagem	Canino
Nº de animais	16
Peso / Idade	1 a 20 Kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Rotina do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"

Jaboticabal, 17 de setembro de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

TRANSPLANTE LIMBAL COMO TRATAMENTO DA CERATITE PIGMENTAR EM CÃES

RESUMO – A ceratite pigmentar em cães é uma afecção que tem se tornado importante causa de déficit visual e seu tratamento ainda se apresenta insuficiente visto que, todos os possíveis tratamentos estudados cursam com repigmentação da córnea. Objetivou-se avaliar a eficiência do transplante limbal como tratamento da ceratite pigmentar em cães. Por meio da avaliação citológica, investigou-se também a possibilidade de relação entre a patogenia da deficiência de células epiteliais limbais na patogenia da afecção. Seis unidades oculares com ceratite pigmentar de cães foram estudadas, das raças Shih Tzu e Pug. Dividiram-se em 2 grupos, transplante (GT) e controle (GC). Previamente ao transplante, amostras citológicas de impressão da superfície corneana foram coletadas em busca de células caliciformes. Realizou-se ceratectomia lamelar para remoção da camada corneal pigmentada, e as amostras foram enviadas para avaliação histopatológica. No GT foi aplicada técnica de transplante epitelial limbal simples (SLET) alógena enquanto GC apenas ceratectomia lamelar. As avaliações de melanose, edema corneano, blefarospasmo, secreção ocular, tecido de granulação, hiperemia conjuntival e transparência corneana foram qualiquantificados nos dias 0, 14, 28 e 70 pós transplante. Realizou-se análise estatística exploratória multivariada pela análise paralela de Horn e inferencial por modelos lineares generalizados multinível. Comparação múltipla entre os grupos foi realizada no *posthoc test* com o procedimento de Bonferroni. Em ambos os grupos, os maiores valores de melanose foram identificados no período pré-operatório, com queda em 14 dias pós-cirúrgico e subindo para valor intermediário com 70 dias pós. Embora a ausência de diferença estatística entre os grupos quanto a melanose, os olhos do GT apresentaram tendência ao aumento do pigmento mais tardiamente em relação ao GC pós cirúrgico. O GC apresentou aumento de edema corneano com 28 dias de pós em relação ao período pré-operatório. O GT obteve menor escore de blefarospasmo com 28 dias pós, enquanto o GC com 70 dias. Presença de célula caliciforme foi identificada na citologia de impressão. Na avaliação histológica, descreveu-se a presença de melanócitos pigmentados no estroma superficial, bem como infiltrado inflamatório neutrofílico. A evidência de célula caliciforme fortifica a possível associação da deficiência de células epiteliais limbais na patogenia da ceratite pigmentar. O transplante limbal alógeno pela técnica de SLET não atingiu o objetivo de solucionar a recorrência da ceratite pigmentar nos cães acometidos.

Palavras-chave: braquicefálicos, células tronco, melanose corneana, SLET alógena, superfície ocular

LIMBAL TRANSPLANTATION AS A TREATMENT FOR PIGMENTARY KERATITIS IN DOGS

ABSTRACT – Pigmentary keratitis in dogs is a condition that has become an important cause of visual impairment and its treatment is still insufficient, since all possible treatments studied result in corneal repigmentation. The objective was to evaluate the efficiency of limbal transplantation as a treatment for pigmentary keratitis in dogs. Through cytological evaluation, the possibility of a relationship between the pathogenesis of limbal epithelial cell deficiency and the pathogenesis of the condition was also investigated. Six ocular units with pigmentary keratitis from Shih Tzu and Pug dogs were studied. They were divided into 2 groups, transplant (TG) and control (GC). Prior to transplantation, cytological impression samples from the corneal surface were collected in search of goblet cells. Lamellar keratectomy was performed to remove the pigmented corneal layer, and the samples were sent for histopathological evaluation. In the TG, the allogeneic simple limbal epithelial transplant (SLET) technique was applied, while the CG only lamellar keratectomy. Evaluations of melanosis, corneal edema, blepharospasm, ocular discharge, granulation tissue, conjunctival hyperemia and corneal transparency were qualified on days 0, 14, 28 and 70 post-transplantation. Multivariate exploratory statistical analysis was performed using Horn's parallel analysis and inferential analysis using multilevel generalized linear models. Multiple comparison between groups was performed in the posthoc test with the Bonferroni procedure. In both groups, the highest melanosis values were identified in the preoperative period, with a decrease at 14 days after surgery and rising to an intermediate value at 70 days after surgery. Despite the lack of statistical difference between the groups regarding melanosis, the eyes of the TG showed a tendency to increase in pigment later than the post-surgical CG. The CG showed an increase in corneal edema 28 days after the operation compared to the preoperative period. The TG obtained a lower blepharospasm score at 28 days post, while the GC at 70 days. Presence of goblet cells was identified on impression cytology. In the histological evaluation, the presence of pigmented melanocytes in the superficial stroma was described, as well as a neutrophilic inflammatory infiltrate. Evidence of goblet cells strengthens the possible association of limbal epithelial cell deficiency in the pathogenesis of pigmentary keratitis. Allogeneic limbal transplantation using the SLET technique did not achieve the objective of solving the recurrence of pigmentary keratitis in affected dogs.

Keywords: brachycephalic, corneal melanosis, ocular surface, SLET allogeneic, stem cell.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CLAU	Autoenxerto limbal conjuntival
CLET	Transplante epitelial limbal cultivado
CPs	Componentes principais
CTLs	Células-tronco limbais
CTs	Células-tronco
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
GC	Grupo controle
GT	Grupo transplante
HE	Hematoxilina e eosina
KCS	Ceratoconjuntivite seca
LSCD	Deficiência de células corneais epiteliais limbais
MA	Membrana Amniótica
Mm	Milímetro
PK	Ceratite pigmentar
SLET	Transplante epitelial limbal simples
TLS	Teste lacrimal de Schimer
UNESP	Universidade Estadual Paulista
µm	Micrômetro

1. INTRODUÇÃO

A transparência corneana é essencial para a manutenção da visão. Dentre fatores importantes para sua manutenção constam a ausência de vasos sanguíneos, o relativo estado de desidratação e o arranjo regular de suas fibras colágenas (Ledbetter e Gilger, 2013). Alterações como neovascularização, fibrose tecidual, infiltrado inflamatório e pigmentação são achados comuns tanto na ceratite pigmentar (PK) quanto na deficiência de células corneanas epiteliais limbais (LSCD), causando dificuldade visual devido a opacidade. A PK é uma ceratite não ulcerativa que se desenvolve rapidamente e de maneira facilitada em algumas raças braquicefálicas. É resultante da migração de melanócitos perilimbais para a córnea clara, os quais depositam grânulos de melanina juntamente às células epiteliais (Ledbetter e Gilger, 2013).

Os fatores que são referidos como causa ou contribuidores para o aparecimento da PK nos Pugs abrangem irritações crônicas por distiquíase, triquíase de prega nasal, entrópio de canto medial e macrobléfaro (Ledbetter e Gilger, 2013). Todavia, evidências de que essas alterações influenciam no aparecimento da enfermidade são vagas (Labelle, 2013). Contudo, outras possíveis origens foram sugeridas como fator primário no desenvolvimento da ceratite pigmentar nos Pugs, incluindo a deficiência de células troncos limbais ou fatores genéticos (Labelle, 2013; Sanchez e Daniels, 2015). Considerando algumas raças braquicefálicas, é descrita prevalência de 40% da ceratite pigmentar. Observa-se que a idade média de manifestação da oftalmopatia é de 7,8 anos nesses animais (Vallone et al., 2016).

A reposição do contingente celular corneano ocorre a partir da multiplicação de células progenitoras, localizadas no epitélio basal do limbo, região de transição entre a córnea e a esclera. Estas células dão origem às células amplificadoras, localizadas na camada basal da córnea, as quais ao se multiplicarem geram as células basais do epitélio corneano, que se dividem e diferenciam, migrando para a superfície até ocorrer a descamação como é explicado pela teoria XYZ, utilizada com frequência em estudos humanos (Sanchez e Daniels, 2015). O microambiente do limbo é uma composição delicada de arranjos estruturais, fatores de crescimento, terminações nervosas, pigmentação, entre outros, inclusive não totalmente elucidados. Toda e qualquer sutil

alteração neste meticuloso microambiente pode ocasionar a extinção deste limitado contingente celular, tal destruição causa a LSCD (Puangsricharn e Tseng, 1995), afecção conhecida e estudada em Medicina, porém que carece de estudos na Veterinária.

Tanto a PK como a LSCD apresentam, também em comum, a principal de suas causas, as irritações. No caso da PK, causada por inflamações crônicas (Ledbetter e Gilger, 2013). Já na LSCD, as causas são divididas em abrupta, como no caso de acidentes com álcalis ou ácidos, ou gradual, como nas irritações crônicas que levam a modificações no microambiente do limbo (Puangsricharn e Tseng, 1995). Todas as causas citadas para PK poderia tratar-se de fatores que, em longo prazo, ensejariam alterações no microambiente das células tronco.

Alguns autores hipotetizam que a PK pode se tratar de um tipo de LSCD na Veterinária, uma vez que o limbo perde sua capacidade de barreira, permitindo a invasão corneal por melanócitos e células inflamatórias (Sanchez e Daniels, 2015). Vallone et al. (2016) não encontraram evidência de LSCD via microscopia confocal, em estudo em braquicefálicos com ceratite pigmentar, porém, referem que a manifestação da LSCD em Pugs pode ocorrer de maneira diferenciada, necessitando-se assim de estudos em torno do assunto.

Em estudo preliminar utilizando o transplante de células epiteliais limbais, para tratamento da opacidade corneana das ceratites pigmentar e lipídica, apresentaram-se resultados interessantes onde houve melhora discreta na transparência corneana, embora com um tamanho amostral de apenas três pacientes. (Montilha et al., 2016).

Visando a possibilidade de prolongar a visão de cães acometidos pela PK, promover conforto e uma superfície corneana mais hígida, o objetivo foi avaliar, de maneira inédita, a eficiência do transplante limbal como tratamento de eleição para a ceratite pigmentar em cães. Além disso, investigar se há associação da deficiência de células epiteliais limbais na patogenia da ceratite pigmentar por meio das avaliações citológica, em busca de células califormes, e histopatológica dessas células.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia do limbo e fisiologia das células-tronco limbais

Da junção entre os epitélios da córnea e da conjuntiva se forma o limbo (Buskirk, 1989; Davanger e Evenson, 1971). Ou seja, trata-se de uma área de transição entre a córnea transparente e a esclera (Buskirk, 1989). As células-tronco limbais (CTLs) são células adultas que possuem diferenciação ainda maior no epitélio da córnea (Le et al., 2018). A funcionalidade dessas células-tronco é essencial para manutenção da integridade da superfície corneana e da sua transparência. Desse modo, o limbo e as CTLs saudáveis atuam como barreira contra a invasão de células epiteliais conjuntivais na córnea (Le et al., 2018; Ramos et al., 2015; Joe e Yeung, 2014).

Encontram-se as CTLs na camada basal do epitélio dentro da região limbal (Le et al., 2018; Yeung e Joe, 2014; Ordonez e Di Girolamo, 2012; Pellegrini et al., 1999; Ebato et al., 1988). A estrutura limbal denominada paliçadas de Vogt é responsável por abrigar uma alta densidade dessas células, além de propiciar um microambiente ideal para a sobrevivência, funcionalidade das CTLs e manutenção estrutural das células (Le et al., 2018; Yeung e Joe, 2014; Ordonez e Di Girolamo, 2012). Em humanos, encontram-se as células-tronco também nas criptas epiteliais limbais e fossas epiteliais limbais (Di Girolamo, 2015).

Nos cães, o epitélio límbico é composto por três camadas: células escamosas estratificadas não queratinizadas superficiais, células alares intermediárias paralelas à camada superficial e células basais perpendiculares à camada superficial. Seu epitélio límbico é organizado em 5 a 8 fileiras de células. A camada basal é composta por células arredondadas, também chamadas de isoprismáticas, que não formam uma camada colunar típica em outras espécies. Ao invés de criptas, conforme Figura 1, o cão apresenta uma invaginação do epitélio, mas não criptas reais (Patruno et al., 2017).

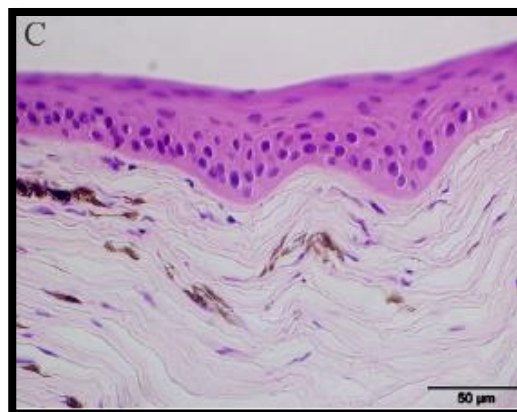


Figura 1. Epitélio limbal e estroma conectivo de cão apresentando invaginação do epitélio, criptas não reais (Patruno et al., 2017).

2.2. Cães braquicefálicos e particularidades

A conformação craniana leva à síndrome ocular braquicefálica. Essa última consiste na combinação de qualquer das seguintes alterações como o entrópio de canto medial, exoftalmia por órbita rasa, macrobléfaro, lagofthalmia, triquíase de carúncula, intertrigo facial, ceratite pigmentar, epífora e cromodacriorreia (Maggs, 2008).

A prevalência de enfermidades oftálmicas foi investigada em sete diferentes raças braquicefálicas. Observou-se diferença estatística em relação a proporção das populações estudadas, em que 34,3% (333/970) eram Shih Tzus, seguidos de 20,8% (202/970) Pugs. Além disso, o Shih Tzu também foi a raça mais prevalente em afecções oftálmicas como as ceratites ulcerativas, ceratite pigmentar e ceratoconjuntivite seca (Palmer et al., 2021).

2.3. Deficiência limbal em cães

Em humanos, a deficiência de células limbais pode ser desencadeada por infecção microbiana, isso inclui a ceratite herpética (Hatch e Dana, 2009). Do mesmo modo, Ledbetter et al. (2012), observaram deficiência de células epiteliais corneais limbais em cão após resolução de ceratite herpética, confirmada pela detecção de células caliciformes na superfície corneana. Além disso, simultaneamente, desenvolveu-se ceratite neurotrófica por consequência da ceratite herpética, a qual a depleção sensorial da córnea pode contribuir

diretamente para a deficiência de CTLs, visto que induz ambiente estromal inadequado para a funcionalidade, proliferação e sobrevivência das células-tronco (Cavanagh e Colley, 1989; Puangsricharern e Tseng, 1995, Ledbetter et al., 2012). Nesse caso, foram observadas alterações em regiões do epitélio corneano, onde o tecido foi substituído por um epitélio desorganizado incluindo células caliciformes e células pigmentadas, um padrão típico do epitélio conjuntival (Ledbetter et al., 2012). Dentre os sinais clínicos apresentados por esse animal constavam opacificação superficial da córnea com aparência acinzentada, pigmentação multifocal com migração centrípeta e vascularização subepitelial que se estendeu até 50% de toda extensão corneana (Ledbetter et al., 2012). Além do herpes vírus canino tipo 1, acredita-se que nos cães, irritações crônicas e/ou condições imunomediadas como a ceratoconjuntivite seca, ceratite superficial crônica e a ceratite pigmentar possam se desenvolver ou serem originadas em partes pela LSCD (Sanchez e Daniels, 2015). Brunelli et al. (2006) induziram a deficiência limbal em cães experimentalmente e constataram o aparecimento de pigmentação corneana 30 dias após, sendo 61,1% dos animais de maneira leve e 11,1% dos cães na forma moderada. Os achados feitos por Brunelli et al. (2006) em seu estudo, reforçam a possibilidade de associação entre a pigmentação corneana e LSCD.

Sabe-se que cães e gatos braquicefálicos possuem quantidade inferior de troncos nervosos na córnea o que resulta em sensibilidade corneana diminuída (Blocker e Van Der Woerdt, 2001). Notam-se proliferações espontâneas, medianas a graves, de pigmentos corneais na ceratite pigmentar em Pugs, que normalmente é acompanhada de entrópio de canto medial acentuado e pode ser agravado por sensibilidade corneana reduzida e/ou pelo efeito produzido pelo diminuído número de troncos nervosos na córnea que alteram a saúde do microambiente para as células-tronco epiteliais corneanas (Sanchez e Daniels, 2015). Em humanos, o fator de crescimento nervoso foi descrito como essencial para a renovação das células-tronco e provavelmente um fator de crescimento com importantes funções regulatórias no nicho de células-tronco epiteliais limbais do limbo humano (Qi et al., 2008).

Especificamente na raça Pug, dois estudos nos Estados Unidos da América e um na Áustria, a raça apresentou taxas de prevalência de pigmentação corneana de 82,4, 71,8 e 70%, respectivamente (Labelle et al., 2013; Krecny et al., 2014, Vallone et al., 2016). Labelle e colaboradores (2013) descreveram que a PK em Pugs não está associada às doenças de deficiência lacrimal ou anormalidades de anexos oculares, diferentemente do que

é observado em outras raças. No entanto, a presença de comorbidades, como afecções palpebrais e baixa produção lacrimal, podem intensificar a gravidade da ceratite pigmentar nos Pugs que manifestam tais alterações (Labelle et al., 2013). Todavia, Maini et al. (2019) encontraram uma associação significativa da PK com a presença de entrópio de canto medial inferior e sua gravidade. A idade em que a raça manifesta pigmentos corneanos é significativamente menor em relação às outras raças, além de apresentarem um escore de severidade maior (Vallone et al., 2016). Foi observada alta prevalência da condição em Pugs de diferentes canis, com diferentes linhagens, o que sugere que possa existir uma base genética para o aparecimento da afecção na raça (Labelle et al., 2013). Além disso, Labelle et al. (2013) incluíram no estudo, a avaliação dos proprietários quanto a presença de visão ou não do animal, considerando que a PK progride podendo acometer toda a extensão corneana e, assim, resultando em dificuldade visual, o que afeta diretamente a qualidade de vida do indivíduo.

Os estudos envolvendo a PK em Pugs revelam também que existe relação a outros fatores, como o mencionado por Labelle et al. (2013), sugerindo que a presença de melanina na ceratite pigmentar dos Pugs pode ser por anormalidade funcional ou reduzido número de células-tronco ou melanócitos limbais. Além disso, como mencionado acima, Maini et al. (2019) afirmaram que o entrópio de canto medial inferior grave se associa com o agravamento da ceratite pigmentar nesses cães, por esta razão a correção da patologia palpebral pode resultar em um efeito positivo na saúde da córnea desses cães.

2.4 Deficiência de células epiteliais corneais limbais

Para ocorrência da LSCD, considera-se a hipótese XYZ, onde X corresponde à proliferação de células basais aliada à Y, proliferação e migração centrípeta de células limbais, que resultam em Z, perda de células epiteliais da superfície (Daniels et al., 2001; Dua et al., 2005). Descreve-se em humanos que quando a área do limbo é danificada pode ocorrer migração de células caliciformes da conjuntiva para o estroma corneano, acarretando em conjuntivalização. Além disso, outros sinais podem ser manifestados, como a neovascularização corneana, ceratite crônica, presença de defeitos epiteliais persistentes,

blefarospasmo, edema corneano, secreção ocular e perda da transparência da córnea (Puangsricharern e Tseng, 1995; Daniels et al., 2001).

Em humanos, as LSCDs podem ser classificadas conforme o agente causal (categoria I), que engloba a perda de células-tronco (CTs) epiteliais por destruição abrupta, ou por exaustão funcional de CTs (categoria II). Nota-se na categoria I, casos onde há evidência clínica de destruição limbal, observados em queimaduras químicas e ceratites infecciosas graves. Já na categoria II, são descritas ceratites interligadas às deficiências endócrinas e em irritações crônicas (Puangsricharern e Tseng, 1995).

2.5 Condutas para o tratamento LSCD

As condutas descritas na Veterinária incluem desbridamento com transplantação de enxerto conjuntival limbal, transplante de membrana amniótica de cães e crioterapia (Azoulay, 2013, Attallah et al., 2016), porém ainda de maneira vaga, visto que, os estudos na Veterinária são limitados e ainda faltam diretrizes. Na Medicina humana, utiliza-se também de transplante limbal autógeno e alógeno, transplante de membrana amniótica, uso de terapia celular e expansão “ex-vivo” de células epiteliais limbais (Attallah et al., 2016).

2.6 Transplante de células limbais

Considerando-se que a LSCD pode ser parcial ou total, unilateral ou bilateral, ao se deparar com casos unilaterais, é importante avaliação adequada do olho adelfo, visto que uma lesão bilateral pode passar despercebida, fato que culmina em implicações consideráveis no uso do olho “saudável” como leito doador de transplante autolimbal (Dua et al., 2010).

Dentre as vantagens de se utilizar transplante autolimbal e de doador vivo, é que ambos oferecem tecido fresco e, considerando novas diretrizes de coleta, o risco de complicações em longo prazo no local doador é baixo (Ivekovic et al., 2005; Dua et al., 2010).

Na seleção do paciente receptor do transplante, deve ser realizada inspeção com exame completo dos olhos. Quanto às pálpebras, posição, movimento ao piscar, anatomia da margem, presença de triquíase e lagofthalmia. Quanto ao sistema lacrimal, teste lacrimal de Schirmer (TLS), tempo de ruptura do filme lacrimal (TRL), presença de opacidade ou

desvitalização corneana que evidenciem olho seco. No caso de pacientes com olho seco, o transplante é contraindicado em humanos nos casos graves, visto que o tecido vivo não sobrevive nesse tipo de ambiente. Considerar a espessura do tecido fibrovascular na córnea, principalmente no estroma corneano. A avaliação da pressão intraocular (PIO) pode ser dificultosa pela desorganização da superfície ocular acometida. Por fim, uma análise completa do paciente, considerando a possível imunossupressão necessária no pós-operatório (Dua et al., 2010).

O sucesso do transplante se relaciona com a transparência da superfície ocular e com o alívio dos sinais clínicos do paciente, incluindo vermelhidão, desconforto, cegueira, secreção (Dua et al., 2010). Brunelli et al. (2007) descreveram sucesso no transplante limbal autólogo em cães na restauração da transparência corneana, sem complicações em cães com destruição limbal induzida.

Lesões induzidas por álcali em humanos e animais originam deficiência de células-tronco limbal de origem secundária (Ozgencil et al., 2014). Brito et al. (2010), utilizaram o transplante limbal autólogo para tratamento de uma úlcera induzida por álcali em um cão e obtiveram bons resultados na estabilidade da superfície ocular, não apresentando ulcerações e sem conjuntivalização corneana.

Na Medicina, são descritas diferentes abordagens nas técnicas de transplante limbal para o tratamento de deficiência de células limbais. Dentre as opções de transplante autólogo estão o transplante epitelial limbal simples (SLET), o autoenxerto limbal conjuntival (CLAU) e o transplante epitelial limbal cultivado (CLET) (Kenyon and Tseng, 1989; Pellegrine et al. 1997). Já os transplantes alógenos incluem o SLET alógeno, LR-CLAL (*Living-Related Conjunctival Limbal Allograft*) e o aloenxerto ceratolímbico (KLAL) (Moshifar et al., 2022).

Dentre as técnicas abordadas acima, a SLET possui resultados satisfatórios (Moshifar et al., 2022). No entanto, alguns fatores de risco são descritos para corroborar com sua falha, como queimaduras químicas, simbléfaro antes e simultâneo ao procedimento e a ceratoplastia penetrante. Descreve-se uma maior ocorrência de falha nos primeiros seis meses pós-cirúrgico (Moshifar et al., 2022). Quanto às complicações, a mais frequente seria a recorrência dos sinais e, conseqüentemente, da LSCD no olho tratado. Constatou-se também hemorragia sob a membrana amniótica, ceratite infecciosa, conjuntivalização progressiva, simbléfaro e perda do tecido doador (Yin, 2018; Moshifar et al., 2022).

Quando se refere aos transplantes alogênicos em humanos, são descritas terapias imunossupressoras associadas ao tratamento cirúrgico, via oral ou intravenosa, incluindo o uso de corticosteroides e imunomoduladores como a ciclosporina (Serna-Ojeda et al., 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações quanto à ética

As exigências quanto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal (protocolo número: 4330/20) foram atendidas e sob a concessão dos proprietários dos pacientes admitidos na pesquisa. Outrossim, sob as normas internacionais da “Association for Research in Vision and Ophthalmology” – ARVO (Nacional Institutes of Health Publication No 85-23: Revised 1985), conforme o código de NÜREMBERG (Goldin, 1995).

Foram utilizadas 6 unidades oculares de cães (*Canis familiares* – Linnaeus, 1758), sendo destes 3 machos, 2 da raça Pug e 1 da raça Shih Tzu, apresentando melanose corneana intensa, afetando a capacidade visual e qualidade de vida do paciente. Todos foram referidos ao Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Todos os pacientes passaram por exame oftálmico, sempre pelo mesmo avaliador, baseado nos testes dos reflexos de ameaça e pupilares, no teste lacrimal de Schirmer¹, na biomicroscopia com lâmpada em fenda², na tonometria de rebote³, oftalmoscopia indireta⁴ – quando possível de avaliação e, no teste de tingimento pela fluoresceína sódica⁵. Para avaliação das condições clínicas sistêmicas, realizou-se exame físico, hemograma e avaliação das funções hepática e renal por meio da análise de sangue. Os proprietários estavam cientes de todos os procedimentos e assinaram um termo de compromisso (Anexo I).

¹ Teste Lacrimal de Schirmer, Drogavet, Ribeirão Preto, Brasil

² Lâmpada de fenda portátil SL-15, Kowa, Tokyo, Japão

³ Tonovet Plus – icare, Finlândia

⁴ Oftalmoscópio binocular indireto OHC, Eye Tec, São Carlos, Brasil

⁵ Fluoresceína strips, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

3.2. Grupos e protocolos experimentais

Todos os pacientes selecionados passaram pelo procedimento de ceratectomia e a córnea removida foi enviada para análise citológica e histopatológica. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião e mesmo anestesista, a fim de limitar variações. Estes olhos foram divididos em dois grupos: Grupo transplante (GT) (n=3), os quais receberam explante de limbo no ato contínuo a retirada da pigmentação e membrana amniótica, e o Grupo controle (GC) (n=3), que recebeu apenas a membrana amniótica, sendo o GC o olho adelfo de cada olho transplantado no intuito de minimizar vieses individuais. A variável do tamanho amostral foi determinada por pesquisadores do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, a partir de estudos prévios. Porém, devido ao período vivido de pandemia mundial, dificuldades no número amostral foram encontradas com visto que houve desistência por parte de tutores, pela dificuldade em seguir os protocolos de retornos exigidos no experimento, bem como longo período de *lockdown* estabelecidos para toda a cidade do hospital veterinário. Como a afecção não se enquadrava como urgência ou emergência, o atendimento dentro do hospital veterinário de enfermidades como a ceratite pigmentar nesse período foi vedado. Desse modo, houve também dificuldades em recuperar o número amostral proposto inicialmente.

3.2.1. Obtenção de explantes de limbo

Três explantes de limbo medindo aproximadamente 3 mm (Figura 2) de comprimento foram removidos de 3 olhos de cães diferentes, 2 machos e 1 fêmea, referidos ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/Unesp, câmpus de Jaboticabal para castração eletiva. Foi conversado com os tutores sobre a participação no estudo e os benefícios que poderiam ser oferecidos aos animais receptores do transplante. Os animais inclusos no estudo para função de doação de limbo encontravam-se em condição oftálmica de higidez, os quais foram avaliados previamente ao procedimento. A coleta e o transplante foram realizados em um intervalo máximo de 6 horas, sendo que o tecido foi mantido em solução salina balanceada, a fim de não causar danos as células a serem transplantadas. (Jain et al., 2014; Sangwan et al., 2012;). A superfície ocular do olho doador não apresentou

nenhuma intercorrência durante a cicatrização do leito doador e foi acompanhado até o total conforto do paciente. O doador fez uso após coleta de tobramicina tópica, uma gota a cada 8 horas durante 5 dias.



Figura 2. Sob anestesia geral, foi realizada coleta de tecido do limbo do paciente doador. A. Delimitação de 3 mm do explante de limbo com régua estéril Viscot Medical LLC. B. Região delimitada com caneta marcadora estéril Viscot Medical LLC na região dorsal da circunferência perilimbal. Jaboticabal, 2021.

3.3. Procedimentos

3.3.1. Avaliação pré-cirúrgica

Previamente à ceratectomia, a superfície corneana foi fotografada ⁶e, a partir destas imagens, os percentuais da área que apresentava melanose foram calculados com auxílio do *software* ImageJ⁷ (Figura 3) onde toda área da córnea foi selecionada com o modo circular e, após, a área com pigmento foi selecionada no modo *freehands*. Finalizada definição de ambas áreas o percentual de pigmento em córnea foi calculado em regra de 3 (Kobashigawa et al., 2018). Foram coletadas amostras citológicas de impressão da superfície corneana para pesquisa de células calciformes (Ozgencil et al., 2017; Le et al., 2018).

⁶ Retinógrafo, Topcon, Tokyo, Japan

⁷ <http://imagej.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, Bethesda, MD, US

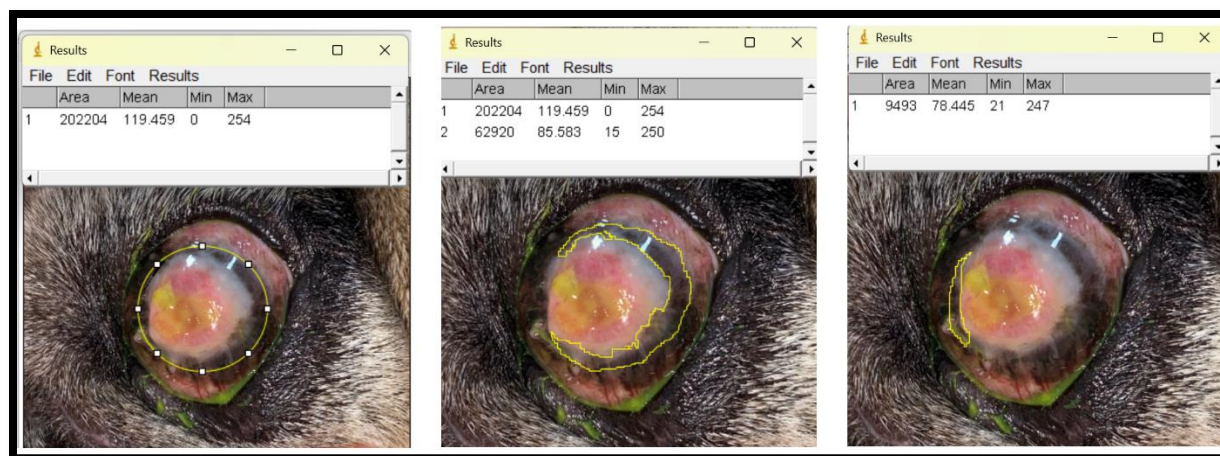


Figura 3. Demonstração da seleção da área acometida pelo pigmento onde, primeiramente foi delimitada área total de córnea e depois área contendo pigmento.

3.3.2. Confeção das lâminas para avaliação citológica

Previamente ao procedimento cirúrgico, foi instilado colírio anestésico⁸ com o animal acordado. Realizou-se coleta de material para avaliação citológica pelo método de *imprint* corneano (Figura 4), diretamente na lâmina de vidro, posteriormente fixado ao ar. Em seguida, colocado em etanol 95% durante 5 minutos e então lavado em água destilada. As células foram incubadas com solução 0,5% de ácido periódico por 10 minutos, enxaguadas com água da torneira, corado com reagente de Schiff (proporção 1:1) por 10 minutos, seguido de enxágue em água. Por fim, contracorou-se com solução de hematoxilina por 30 segundos e o material foi lavado com água corrente por 5 minutos, após com água destilada. Em seguida, foram montadas com as células voltadas para cima com lamínulas e resina sintética⁹. A avaliação teve como propósito avaliar as células encontradas no *imprint* em busca de células caliciformes.

⁸ Anestésico Allergan Inc, São Paulo, Brasil

⁹ Entellan R, Merck, São Paulo, Brasil.

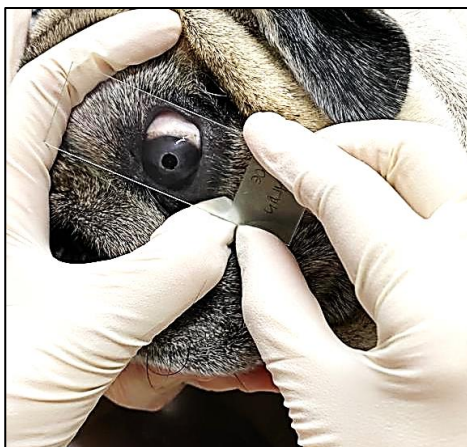


Figura 4. Imagem fotográfica do momento da realização do *Imprint* corneal diretamente sobre lâmina de vidro, ato contínuo à instilação de colírio anestésico em olho esquerdo de cão macho da raça Pug, para avaliação citológica. Jaboticabal, 2021.

3.3.3. Cirurgia dos anexos

Os pacientes com alterações nos anexos como entrópio de canto medial, macrobléfaro, intertrigo facial, distiquíases ou cílios ectópicos passaram por correção cirúrgica das alterações no mesmo procedimento do transplante limbal. Em todos os cães foi realizada cantoplastia medial via técnica de MMC modificada. Nos Pugs também foi feita a diminuição da prega nasal. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião.

3.3.4. Coleta e processamento das córneas

Após anestesia geral inalatória, tricotomia e antissepsia, a superfície corneana apresentando pigmento foi excisada sob a magnificação de um microscópio cirúrgico (ie. ceratectomia), ato realizado com divisão da superfície corneana em quatro quadrantes (Figura 5). A amostra passou por análise histopatológica, quanto à morfologia e disposição celular. Células epiteliais corneanas diferenciadas e conjuntivais como células caliciformes foram pesquisadas utilizando técnica citológica.



Figura 5. Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico de ceratectomia para excisão de melanose corneana. A. Divisão da superfície corneal em quadrantes. B. Ceratectomia lamelar do primeiro quadrante. C. Pós operatório imediato da ceratectomia lamelar total da superfície. Jaboticabal, 2021.

3.3.4.1. Confecção das lâminas para avaliação histopatológica

Após a cirurgia, os quatro quadrantes da córnea foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% para posterior análise macroscópica e microscópica. Posteriormente, as córneas foram processadas por um histopatologista externo à faculdade onde o estudo foi realizado. Seções de 4 μm de espessura foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Luna, 1968) e, posteriormente, examinadas sob um microscópio de luz padrão para identificar a células que constituem a córnea com ceratite pigmentar.

3.3.5. Transplante limbal

A técnica de transplante utilizada foi a SLET alógena (Sangwan et al., 2012). Uma ceratectomia 360° foi realizada na córnea do olho doente com divisão da mesma em quatro quadrantes conforme descrito no item 3.3.4.

Uma membrana amniótica, oriunda de placenta canina armazenada em glicerina por por 30 dias mínimos foi posicionada com o lado estromal para baixo e o lado epitelial para o meio externo. Esta cobriu toda extensão da córnea e aproximadamente 2 mm da esclera para ser fixada abaixo da borda conjuntival (Figura 6C). Desse modo, foi estendida com instrumental cirúrgico e suturada na conjuntiva com nylon 9-0. Com uma tesoura Vannas o

enxerto limbal foi seccionado em 10 pedaços de tamanhos iguais (Figura 6A). Os explantes foram então alocados entre a membrana e a córnea (Figura 6B). Realizou-se flap de 3ª pálpebra no GT e mantido por 7 dias, para evitar a perda precoce do transplante.

O tratamento pós cirúrgico para ambos os olhos incluiu hialuronato de sódio 0,15% tópico a cada 8 horas até o final do experimento, EDTA 0,35% tópico a cada 2 horas durante 5 dias e após a cada 4 horas até total cicatrização da lesão ulcerativa, tobramicina tópica QID (*qualque in die*) até total cicatrização da úlcera, ciclosporina 1% tópica BID (*bis in die*) uso contínuo. Dipirona dose de 25mg/Kg via oral (VO) TID (*ter in die*) durante 5 dias, meloxicam dose 0,1 mg/Kg VO SID (*semel in die*) durante 3 dias e cloridrato de tramadol 4mg/Kg durante 5 dias. Para as cirurgias dos anexos, foi prescrito pomada de acetato de retinol 10.000UI/g + aminoácidos 25mg/g + metionina 5mg/g + cloranfenicol 5mg/g BID durante 12 dias.

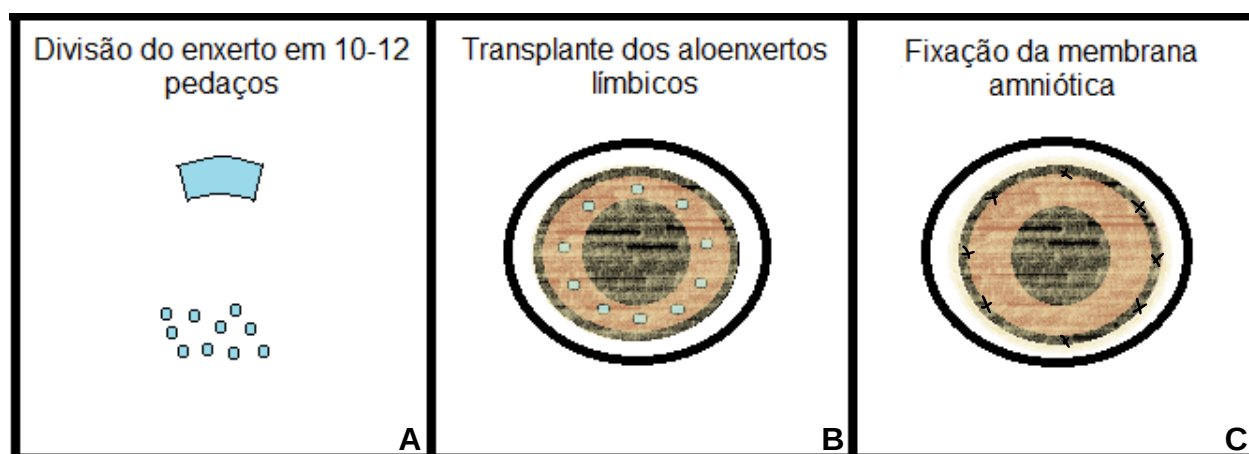


Figura 6. Esquema representativo da técnica de transplante limbal alógeno. A. Divisão do enxerto limbal em 10 a 12 pedaços iguais. B. Colocação dos aloenxertos na córnea transplantada abaixo da membrana amniótica e C. Posterior sutura da membrana amniótica com o lado estromal para baixo.

3.3.6. Avaliação pós-transplante

Os olhos foram avaliados nos dias 0, 14, 28 e 70 após o transplante. Sinais de edema corneano, de blefarospasmo, de secreção ocular, de tecido de granulação e de hiperemia conjuntival foram qualiquantificados sempre pelo mesmo avaliador em (0) ausentes, (1) discretos, (2) moderados e (3) severos.

A transparência corneana foi classificada em (0) córnea totalmente transparente, (1) opacidade discreta que permitiu avaliação detalhada da íris, (2) opacidade moderada, onde a observação da íris foi dificultada; (3) opacidade severa, impedindo a percepção do contorno pupilar (Andrade et al., 2009; Selver et al., 2016).

3.4. Descrição Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas por um cientista de dados no software R com o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio¹⁰. As funções e os pacotes utilizados foram apresentados no formato ‘pacote::função’ correspondente à linguagem de programação em R. Para todos os testes foi considerada significância de 5%. Para ser inclusivo todas as figuras foram construídas com paleta de cores distinguíveis a pessoas daltônicas (ggplot2::scale_colour_viridis_d). As análises estatísticas foram conduzidas em duas etapas, uma exploratória e outra inferencial.

Primeiramente, foi feita uma estatística multivariada para explorar a associação múltipla entre as variáveis conduzida por uma análise de componentes principais (ACP; ‘stats::princomp’). O número ótimo de componentes principais (CPs) a serem retidos na ACP foi determinado pela análise paralela de Horn (‘psych::fa.parallel’) (Preacher e MacCallum, 2003). Como critério para determinar associação entre cada variável e o CP foram usados os valores de carga (λ) maiores que 0,40 ou menores que -0,40 (Hair et al., 2014). Para ilustrar tais resultados foram feitos dois *biplots* colorindo os indivíduos de acordo com os grupos e com os tempos perioperatórios para uma análise qualitativa (julgamento visual) de sua distribuição.

Posteriormente, realizou-se uma estatística inferencial para identificar diferenças entre os grupos (controle vs transplantado) e ao longo do perioperatório (pré-operatório vs 14 d pós-operatório vs 28 d pós-operatório vs 70 d pós-operatório). Para tanto foram conduzidos modelos lineares multinível (lme4::lmer) para aquelas variáveis (melanose e edema corneano) que apresentaram aderência dos resíduos à normalidade pelo teste de Cramer-Von Mises (nortest::cvm.test), ou modelos lineares generalizados multinível (lme4::glmer) quando esta pressuposição não foi atendida (blefarospasmo, secreção

¹⁰ RStudio Version 4.1.0 (2021-06-29), RStudio, Inc.

ocular, tecido de granulação, transparência corneana e hiperemia). Para todos os modelos a interação de tempos perioperatórios com grupos foi usada como efeito fixo, bem como os cães foram usados como efeitos aleatórios. A comparação múltipla de grupos e tempos perioperatórios no *posthoc test* foi conduzida com o procedimento de Bonferroni (lsmeans::lsmeans e multcomp::cld) (Michael et al., 2004). Os resultados foram ilustrados com gráficos de caixa (ggplot2::ggplot e ggplot2::geom_boxplot).

4. RESULTADOS

4.1. Animais selecionados

Os animais enquadrados no estudo manifestavam ceratite pigmentar grave, acometendo a córnea em área superior a 60% da superfície, ressaltando-se que estes pacientes apresentavam dificuldade visual devido à essa alteração. Os cães da raça Pug tiveram porcentagem de melanose superior à 93%, bilateralmente. O indivíduo Shih Tzu apresentava 61,1% no olho esquerdo e 74,7% no olho direito.

Os três cães manifestavam hiperemia conjuntival severa no primeiro atendimento, secreção mucopurulenta, edema corneano, neovascularização e pigmentação corneana difusa. Ambos os Pugs apresentavam dificuldade visual que interferia na locomoção do animal, cujos proprietários descreviam como completamente cegos. O Shih Tzu apresentava histórico de trombar em objetos esporadicamente. A ceratite pigmentar se apresentou bilateralmente em todos os pacientes.

Um dos Pugs apresentava prega nasal exuberante e após passar por dieta com o setor de Nutrição clínica do mesmo hospital veterinário houve discreta redução do volume da prega nasal.

Na Figura 7 é apresentada evolução fotográfica dos olhos de um dos Pugs tanto o olho controle quanto transplantado dos dias 0 a 70 pós cirúrgico.

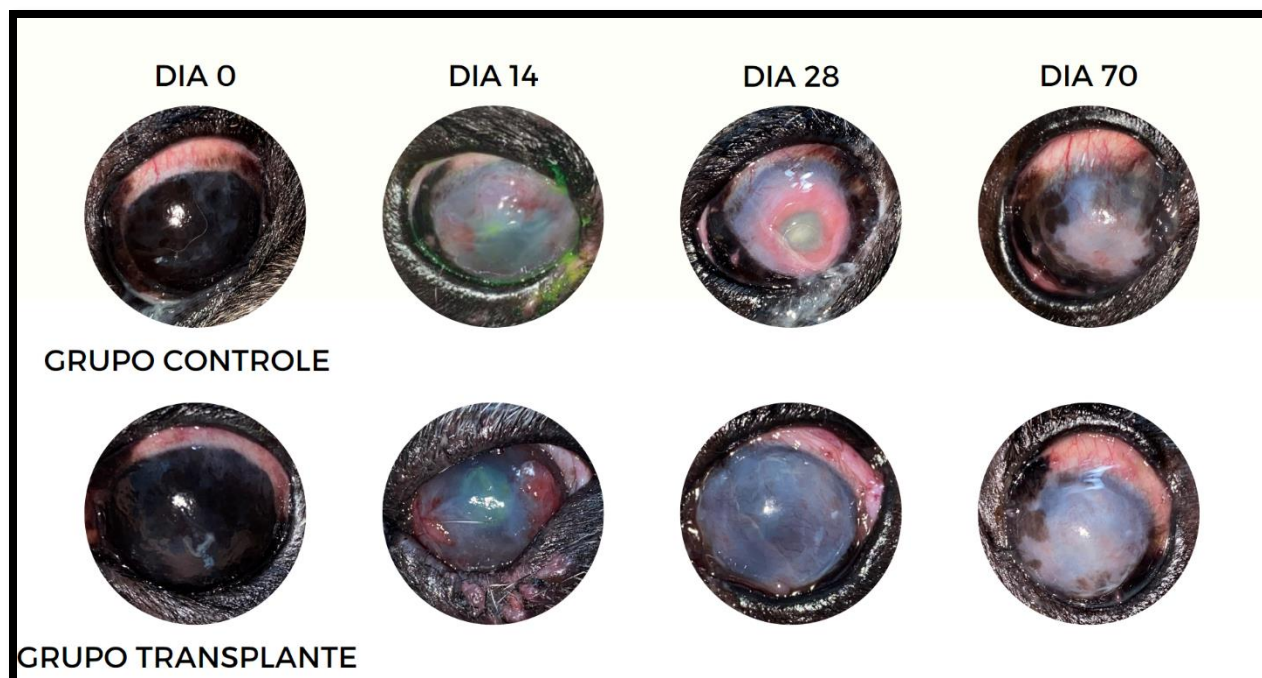


Figura 7. Evolução fotográfica de um cão macho da raça Pug, comparando o olho controle (grupo controle) ao olho transplantado (grupo transplante) dos dias 0, 14, 28 e 70 pós cirúrgico.

4.2. Análises Exploratórias

A análise paralela de Horn indicou a retenção dos dois primeiros CP de um total de 7 CP gerados pela ACP. O CP1 e CP2 juntos explicaram 62% da variação total dos dados (Tabela 1). No CP1, melanose e secreção ocular mostraram uma associação positiva [valores de carga (λ) $>0,40$] com o CP1, enquanto edema corneano e blefarospasmo mostraram associação negativa ($\lambda <-0,40$) com o CP1. Portanto, o conjunto de variáveis associadas positivamente com o CP1 apresentaram uma dinâmica semelhante entre si (todas aumentam ou diminuem concomitantemente) e apresentam um comportamento inverso daquelas associadas negativamente com o CP1. Desta forma, a diminuição de melanose e de secreção ocular ocorreu concomitantemente com o aumento de edema corneano e de blefarospasmo, considerando todos os momentos e grupos. A melanose mostrou o λ (0,93) mais distante de zero no CP1, que pode ser interpretado como a variável com maior variação (importância) no CP1. Pelo CP2, foi possível observar que o edema corneano e hiperemia mostraram uma associação

positiva com o CP2. Assim, o edema corneano e a hiperemia aumentam concomitantemente, levando em conta todos os momentos e grupos. Hiperemia foi o λ (0,86) mais distante de zero no CP2, que pode ser entendido como a variável com maior importância no CP2 devido a sua maior variação.

Tabela 1. Valores de carga, autovalores e variância da análise de componentes principais. (CP = componente principal; # representa o CP indicado a ser retido pela análise paralela de Horn; em negrito estão os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que -0,40 indicando associação da variável com o CP).

Variáveis	CP1#	CP2#	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
Melanose	0,95	0,01	0,08	0,10	0,11	0,09	0,25
Edema Corneano	-0,65	0,49	0,14	0,47	-0,26	-0,11	0,12
Blefarospasmo	-0,57	0,17	-0,74	-0,15	-0,04	0,26	0,09
Secreção Ocular	0,73	0,32	-0,29	-0,24	-0,47	-0,09	-0,03
Tecido de Granulação	-0,39	0,26	0,69	-0,51	-0,10	0,10	0,07
Transparência Corneana	0,37	0,82	0,20	0,24	0,05	0,25	-0,14
Hiperemia	-0,03	0,86	-0,23	-0,22	0,31	-0,23	0,03
Autovalor	2,47	1,86	1,23	0,69	0,41	0,23	0,11
Variância (%)	35,29	26,59	17,63	9,81	5,83	3,27	1,58
Variância acumulada (%)	35,29	61,88	79,51	89,32	95,15	98,42	100,00

A Figura 8 mostra o grupo controle e transplantado com cores diferentes. Os centróides de ambos os grupos estão representados pelos círculos maiores, e por um julgamento visual encontram-se próximos da origem (convergência entre o eixo y e x do gráfico) e parcialmente sobrepostos. O centróide indica o centro de massa dado pelo polígono formado com a interpolação dos círculos menores de uma mesma cor. Já na Figura 9 o centróide do pré-operatório está localizado no quadrante superior direito, enquanto o centróide de 14 e 28 dias de pós-operatório está em direção oposta (à esquerda) nos quadrantes inferior e superior respectivamente, e o centróide de 70 dias de pós-operatório encontra-se ao meio dos quadrantes inferiores. Tais achados sugerem que as variáveis analisadas pouco conseguiram distinguir os grupos, mas aparentemente conseguiram separar os tempos do perioperatório. Todavia, estes achados precisam ser confirmados com análises inferenciais.

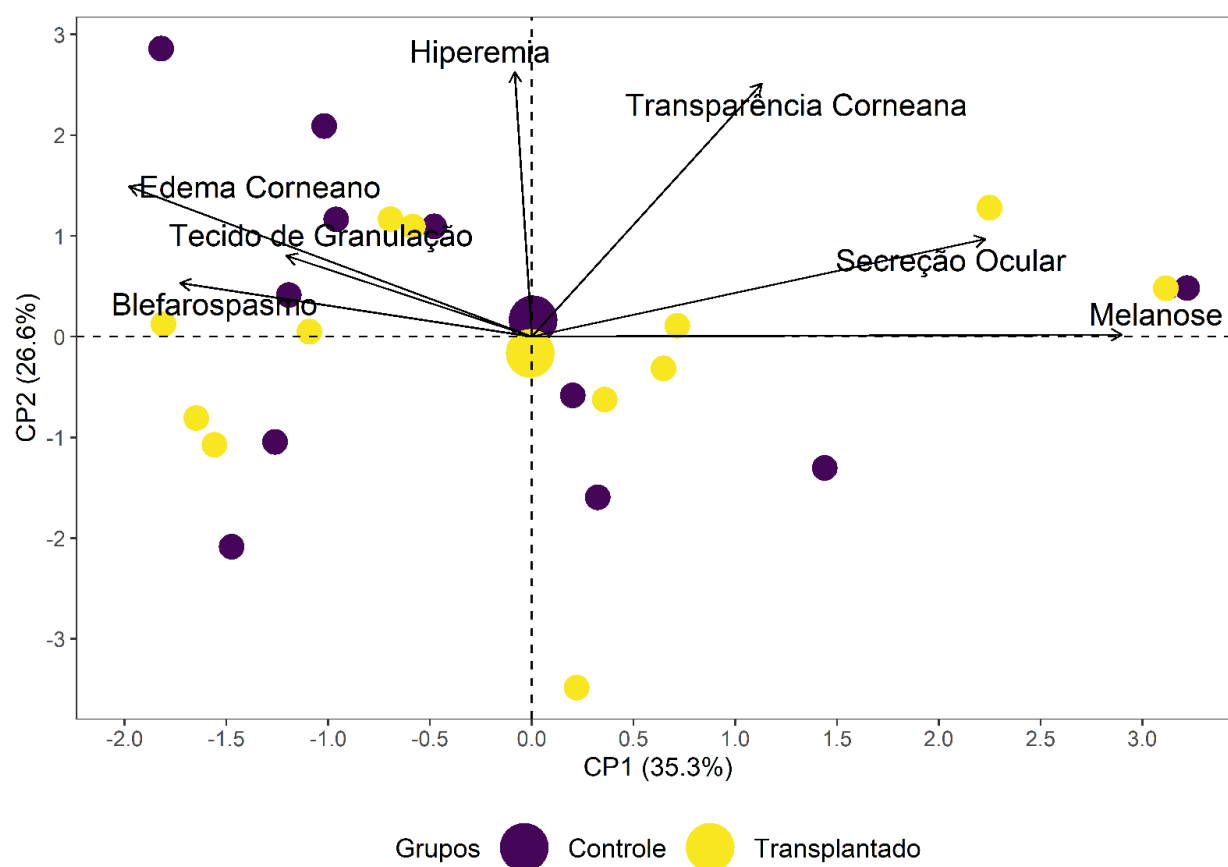


Figura 8. *Biplot* bidimensional da análise de componentes principais com as variáveis do estudo e os indivíduos separados por grupo. (Círculos menores indicam cada indivíduo e círculos maiores representam o centroide de cada grupo; centroide indica o centro de massa dado pelo polígono formado com a interpolação dos círculos menores de uma mesma cor; as setas indicam os vetores de cada uma das variáveis)

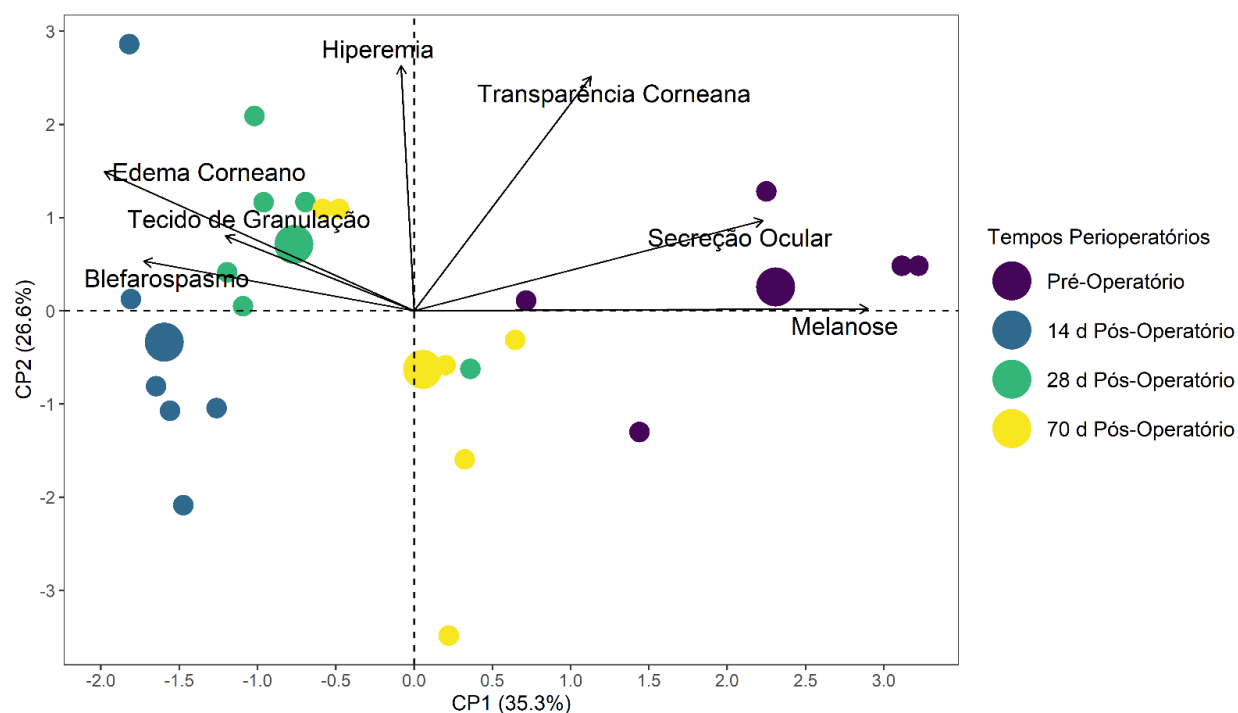


Figura 9. *Biplot* bidimensional da análise de componentes principais com as variáveis do estudo e os indivíduos separados por tempos no perioperatório. (Círculos menores indicam cada indivíduo e círculos maiores representam o centroide de cada grupo; centroide indica o centro de massa dado pelo polígono formado com a interpolação dos círculos menores de uma mesma cor; as setas indicam os vetores de cada uma das variáveis)

4.3. Análises Inferenciais

Para ambos os grupos, os maiores valores de melanose foram encontrados no tempo pré-operatório, sofrendo uma queda para até os menores valores em 14 dias de pós-operatório, e subindo para um valor intermediário em 70 dias de pós-operatório (Figura 10 e Tabela 2). No entanto, os animais do grupo transplantado mostraram uma elevação dos valores de melanose mais tardios, apenas com 70 dias de pós-operatório, enquanto os animais do grupo controle mostraram valores estatisticamente equivalentes nos tempos de 28 e 70 dias após a cirurgia. Todavia, não houve diferença entre os grupos em cada um dos tempos perioperatórios.

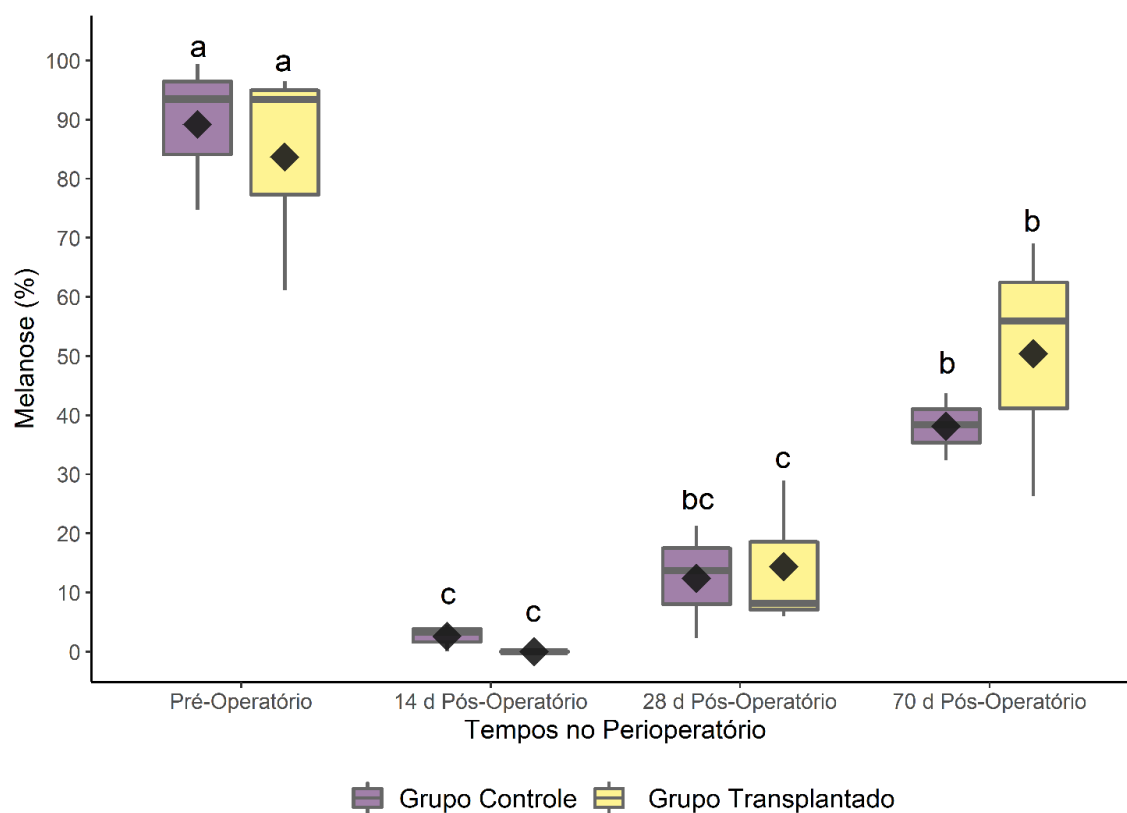


Figura 10. Gráfico de caixas da melanose (%) de cada grupo ao longo dos tempos no perioperatório.

[Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ao longo dos tempos perioperatórios em um mesmo grupo ($p < 0,05$), sendo que $a > b > c$; * indica diferença estatística significativa entre os grupos em um mesmo tempo perioperatório ($p < 0,05$); o losango indica a média]

Tabela 2. Média e desvio-padrão das variáveis do estudo de cada grupo ao longo dos tempos no perioperatório de cães [Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ao longo dos tempos perioperatórios em um mesmo grupo ($p<0,05$), sendo que $a>b>c$; * indica diferença estatística significativa entre os grupos em um mesmo tempo perioperatório ($p<0,05$)].

Variáveis	Grupos	Tempos Perioperatórios			
		Pré-Operatório	14 d Pós-Operatório	28 d Pós-Operatório	70 d Pós-Operatório
Melanose	Controle	89,19±12,91 _a	2,60±2,34 _c	12,43±9,58 _{bc}	38,14±5,70 _b
	Transplantado	83,66±19,59 _a	0,00±0,00 _c	14,39±12,70 _c	50,41±21,87 _b
Edema Corneano	Controle	0,33±0,58 _b	2,00±1,00 _{ab}	2,33±0,58 _a	1,67±1,15 _{ab}
	Transplantado	1,33±1,15	1,67±0,58	2,00±0,00	2,00±1,00
Blefarospasmo	Controle	0,00±0,00 _b	1,67±1,15 _a	0,67±1,15 _{ab}	0,00±0,00 _b
	Transplantado	0,00±0,00 _b	1,33±0,58 _a	0,00±0,00 _b	0,00±0,00 _b
Secreção Ocular	Controle	2,67±0,58	1,33±0,58	1,67±0,58	1,00±0,00
	Transplantado	2,67±0,58	1,00±0,00	1,67±1,15	1,00±0,00
Tecido de Granulação	Controle	0,00±0,00	0,33±0,58	1,67±1,53	0,00±0,00
	Transplantado	0,00±0,00	0,67±0,58	1,00±1,00	0,00±0,00
Transparência Corneana	Controle	2,67±0,58	2,00±1,00	2,67±0,58	2,33±0,58
	Transplantado	2,67±0,58	1,67±0,58	2,33±0,58	2,33±1,15
Hiperemia	Controle	1,67±0,58	1,67±1,15	2,00±0,00	1,67±0,58
	Transplantado	2,00±0,00	1,67±0,58	1,67±0,58	1,00±1,00

Para apenas o grupo controle, houve um aumento dos valores de edema corneano do tempo pré-operatório em relação ao tempo 28 dias de pós-operatório (Figura 11 e Tabela 2). Não houve diferença entre os tempos perioperatórios do grupo transplantado ou entre os dois grupos em cada um dos tempos.

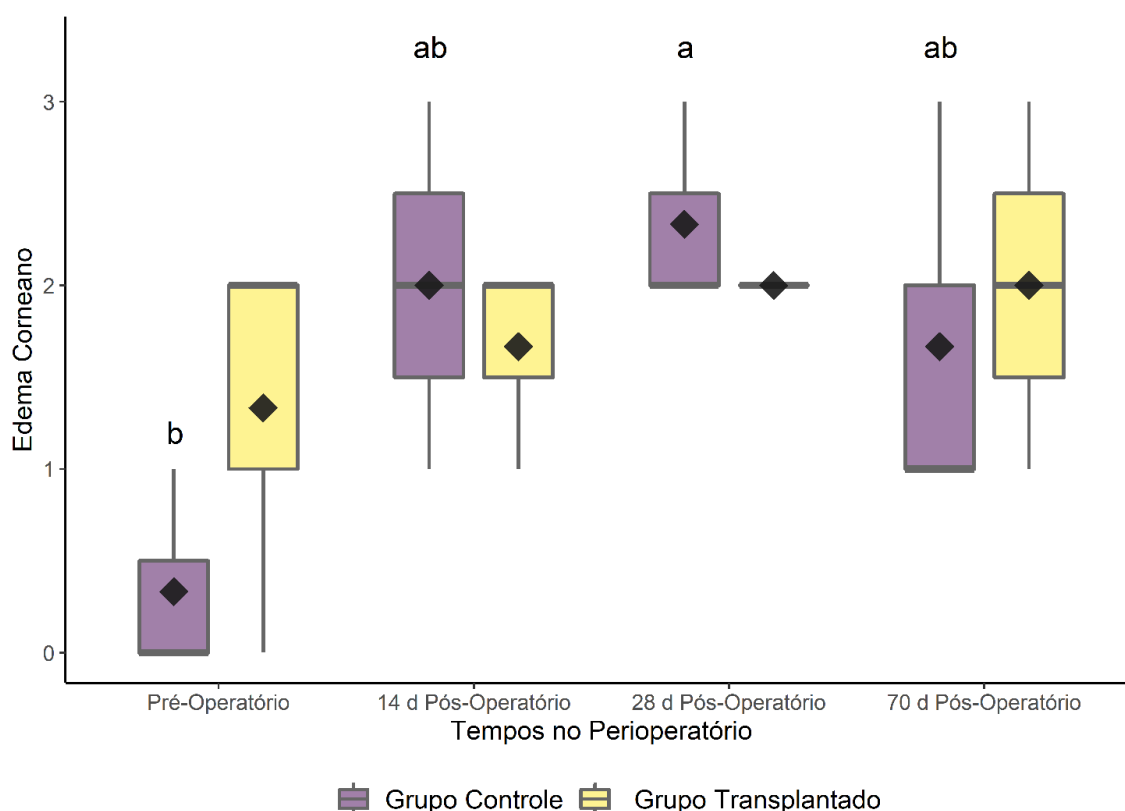


Figura 11. Gráfico de caixas do edema corneano de cada grupo ao longo dos tempos no perioperatório.

[Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ao longo dos tempos perioperatórios em um mesmo grupo ($p < 0,05$), sendo que $a > b > c$; * indica diferença estatística significativa entre os grupos em um mesmo tempo perioperatório ($p < 0,05$); a ausência de letras indica a não diferença estatística ($p < 0,05$); o losango indica a média]

Para o grupo controle, os valores de blefarospasmo encontrados 14 dias pós-operatório foram maiores que no pré-operatório e em 28 dias de pós-operatório, enquanto para o grupo transplantado os valores encontrados com 14 dias de pós-operatório foram superiores à todos os demais tempos perioperatórios (Figura 12 e Tabela 2). Tais achados indicam que os olhos transplantados reduziram o escore de blefarospasmo após 28 dias da cirurgia, enquanto os olhos do grupo controle mostraram essa redução após 70 dias da cirurgia. Apesar disso, não houve diferença entre os grupos em cada um dos tempos perioperatórios.

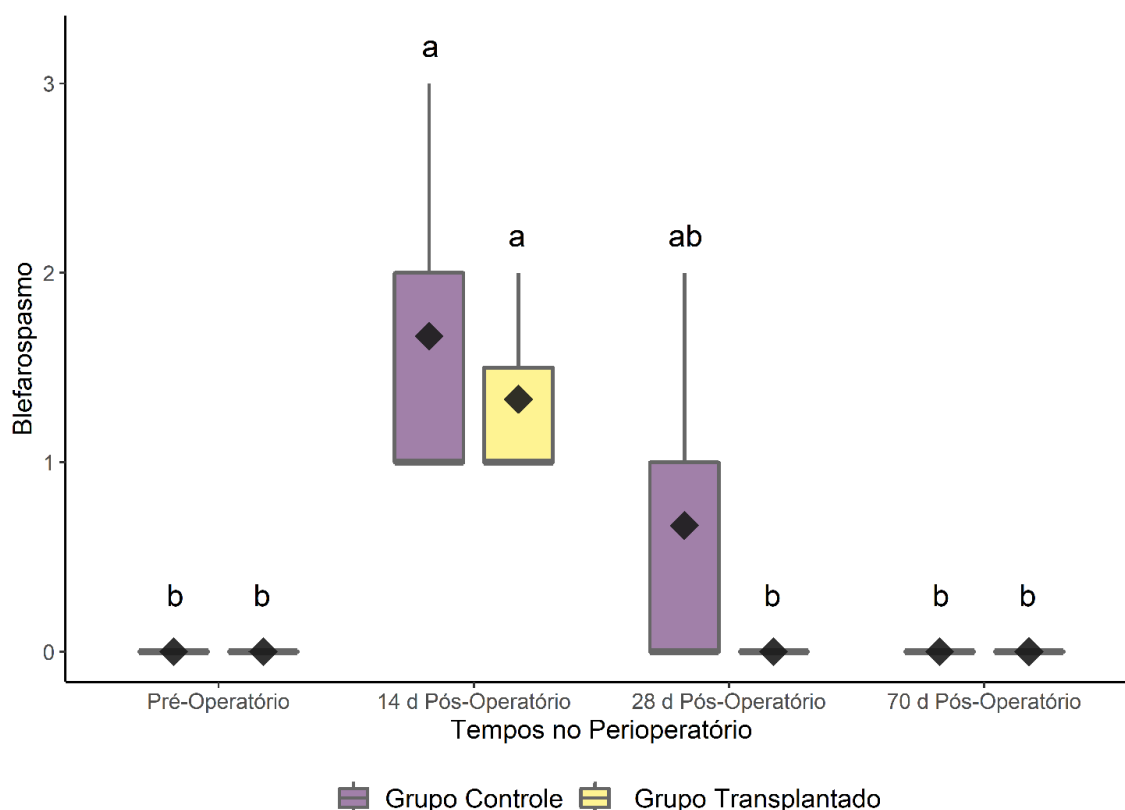


Figura 12. Gráfico de caixas do blefarospasmo de cada grupo ao longo dos tempos no perioperatório [Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ao longo dos tempos perioperatórios em um mesmo grupo ($p < 0,05$), sendo que $a > b > c$; * indica diferença estatística significativa entre os grupos em um mesmo tempo perioperatório ($p < 0,05$); o losango indica a média].

A secreção ocular, o tecido de granulação, a transparência corneana e a hiperemia mostraram valores estatisticamente equivalentes entre os tempos de perioperatório para cada grupo, bem como entre os dois grupos em cada um dos tempos (Tabela 2).

O paciente da raça Shih tzu apresentou complicação por ceratomalácea em um dos olhos e passou por cirurgia para correção da lesão por meio de enxerto pediculado conjuntival em córnea acometida.

4.4. Avaliação citológica

Na avaliação citológica foi identificada presença de célula caliciforme (Figura 13) em um dos indivíduos incluídos no estudo, sendo esta uma célula de região conjuntival, não presente em córnea em condições de normalidade. Constataram-se também células epiteliais nucleadas, por diversas vezes contendo pigmento de melanina e discreta granulação magenta intracitoplasmática. A presença de infiltrado inflamatório neutrofílico variou de discreto a moderado.

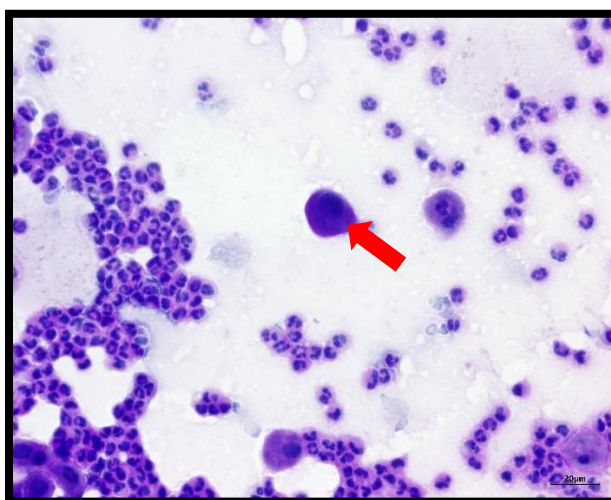


Figura 13. Imagem de avaliação citológica corneana de cão por *imprint* evidenciando célula caliciforme pela seta vermelha.

4.5. Avaliação histopatológica

Na avaliação por histopatologia, os fragmentos corneanos apresentaram hiperplasia regular difusa e moderada do epitélio. No citoplasma dos queratinócitos, predominantemente do estrato basal, há pigmento de melanina multifocal moderado. Nota-se no epitélio superficial e médio, vascularização e edema multifocal moderado (Figura 14). Quanto ao estroma superficial, na amostra do indivíduo 1 (Figura 14A), identificou-se melanócitos intensamente pigmentados multifocal moderado. A amostra do animal 2 (Figura 14B e C), difuso e intenso.

Ademais, a córnea do animal 3 (Figura 14D), pigmentação intensa principalmente na periferia do fragmento no estroma superficial.

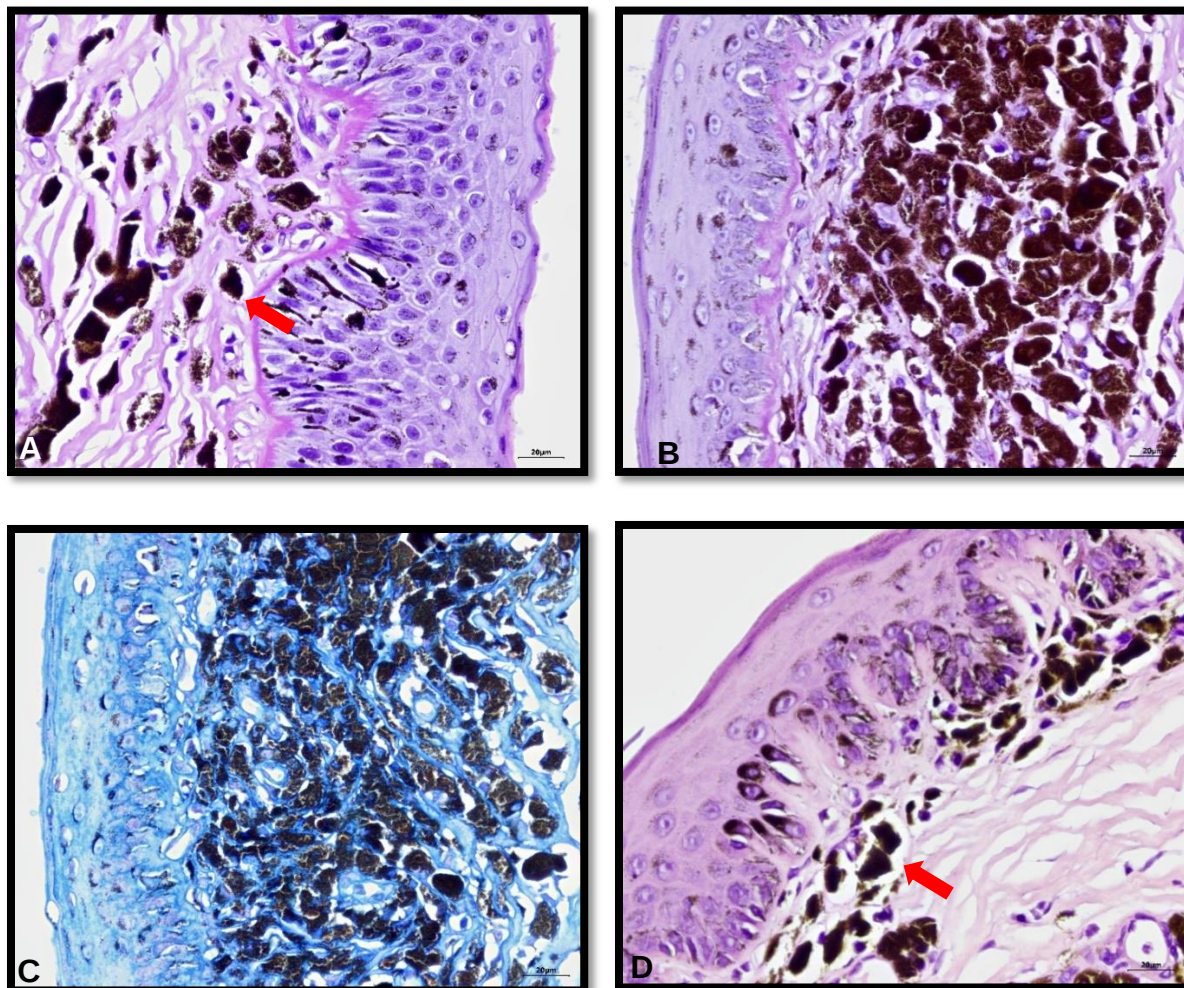


Figura 14. Imagens microscópicas histopatológicas, aumento de 400x. A. Indivíduo 1, seta vermelha indica melanócitos no estroma superficial. B. Indivíduo 2 apresentando melanócitos pigmentados de maneira difusa e intensa no estroma superficial. C. Coloração de Alcian Blue em corte histológico do indivíduo 2. D. Indivíduo 3, seta vermelha indica melanócitos no estroma superficial.

5. DISCUSSÃO

Quanto à seleção da técnica empregada nos pacientes, recomenda-se o transplante autólogo devido às menores complicações no pós-transplante (Ivekovic et al., 2005; Dua et al.

2010). Porém, dentre todo o período de seleção de n amostral que se estendeu por mais de um ano, não houve atendimentos de pacientes com ceratite pigmentar unilateral significativa. Todos os animais quando referidos ao setor de Oftalmologia Veterinária com queixa de melanose corneana possuíam a enfermidade bilateralmente. Por esta razão, a escolha da técnica necessitava abranger a possibilidade de transplante alógeno. Outrossim, o fato de os procedimentos serem realizados em uma mesma unidade animal minimizam os vieses individuais, trazendo dados sobre as comparações entre os olhos de forma mais fidedigna.

A correção das alterações dos anexos via cirurgia foi adotada, a fim de minimizar interferências secundárias ocasionadas por agravos da síndrome ocular braquicefálica ou distúrbios dos cílios. Enfatiza-se a importância da correção, visto que, tais alterações favorecem estímulos crônicos inflamatórios na córnea e alteração do microambiente limbal que possivelmente predispõem ao desenvolvimento da LSCD (Puangsricharern e Tseng, 1995; Ledbetter e Gilger 2013).

Os pacientes doadores do explante limbal não demonstraram nenhuma complicação ou intercorrência após a coleta, corroborando com o descrito por Puangsricharern e Tseng (1995).

Brunelli et al. (2006) induziram deficiência limbal em cães experimentalmente, e os sinais clínicos encontrados foram, principalmente, edema, neovascularização e pigmentação corneal em 72,2% dos cães (61,1% leve e 11,1% moderada) em 30 dias após a retirada do limbo. Tais achados vão ao encontro com os sinais clínicos encontrados nos animais selecionados para o presente estudo. Os pacientes da pesquisa em pauta também apresentavam também hiperemia conjuntival. Em contrapartida, Ledbetter e colaboradores (2012), relataram caso de LSCD secundário a herpesvirus, em que o tutor do cão referiu não ter observado hiperemia em nenhum momento (Ledbetter et al., 2012). Apesar de tal divergência, os cães do presente estudo apresentavam ceratoconjuntivite seca, quadro que cursa com hiperemia de conjuntiva em decorrência ao atrito que ocorre sobre a superfície ocular.

Quanto ao uso da membrana amniótica de cão, pesquisas apontam que além de abrigar os aloenxertos límbicos, o seu uso pode favorecer o controle da inflamação (Jackson et al., 2020). Kalpravidh et al. (2009) afirmam que o uso da membrana promove aumento da epitelização, redução da vascularização, inflamação e formação de

cicatrizes. Mittal et al. (2015), abordaram quatro casos de SLET em que o crescimento de células foi estimulado sobre membrana amniótica *in vivo*, por meio coloração de fluoresceína. Notou-se o aparecimento de células centradas em transplantes individuais em crescimento na superfície da MA. Tal crescimento foi variável, alguns dos transplantes produziram lâminas de células complexas e outros não (Mittal et al., 2015). Esse dado permitiu extrair a ideia de que o SLET produz efeitos benéficos adicionais além dos observados pelo uso da MA isolada (Sangwan e Sharp, 2017). No presente estudo, fica o questionamento da melhora clínica do GT estar associado ao SLET ou se o uso isolado da MA poderia já trazer tais observações.

Na avaliação citológica, foi identificada célula caliciforme em uma das lâminas de um dos cães com ceratite pigmentar, assim como descrito por Özgencil et al. (2017) em um cão diagnosticado com LSCD. A forma como a lâmina fora confeccionada, torna praticamente impossível a presença de tal célula por erro de coleta. Ressalta-se que a identificação de célula caliciforme em citologia de córnea é considerado padrão ouro para o diagnóstico de LSCD (Özgencil et al., 2017). Isso ocorre pois o epitélio da córnea não se regenera na deficiência de células troncos do limbo e, por esta razão, ocorre conjuntivalização da córnea, vascularização, inflamação crônica, úlceras e defeitos epiteliais persistentes. Assim, na LSCD a superfície corneana é coberta por epitélio conjuntival que contém as células caliciformes (Özgencil et al., 2017). Desse modo, é possível inferir uma tendência à associação da LSCD na patogenia da ceratite pigmentar, questão levantada pela autora.

Labelle e Labelle (2023) referiram que os achados histopatológicos da ceratite pigmentar em braquicefálicos incluem pigmentação no epitélio e estroma corneal, presença de leucócitos e vascularização também no estroma da córnea. Esses dados corroboram com as alterações encontradas na histopatologia das córneas processadas no estudo em pauta.

Em humanos é descrito que pacientes com ceratoconjuntivite seca (KCS) importante não devem ser considerados como receptores de transplantes limbais (Dua et al., 2010; Moshifar et al., 2022). Considerando a Oftalmologia Veterinária, sabe-se que a inervação da córnea desenvolve importante função tanto no reflexo de piscar, quanto na produção lacrimal, cicatrização de lesões e na manutenção da saúde do epitélio corneano. Kafarnik et al. (2008)

demonstraram densidade de fibras nervosas nos plexos nervosos subepiteliais menor em braquicefálicos em relação às demais conformações cranianas. Também já foi evidenciado em cães saudáveis uma sensibilidade corneal central 50 até 93% menor em braquicefálicos (Barrett, 1991; Bolzanni et al., 2020). Em consequência, esses animais já nascem com redução na secreção da parte aquosa da lágrima (Bolzanni et al., 2020), deduzindo que encontrar um paciente sem distúrbio lacrimal para este estudo, que tem foco em animais braquicefálicos, seria um feito não possível. Por esta razão, antes da realização do transplante, todos os cães já faziam tratamento para a ceratoconjuntivite seca com ciclosporina variando entre 0,5 a 1% uso tópico BID, tendo assim a produção lacrimal aquosa estável e o mesmo foi mantido em todo o tratamento pós transplante. Além disso, o uso de MA pode favorecer um ambiente mais propício para o crescimento das células tronco limbais (Mittal et al., 2015) o que poderia amenizar o ambiente inapropriado para o crescimento das células promovido pela KCS.

É sabido que nos casos de KCS grave em humanos, as junções celulares responsáveis pela manutenção da barreira da córnea, localizada na camada das células epiteliais são interrompidas e, conseqüentemente, sua função é prejudicada (Pflugfelder e de Paiva 2017; Zhang et al., 2017). Imaizumi et al. (2023) descobriram que as células tronco mesenquimais do tecido adiposo humano fortalece essas junções, além de aumentar os níveis de expressão de componentes relacionados à função de barreira. Também são capazes de suprimir a inflamação (Imaizumi et al., 2023), informação que poderia justificar a observação clínica em que o GT apresenta menor blefarospasmo. Outrossim, se as CTs limbais de cães apresentassem o mesmo comportamento das CTs do tecido adiposo em humanos, poderia haver uma melhora do quadro de KCS por meio da melhora da barreira da córnea, possibilitando abranger o uso de transplante limbal para cães que apresentem a comorbidade concomitante.

A literatura descreve que o uso de corticosteroides via sistêmica não teria o poder de aumentar a ação lítica da collagenase da córnea numa reparação (Rankin, 2021). Considerando a intercorrência do paciente Shih tzu, que apresentou “melting” corneano, e que a ceratectomia para remoção do pigmento atingiu profundidade importante, resultando em úlcera corneal iatrogênica, ressalta-se o receio em instituir terapia com antiinflamatórios esteroidais para imunossupressão, uma vez que os mesmos aumentam

a ação lítica das enzimas collagenase, podendo acarretar rápido derretimento estromal das úlceras da córnea (Rankin, 2021). Os corticosteroides tópicos são geralmente considerados contraindicados na presença de ceratites ulcerativas. Destaca-se que na prática clínica o agravamento de lesões estromais com corticosteroide sistêmico é factível. Desta forma, exalta-se o receio da equipe à administração de corticosteroides nas úlceras caninas. Enfatiza-se que o imunomodulador foi empregado criteriosamente por todo o período, pré e pós cirúrgico. Não obstante, houve dificuldade de adesão dos tutores ao experimento clínico considerando as possibilidades de complicações vistas na rotina prática. Salienta-se que no presente estudo foram utilizados pacientes, animais de tutores bastante preocupados com o bem estar dos seus cães.

Considerando os mecanismos de cicatrização corneana, o papel dos fatores de crescimento sobre as lesões é essencial, destacando-se o fator de crescimento epidérmico (EGF), com papel fundamental na reepitelização (Mustafa e Zlateva, 2022). A concentração desse fator nas lágrimas altera rapidamente após lesão na córnea, ocorrendo em baixas concentrações quando há lacrimejamento em lesões crônicas e altas concentrações quando estimulado por lesões mais agudas (Van Setten et al., 1991). Assim, quando há lacrimejamento crônico em pacientes com defeitos epiteliais persistentes, a concentração do EGF reduz pelo esgotamento das reservas de proteínas secretadas na glândula lacrimal (Lim et al., 2003). Considerando que os pacientes com ceratite pigmentar possuem defeitos persistentes (crônicos), a concentração lacrimal de EGF estará reduzida e, conseqüentemente, a reparação corneana desses animais será prejudicada. Tendo em vista que os animais abordados na pesquisa, abrange a situação da maioria dos pacientes com o mesmo diagnóstico atendidos na rotina clínica, permite concluirmos que grande parte desses animais apresentam deficiência no mecanismo de cicatrização. Esse dado favorece ao aparecimento do pigmento corneano na reparação tecidual.

Os braquicefálicos possuem inervação corneal reduzida (Kafarnik et al. 2008), e, conseqüentemente, do fator de crescimento do nervo (NGF), o qual promove a cicatrização de ceratites ulcerativas relacionadas ao comprometimento do nervo sensorial (Mustafa e Zlateva, 2022). Este compõe os fatores neurotróficos (NTs), os quais desempenham papel na homeostase da superfície ocular, estimulando a

proliferação e a inervação das células epiteliais. Considerando a escassez da inervação da córnea, reportada nos cães braquicefálicos comparativamente à outras raças, pode-se inferir que apresentem deficiência do metabolismo epitelial, promovendo, juntamente às demais alterações da síndrome braquicefálica, a manifestação de distúrbios da superfície ocular. Além de estimular o crescimento do nervo, o NGF também pode atuar na modulação da inflamação, da cicatrização e do aumento da liberação de neuropeptídeos e outros fatores de crescimento (Klenkler et al., 2007).

Considerando o uso de enxerto de natureza alogênica na manutenção da transparência corneana, a taxa de sucesso também segue como um desafio na Medicina no tratamento da LSCD. Porém, o insucesso é intensificado no longo prazo, acima de 2 anos após o transplante, já nesta obra em 70 dias, ou seja, curto prazo. Um dos pacientes foi referido pelo tutor piora visual importante e retorno da dificuldade de deambulação 5 meses após o procedimento. O declínio ocorre na sobrevida do aloenxerto e na acuidade visual. Evidencia-se que a rejeição seria o principal risco de insucesso (Yin e Jurkunas, 2018). Em relação à técnica SLET em específico, em humanos é constatado potencial sucesso inicial, embora careça de resultados a longo prazo. E, além disso, são escassos estudos comparativos entre diversas técnicas e pesquisas prospectivas randomizadas, tornando-se assim um desafio e gerando dificuldade na tomada de decisão de qual técnica escolher em cada caso (Yin e Jurkunas, 2018).

Embora na Medicina seja realizada imunossupressão sistêmica bem como o uso de corticosteroides, no longo prazo, essa imunossupressão ameaça a salubridade dos indivíduos pela presença de efeitos colaterais, por vezes graves, como anemia, insuficiência renal e/ou hepática e hiperglicemia (Krakauer et al., 2012; Holand et al., 2012; Vazirani et al., 2016). Em contrapartida, Djalilian et al. (2005) demonstraram em humanos sobrevivência de células tronco epiteliais de doadores por um período de até 3,5 anos após o transplante limbal. Bem como, constatou-se que as CTs sobreviventes do doador se tornaram fonte primária de epitélio na córnea (Djalilian et al., 2005). Desse modo, compreende-se que o sucesso a longo prazo do transplante de aloenxerto límbico é dependente da sobrevivência das CTs do doador, no entanto, faz-se necessária imunossupressão adequada para evitar a rejeição (Djalilian et al., 2005). Assim, o

sucesso do transplante entra em conflito aos efeitos colaterais da imunossupressão prolongada.

Em humanos, relatou-se ocorrência de neoplasia conjuntival em receptor de aloenxerto límbico com células compatíveis às do carcinoma metastático de mama que o indivíduo doador do enxerto possuía. Esse dado levanta a necessidade de estabelecer criteriosamente a seleção do doador e aumento da vigilância do câncer no receptor (Miller et al., 2017). De todo modo, considerando a LSCD bilateral em humanos, o transplante alógeno segue uma entre as poucas opções viáveis (Yin e Jurkunas, 2018). Por esta razão, ainda uma tentativa passível de estudos em cães com ceratite pigmentar, levando em pauta a presença de células caliciformes encontradas na avaliação citológica corneana de cão nesse estudo, desde que com melhores diretrizes, aperfeiçoamento da técnica e do estabelecimento de padrão adequado de tratamento pós cirúrgico nesses indivíduos.

Outras técnicas menos invasivas já foram testadas como possíveis tratamentos para a ceratite pigmentar grave em cães. Entre as técnicas hoje descritas, relata-se a criocirurgia. No entanto, assim como nesse estudo, apesar de um resultado satisfatório no curto prazo e a possibilidade de deambulação do animal no ambiente, que em alguns casos se apresentavam inicialmente com cegueira, todos os casos acompanhados com tempo maior de pós cirúrgico voltaram a apresentar pigmento na córnea (Azoulay, 2013; Ghiggi et al., 2022). Este fator levanta um confronto em que, considerando a recidiva da pigmentação corneana, o fator anestésico, pós-operatório prolongado, quais seriam os reais benefícios das cirurgias hoje adjuvantes ao tratamento da ceratite pigmentar. Em indivíduos completamente cegos, os estudos apontam que há a possibilidade de reestabelecimento temporário ou parcial da visão a curto e médio prazo (Azoulay, 2013). Todavia, para investigar novas possibilidades de tratamento, é necessário compreender a multiplicidade de fatores e mecanismos da afecção, não completamente elucidados em cães. A presença de células caliciformes na córnea com ceratite pigmentar encontrada nesse estudo, abre caminhos para desenvolvimento de novas tentativas cirúrgicas, visto que, esse dado corrobora com a hipótese de se estar perante a uma deficiência de células epiteliais limbais. Assim, faz-se necessário aprimorar a técnica de transplante limbal em cães, considerando os vieses presentes na Veterinária, notadamente quanto

a lidar com indivíduos apresentando produção de lágrima adequada seria um desafio a ser solucionado.

Em humanos, as técnicas cirúrgicas estão bem definidas. No entanto, os comportamentos envolvendo proliferação e migração das CTs do transplante não possui delineamento detalhado e seu papel em casos graves ainda precisa ser determinado (Yin e Jurkunas, 2018). Ademais, os resultados do transplante limbal são de interpretação difícil por razões diversas, incluindo estágio e gravidade mal definidos, tipo de LSCD, heterogeneidade das causas, tipo de enxerto e posteriores resultados (enxertos alógenos e autógenos) (Yin e Jurkunas, 2018).

Apesar de constatar que não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle e transplante, a constatação de célula caliciforme na córnea de um cão levanta a hipótese de haver sim relação da LSCD na patogenia da ceratite pigmentar. No entanto, um n amostral maior bem como a execução da técnica padrão ouro para avaliação citológica deve ser empregada em posteriores pesquisas para validar e confirmar a informação obtida nesse estudo.

Além disso, salienta-se que esse é um estudo inédito quanto ao uso de transplante limbal alógeno em cães com ceratite pigmentar e, por essa razão, a resolução dos impasses observados na execução da técnica de transplante limbal em cães com ceratite pigmentar deve ser sanada, bem como melhor explanada para ser obtida uma padronização da técnica, afim de minimizar a possibilidade de vieses negativos na pesquisa.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que a evidência de célula caliciforme na córnea de um cão com ceratite pigmentar fortifica a possível associação da LSCD em sua patogenia, embora estudos com um maior n amostral sejam necessários para confirmação desse dado. Além disso, com os resultados aqui obtidos, o transplante limbal alógeno pela técnica de SLET não atingiu o objetivo de solucionar a recorrência da ceratite pigmentar nos cães acometidos, embora tenham apresentado clinicamente aumento da melanose mais tardiamente.

7. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

8. REFERÊNCIAS

- Andrade AL, Gomes JAP, Luvizotto MCR, Perri SHV, Campos M (2009) Aspectos clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Veterinária e Zootecnia** 16:127-142.
- Atallah MR, Palioura S, Perez VL, Amescua G (2016) Limbal stem cell transplantation: current perspectives. **Clinical Ophthalmology** 10:593-602.
- Azoulay T (2013) Adjunctive cryotherapy for pigmentary keratitis in dogs: a study of 16 corneas. **Veterinary Ophthalmology** 1-9.
- Barrett PM, Scagliotti RH, Merideth RE, Jackson PA (1991) Absolute corneal sensitivity and corneal trigeminal nerve anatomy in normal dogs. **Veterinary Comparative Ophthalmology** 1:245-254.
- Basu S, Sureka SP, Shanbhag SS, Kethiri AR, Singh V, Sangwan VC (2016) Simple epithelial transplantation: Long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns. **Ophthalmology** 123:1000-1010.
- Blocker T, Wan Der Woerd A (2001) A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and Domestic Short-haired cats. **Veterinary Ophthalmology** 4:127-130.
- Bolzanni H, Oriá AP, Raposo ACS, Sebbag L. (2020) Aqueous tear assessment in dogs: impact of cephalic conformation, intertest correlation, and test-retest repeatability. **Veterinary Ophthalmology** 23:534-543.
- Brito FLC, Cunha O da, Laus JL (2010) Limbal autograft transplantation in a dog with alkali-induced ulceration. **Ciência Rural** 40:1840-1843.
- Brunelli ATJ, Vicente FAM, Chahud F, Oriá AP, Bolzan AA, Campos CF, Doria Neto FA, Laus JL (2006) Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59:1194-1204.
- Buskirk EMV (1989) The anatomy of the limbus. **Eye (Lond)** 3:101-108.
- Cavanagh HD, Colley AM (1989) The molecular basis of neurotrophic keratitis. **Acta Ophthalmologica Supplement** 192:115-134.
- Costa J, Steinmetz A, Delgado E (2021) Esmeralda. Clinical signs of brachycephalic ocular syndrome in 93 dogs. **Irish Veterinary Journal** 74:1-8.
- Daniels JT, Dark JK, Tuft SJ, Khaw PT (2001) Corneal stem cells in review. **Wound Repair Regen** 9:483-494.
- Davenger M, Evenson A (1971) Role of the pericorneal structure in renewal of corneal epithelium. **Nature** 229:560-561.

Di Girolamo N (2015) Moving epithelia: tracking the fate of mammalian limbal epithelial stem cells. **Progress in Retinal Eye Research** 48:203-225.

Djalilian AR, Mahesh SP, Koch CA, Nussenblatt RB, Shen D, Zhuang Z, Holland EJ, Chan C-C (2005) Survival of donor epithelial cells after limbal stem cell transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 43: 803-807.

Dua HS, Miri A, Said DG (2010) Contemporary limbal stem cell transplantation – a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology** 38:104-117.

Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A (2005) Limbal epithelial crypts: A novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. **British Journal Ophthalmology** 89:529-532.

Ebato B, Friend J, Thoft RA (1988) Comparison of limbal and-peripheral human corneal epithelium in tissue culture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 29:1533-1537.

Goldin JR (1995) Pesquisa em saúde e direito dos animais. Porto Alegre: HCPA 28p.
Hair JJF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE (2014) Multivariate Data Analysis. (7Eds) Pearson Education: Upper Saddle River, NJ, USA.

Ghiggi E, Hünning PS, Andrade MCC, Valdetaro GP, Carneiro RK (2022) Cryosurgery using dimethyl ether in the treatment of pigmentary keratitis in pug dogs. **Ciência Animal** 32:200-208.

Hatch KM, Dana R (2009) The structure and function of the limbal stem cell and the disease states associated with limbal stem cell deficiency. **International Ophthalmology Clinics** 29:43-52.

Holland EJ, Mogilishetty G, Skeens HM, Hair DB, Neff KD, Biber JM, Chan CC (2012) Systemic immunosuppression in ocular surface stem cell transplantation: Results of a 10-year experience. **Cornea** 31:655–661.

Imaizumi T, Hayashi R, Kudo Y, Li Xiaoqin, Yamaguchi K, Shibata S, Okubo T, Ishi T, Honma Y, Nishida K (2023) Ocular instillation of conditioned médium from mesenchymal stem cells in effective for dry eye syndrome by improving corneal barrier function. **Research Square** 1-24.

Ivecovic R, Tedeschi-Reiner E, Novak-Laus K, Andrijevic-Derk B, Cima I, Mandic Z (2005) Limbal graft and-or amniotic membrane transplantation in the treatment of ocular burns. **Ophthalmologica** 219:297-302.

Jackson CJ, Ernø ITM, Ringstad H, Tønseth KA, Dartt DA, Utheim TP (2020) Simple limbal epithelial transplantation: Current status and future perspectives. **Stem Cells Translational Medicine** 9:316-327.

Jain R, Kanaujia V, Sahu S, Das S (2014) Management of unilateral limbal stem cell deficiency by simple limbal epithelial transplantation – our experience. **MedCrave Online Journal of Surgery** 1:4-7.

Joe AW, Yeung SN (2014) Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges. **Stem Cells Translation Medicine** 3:328-322.

Kafarnik C, Fritsche J, Reese S (2008) Corneal innervation in mesocephalic and brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal microscopy. **Veterinary Ophthalmology** 11:363-367.

Kalpravidh M, Tuntivanich P, Vongsakul S, Sirivaidyapong S (2009) Canine amniotic membrane transplantation for corneal reconstruction after the excision of dermoids in dogs. **Veterinary Research Communications** 33:1003-1012.

Kenyon KR, Tseng SC (1989) Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. **Ophthalmology**. 1989 96:709-22.

Klenkler B, Sheardown H, Jones L (2007) Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. **The ocular surface** 5:228-239.

Krakauer M, Welder JD, Pandya HK, Nassiri N, Djalilian AR (2012) Adverse effects of systemic immunosuppression in keratolimbalallograft. **Journal of Ophthalmology** 1-5.

Kobashigawa KK (2018) **Transplante de membrana amniótica com células epiteliais limvais cultivadas em sanduíche: estudos clínicos e de viabilidade em córneas de coelhos**. 78 f. Tese (Doutorado) – Unesp, Jaboticabal.

Krecny M, Tichy A, Rushton J, Nell B (2014) A retrospective survey of ocular abnormalities in pugs: 130 cases. **Journal of Small Animal Practice** 56:96–102.

Labelle AL, Dresser CB, Hamor RE, Allender MC, Disney JL (2013) Characteristics of, prevalence of, and risk factors for corneal pigmentation (pigmentary keratopathy) in Pugs. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 243:667-674.

Labelle A, Labelle P (2023) Diagnosing corneal pigmentation in small animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 53:339-352.

Le Q, Xu J, Deng SX (2018) The diagnosis of limbal stem cell deficiency. **The Ocular Surface** 16:58-69.

Ledbetter EC, Gilger BC (2013) Diseases and Surgery of the canine cornea and Sclera. In.: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ (5Eds). **Veterinary Ophthalmology**, John Wiley & Sons: Iowa, v.2, p.976-1049.

Ledbetter EC, Marfurt CF, Dubielzig RR (2012) Metaherpetic corneal disease in a dog associated with partial limbal stem cell deficiency and neurotrophic keratitis. **Veterinary Ophthalmology** 16:282-288.

Lim M, Goldstein M, Tuli S, Schultz G (2003) Growth factor, cytokine and protease interactions during corneal wound healing. **The ocular surface** 1:53-65.

Luna LG (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces institute of Pathology (3 ed.). McGraw-Hill.

Maggs DJ (2008). Eyelids. In: Slatter DN. Fundamentals of Veterinary Ophthalmology (4 ed.). Elsevier: Missouri, p.107-134.

Maini S, Everson R, Dawson C, Chang YM, Hartley C, Sanchez RF. (2019) Pigmentary keratitis in pugs in the United Kingdom: prevalence and associated. **BMC Veterinary Research** 15:1-11.

Michael K, Nachtsheim C, Neter J, Li W (2004) Applied Linear Statistical Models. (5Eds) McGraw-Hill/Irwin: New York, NY, USA.

Miller AKM, Young JWM, Wilson DJM, Dunlap JM, Chamberlain WM (2017) Transmission of donor-derived breast carcinoma as a recurrent mass in a keratolimbic allograft. **Cornea** 36:736-739.

Mittal V, Jain R, Mittal R (2015) Ocular surface epithelialization pattern after simple limbal epithelial transplantation: an in vivo observational study. **Cornea** 34:1227-1232.

Montilha DC, Gama C, Pires CM, Wouk AF (2016) Simple limbal epithelial transplantation (SLET): the technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency in canine. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS – WSAVA. Cartagena: Colombia, pôster.

Moshirfar M, Thomson AC, Ronquillo Y (2022) Limbal Epithelial Transplant. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Mustafa S, Zlateva, NP (2022) Mechanism of corneal healing and the role of the growth factors in the eye – a review. **Tradition and modernity in veterinary medicine** 1:15.

Ordonez P, Di Girolamo N (2012) Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. **Stem Cells** 30:100-107.

Ozgencil FE, Sancak IG, Alçigie IG, Ovali E (2014) Comparison of amniotic membrane (AM) transplantation and mesenchymal stem cell (MSC) transplantation in corneal alkaline burn-induced stem cell deficiency in rabbits. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 61:99-106.

Ozgencil FE, Gulmez N, Gultekin Ç, Sayiner S (2017) Corneal impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency in a dog. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 23:507-511.

Palmer SV, Gomes FE, Mcart JA (2021) Ophthalmic disorders in a referral population of seven breeds of brachycephalic dogs: 970 cases (2008–2017). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 259:1318-1324.

Patruno M, Perazzi A, Martinello T, Blaseotto A, Di Iorio E, Iacopetti I (2017) Morphological description of limbal epithelium: searching for stem cells crypts in the dog, cat, pig, cow, sheep and horse. **Veterinary Research Communications** 41:169-173.

Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, De Rama P, De Luca M (1999) Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. **Journal Cell Biology** 145:769-782.

Pflugfelder SC, de Paiva CS (2017) The pathophysiology of dry eye disease: what we know and future directions for research. **Ophthalmology** 124:S3-S13.

Preacher KJ, MacCallum RC (2003). Repairing Tom Swift's electric factor analysis machine. **Understanding statistics: Statistical issues in psychology, education, and the social sciences** 2:13-43.

Puangsricharn V, Tseng SCG (1995) Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology** 102:1476-1485.

Qi H, Li DQ, Shine HD, Chen Z, Yoon K-C, Jones DB, Pflugfelder SC (2008) Nerve growth factor and its receptor TrkA serve as potential markers for human corneal epithelial progenitor cells. **Experimental Eye Research** 86:34-40.

Queiroz AG, Barbosa MM, Santos MS, Barreiro TP, Gomes JA (2016) Assessment of surgical outcomes of limbal transplantations using simple limbal epithelial transplantation technique in patients with total unilateral limbal deficiency. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** 79:116-118.

Ramos T, Scott D, Ahmad S (2015) An update on ocular surface epithelial stem cells: cornea and conjunctiva. **Stem Cells International** 1-7.

Rankin AJ (2021) Clinical Pharmacology and Therapeutics: Part 3 Anti-inflammatory and Immunosuppressant drugs. In: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ (6Eds). **Veterinary Ophthalmology**, John Wiley & Sons: Iowa, v.1, p 420.

Sanchez R.F, Daniels JT (2015) Limbal stem cells deficiency in companion animals: time to give something back? **Current Eye Research** 1-8.

Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D (2012) Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. **British Journal Ophthalmology** 96:931-934.

Sangwan VS, Sharp JAH (2017) Simple limbal epithelial transplantation. **Current Opinion in Ophthalmology** 4:382-386.

Selver OB, Durak I, Gurdal M, Baysal K, Ates H, Ozbek Z, Wang Z, Wu A, Wolosin JM (2016) Corneal recovery in a rabbit limbal stem cell deficiency model by autologous grafts of tertiary outgrowths from cultivated limbal biopsy explants. **Molecular Vision** 22:138-149.

Serna-Ojeda JC, Basu S, Vazirani J, Garfias Y, Sangwan VS (2020) Systemic Immunosuppression for Limbal Allograft and Allogenic Limbal Epithelial Cell Transplantation. *Med Hypothesis Medical Hypothesis. Discovery & Innovation Ophthalmology* 9:23-32.

Vallone LV, Enders AM, Mohammed HO, Ledbetter EC (2016) *In vivo* confocal microscopy of brachycephalic dogs with and without superficial corneal pigment. *Veterinary Ophthalmology* 1-10.

Van SG, Tervo T, Viinikka L, Perheentupa J, Tarkkanen A (1991) Epidermal growth factor in human tear fluid: a minireview. *International Ophthalmology* 15:359-362.

Vazirani J, Ali MH, Sharma N, et al. (2016) Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency: Multicentre results. *British Journal of Ophthalmology* 100: 1416-1420.

Vazirani J, Mariappan I, Ramamurthy S, Fatima S, Basu S, Sangwan VS (2016) Surgical management of bilateral limbal stem cell deficiency. *Ocular Surface* 14:350–364.

Yin J, Jurkunas U (2018) Limbal Stem Cell Transplantation and Complications. *Seminars in Ophthalmology* 33:134-141.

Zhang X et al. (2017) Dry eye management: targeting the ocular surface microenvironment. *International journal of molecular sciences* 18:1398.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao tamanho do n amostral, com o acontecimento da pandemia mundial (COVID-19), houve restrição de atendimentos e de circulação de pessoas e pacientes no Hospital Veterinário, a desistência de tutores com seus animais confirmados no experimento foi significativa, bem como a dificuldade na adesão de novos pacientes devido às incertezas gerais do período. No entanto, houve homogeneidade dos dados quanto a evolução dos sinais clínicos encontrados nesse estudo, o que contribuiu para o bem-estar animal, porquanto foi factível trazer resultados e promover o uso de uma quantidade menor de animais para experimentação científica.

Além disso, encontraram-se dificuldades em aplicar a técnica de citologia com o filtro de papel. Mesmo seguindo as instruções de estudos anteriores, a execução da coloração e confecção das lâminas foi dificultosa e, por isso, optou-se apenas por citologia de impressão diretamente da lâmina na córnea acometida.

Devido às limitações de estudos acerca do tema do trabalho, houve dificuldade em encontrar qual técnica seria mais adequada para uso em cães, levando em consideração as particularidades corneais caninas que diferem das humanas. Sendo assim, ainda não há uma técnica consagrada para a Medicina Veterinária.

Em relação à escolha do flap de terceira pálpebra para proteger os explantes limbais, ela não parece ter interferido no resultado, visto que não houve diferenças estatísticas. A técnica não foi utilizada no olho controle considerando que não se enquadraria nas normas para aceitação no CEUA, bem como a falta de aceitação pelos tutores dos animais do estudo.

ANEXO I

Jaboticabal, ____ de _____ de _____.

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, _____, RG _____, CPF _____, responsável pelo paciente _____, raça _____, de _____ anos de idade, estou ciente de que o mesmo está participando do Projeto de Pesquisa, no setor de Oftalmologia da FCAV/UNESP/Jaboticabal, que tem como orientadora a Prof. Dr. Paola de Castro Moraes e como equipe os pós graduandos Karina Kamachi Kobashigawa, Francimery Aparecida Fachini, Laís Fernanda Sargi, Daniela Moura dos Santos e Cinthya de Andrade Gujanwski, os quais poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone (16) 3209 7100 ramal 7791, ou pelo e-mail setoroftalmologiaunesp@gmail.com.

Declaro, também, estar ciente dos riscos associados ao projeto, tratando-se de procedimento microcirúrgico com delicado pós-operatório. Tenho ciência de que os olhos não terão aparência final transparente como um olho normalmente saudável. Todos os exames e retornos agendados devem ser cumpridos fielmente para o bom resultado do procedimento. Comprometo-me, portanto, a comparecer a todos os exames precisamente NAS DATAS MARCADAS pela equipe e a instituir TODAS as recomendações estabelecidas ao paciente, incluindo uso do colar protetivo elizabetano durante o período estipulado, bem como todos os colírios ou pomadas oftálmicas instituídas e medicações via orais.

Responsável