

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**USO ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO E
PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA
EM CÃO**

MICAELLA GORDON GANDOLFI

BOTUCATU - SP

Abril/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**USO ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO E
PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA
EM CÃO**

MICAELLA GORDON GANDOLFI

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Assoc. Cláudia Valéria Seullner Brandão.

BOTUCATU - SP
Abril/2019

G196u	<p>Gandolfi, Micaella Gordon USO ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO E PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃO / Micaella Gordon Gandolfi. -- Botucatu, 2019 39 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu Orientadora: Cláudia Valéria Seullner Brandão</p> <p>1. Oftalmologia veterinária. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

MICAELLA GORDON GANDOLFI

**USO ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE
SECA EM CÃO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Assoc. Dr^a. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Membro e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Assoc. Dr^a Regina Kiomi Takahira

Membro

Departamento de Clínica Médica
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Dr^a. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

Membro

Departamento de Clínica de Pequenos Animais
UNOESTE – Presidente Prudente - SP.

Dr^a. Cintia Sesso Perches

Membro

Autônoma
Piracicaba - SP.

Profa. Dr^a. Natalie Bertelis Merlini

Membro

Departamento de Clínica Médica
Universidade Estadual de Maringá - UEM - PR.

Data da defesa: 17 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus.

À minha orientadora Professora Cláudia Valéria Brandão, por todos os anos, os direcionamentos, os conselhos, as conversas, paciência. Durante esses 6 anos você foi uma segunda mãe pra mim, espero ter retribuído.

Ao Professor José Joaquim Tilton Ranzani, por todos os ensinamentos.

À Profa. Ana Liz Alves por me ajudar no cultivo com as células tronco.

À Profa Elenice Deffune por me receber em seu laboratório, por me ajudar no desenvolvimento deste estudo, sempre me recebendo com muito carinho.

À grande família oftalmo Botucatu, por toda a ajuda: Úrsula Guberman, Cintia Perches, Natalie Merlini, Nátalia Rodas, Rodrigo Barros, Cristiane, Luciana Pardini, Inajara Hirota e Anna Clara Barros, Lenise Gonçalves, Annalú Pintton, Leticia Ramos, Mariana Sessa, obrigada por toda a ajuda! Em especial à Cintia Perches por sempre me ajudar de bom grado e coração aberto e a Natalie Bertelis pelos anos de convivência e ensinamentos.

Às pessoas com quem morei, seja um mês ou anos; Úrsula, Natalie, Ana Paula e Murilo. E as que moraram nos últimos anos: Anna Clara, Lenise, Mariana, Amanda Bega e Amanda; obrigada pelas conversas, desabafos e pela ótima convivência.

Ao Gustavo Rosa, por toda ajuda e paciência no cultivo de células tronco e ao Alexandre da patologia pela ajuda.

Aos meus pais, Karen Gordon e Alberto Fay, sem vocês eu não estaria aonde estou, obrigada pelo apoio, dedicação, pela educação que recebi; vocês são a minha base. Em especial para o Alberto, por me ajudar a realizar esse sonho.

Ao Augusto, meu namorado, obrigada pela paciência e por sempre me fazer ver o outro lado de tudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento a Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) código de financiamento 001, pela bolsa e CNPq e Fapesp pelo apoio a equipamentos.

LISTA DE ABREVIações

µl	Micro litro
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BUT	Break-up time
CSS	Ceratoconjuntivite seca
CTM-TA	Célula tronco mesenquimal de tecido adiposo
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GCTM-AD	Grupo tratado com células tronco mesenquimal de tecido adposito
GPRP-AA	Grupo tratado com plasma rico em plaquetas
IgE	Imunoglobulina E
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina
IM	Intramuscular
KGF	Fator de crescimento de ceratinócitos
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilo
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
MSC-AD	Mesenchymal stem cell adipose derived
ng/mL	Nanograma por mililitro
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PRP-AA	Plasma rico em plaquetas aquecido alogênico
SS	Síndrome de Sjögren
TBUT	Tear film break-up time
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
TRFL	Tempo de ruptura do filme lacrimal
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Ceratoconjuntivite seca.....	12
2.2 Teste lacrimal de Schirmer (TLS).....	13
2.3 Teste de Osmolaridade da Lágrima.....	13
2.4 Célula tronco mesenquimal na oftalmologia.....	14
2.5 Plasma rico em plaquetas na oftalmologia.....	15
3 OBJETIVO.....	17
3.1 Geral.....	17
4 HIPÓTESES.....	17
5 REFERÊNCIAS.....	18
Capítulo 1.....	22
APÊNCICE.....	38

GANDOLFI, M.G.

Botucatu, 2019. p. 45. Tese (Doutorado)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar e avaliar a aplicação de célula tronco mesenquimal de tecido adiposo (CTM-TA) e plasma rico em plaquetas aquecido alogênico (PRP-AA) perilacrimonial em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS), bem como, se há diferença na resposta segundo o grau de gravidade da afecção. Foram analisados 20 cães com produção lacrimonial $<15\text{mm}/\text{min}$ e distribuídos aleatoriamente em dois grupos ($n=10$). O grupo 1 tratado com CTM-TA (5×10^6 e 3×10^6 células) (GCTM-TA) e com grupo 2 PRP-AA (0,7mL e 0,3mL) (GPRP-AA), ambos injetados perilacrimonial nas glândulas lacrimonial principal e da terceira pálpebra, respectivamente. Todos os olhos foram avaliados em quatro momentos (M0 M15, M30, M60 dias). As variáveis avaliadas foram: osmolaridade da lágrima; teste lacrimonial de Schirmer (TLS); sensibilidade corneal; tempo de ruptura do filme lacrimonial (TRFL); pressão intraocular; espessura corneal; e biopsia da conjuntiva bulbar, além das variáveis clínico-oftalmológicas. Houve melhora nos dois grupos a partir de M15 ($p<0,05$) na qualidade do filme lacrimonial, avaliada por meio da osmolaridade e TRFL, sem diferença entre os grupos. A produção de lágrima aumentou, entretanto notou-se diferença significativa nos animais com CCS discreta no GPRP-AA a partir do M30, e nos cães com CCS grave no GCTM-TA a partir do M30 e no GPRP-AA a partir do M60. Verificou-se melhora dos sinais clínicos da inflamação em ambos os grupos. Aplicação única perilacrimonial de CTM-TA e PRP aquecido alogênicos normaliza a qualidade do filme lacrimonial e melhora os sinais clínicos da inflamação em cães com CCS e a resposta ao tratamento está associada a gravidade da doença.

Palavras chave: Osmolaridade; Teste de ruptura do filme lacrimonial (TRFL); Síndrome do olho seco; Síndrome Sjögren; I-pen.

GANDOLFI, M.G.

Botucatu, 2019. p. 45. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of the study was to compare and evaluate the application of allogenic mesenchymal stem cell adipose tissue derived (MSCs-AD) and inactivate platelet-rich plasma allogenic (PRP-IA), perilacrimar in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS), and if there is difference in the response according to the degree of severity of the condition. Twenty dogs with lacrimal production $<15\text{mm}/\text{min}$ randomly assigned to two groups were used. Group treated with MSCs-AD (5×10^6 and 3×10^6) (GMSCs-AD) and with PRP-IA (0.7ml and 0.3ml) (GPRP-IA), both intralacrimar in the main lacrimal glands and third eyelid, respectively. The eyes were evaluated in four moments after application (M0 M15, M30, M60). The variables evaluated were: tear osmolarity e; Schirmer's tear test (STT); sensitivity corneal; tear film break time (TBUT); intraocular pressure; corneal thickness; and biopsy of the bulbar conjunctiva, in addition to clinical-ophthalmologic variables. There was improvement in two groups at M15 ($p < 0.05$) on tear film quality, assessed by osmolarity and TBUT, with there was no difference between groups. STT increased, however, statistical difference was only observed in animals with mild KCS in the GPRP-IA from the M30 and in the intense KCS at M30 in the G MSCs-AD and at M60 in the GPRP-IA. There was an improvement in the clinical signs of inflammation in both groups. The unique Intralacrimar application of MSCs-AD and PRP-IA normalizes tear film quality and improves clinical signs of inflammation in dogs with KCS, response to treatment is associated with disease severity.

Keywords: Osmolarity, tear film break time (TBUT); dry eye; Sjogren syndrome; I-pen.

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjutivite seca (CCS) ou Síndrome do olho seco é uma doença que afeta tanto cães (ENGLISH; GILGER, 2013) como os humanos, atingindo cerca de 30 milhões de pessoas na América, representando a afecção ocular mais comum (JACKSON, 2014) e cães (ENGLISH; GILGER, 2013).

A etiologia da CCS em cães não é totalmente estabelecida, porém acredita-se que a causa mais comum é de origem imunomediada, sendo uma doença autoimune multifatorial (GELATT, 2013). Gao et al. (1998) comprovaram que a CCS espontânea em cães é similar a Síndrome de Sjögren (SS) descrita em humanos.

Ocorre devido a infiltração de células T na glândula lacrimal e a liberação de citocinas pró inflamatórias, que contribuem para o aumento da inflamação local, levando à diminuição da quantidade de lágrima secretada, instabilidade do filme lacrimal e conseqüentemente à hiperosmolaridade da lágrima acarretando inflamação da superfície ocular (GANESALINGAM et al., 2019).

De acordo com Gelatt (2013), a CCS é principalmente diagnosticada pelo teste lacrimal de Schirmer 1 (TLS), e é classificada em discreta (11 a 14mm/min), moderada (6 a 10mm/min) e grave (abaixo de 5), porém, como se trata de um teste complementar, deve-se associar aos sinais clínicos.

Segundo Barabino et al. (2004) falta padronização nos testes oftalmológicos para o diagnóstico de CCS em diferentes espécies, o TLS é bem conceituado no diagnóstico, entretanto deve-se padronizar se é realizado com os olhos fechados ou abertos. Além do mais, a realização do TLS com as pálpebras fechadas, minimiza os fatores ambientais e melhora a repetibilidade (NOGUEIRA; HIDA, 2009)

Outro exame utilizado para diagnóstico é a osmolaridade e possui alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da CCS (LEMP et al., 2011). Há diversos aparelhos para sua mensuração, entretanto, a coleta da lágrima tem sido um fator limitante para sua utilização, devido a quantidade de lágrima necessária para a análise (BARABINO; CHEN; DANA, 2004), Para suprir essa limitação, novos aparelhos tem sido desenvolvidos que necessitam de pouca

lágrima para a leitura, entretanto, são poucos estudos encontrados na literatura consultada.

O tratamento convencional remete-se à aplicação diária de lágrimas artificiais e, em alguns casos, anti-inflamatórios, e uso contínuo de imunomoduladores, por via tópica. Os imunomoduladores mais utilizados são a Ciclosporina A e o Tacrolimus (BERDOULAY; ENGLISH; NADELSTEIN, 2005; NEBBIOSO; REGNO; GHARBIYA, 2017). Porém, na veterinária, a aplicação diária de colírio pode dificultar a adesão ao tratamento, pois depende da disponibilidade do tutor e alguns animais são arredios quanto à manipulação.

Outras opções terapêuticas que atuam como imunomoduladores são o plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais (CTM) (KANG et al., 2008; ALIO; ARNALICH-MONTIEL; RODRIGUEZ, 2012).

Segundo a literatura consultada, há dois trabalhos que utilizaram células tronco mesenquimal do tecido adiposo (CTM-TA) alogênica no tratamento de CCS em cães e ambos com bons resultados (VILLATORO et al., 2015; BITTENCOURT et al., 2016).

O plasma rico em plaquetas (PRP) por sua vez, tem um custo menor e já foi testado em diversas oftalmopatias, dentre elas o uso tópico para tratamento de olho seco em humanos, com bons resultados (ALIO et al., 2017). Avila; Igua; Mora (2018) aplicaram PRP autólogo perilacrimar em humanos com síndrome do olho seco grave e relataram resultados superiores ao grupo tratado apenas com colírio Hialuronato de sódio tópico, sugerindo uma nova opção terapêutica para síndrome do olho seco.

Na medicina veterinária, grande parte dos animais acometidos pela CCS são de pequeno porte (GELATT, 2013), o que dificulta a coleta de sangue e contraindica a retirada de grandes volumes para a produção do PRP. O aquecimento do PRP é indicado para casos em que a etiologia de base é autoimune e/ou para se utilizar PRP alogênico, o intuito do aquecimento é diminuir as proteínas do sistema complemento, do componente inflamatório e Imunoglobulina E (IgE) (ANITUA et al., 2014).

Entretanto, não há relatos do uso de PRP alogênico aquecido (PRP-AA) perilacrimar no tratamento de CCS em cães, e nem estudos comparativos com a aplicação de CTM, o que estimulou o desenvolvimento do presente estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ceratoconjuntivite seca

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou Síndrome do olho seco é uma doença que afeta cães e humanos. No mundo, cerca de 10 milhões de pessoas são afetadas, representando a afecção ocular mais comum (SCHAUMBERG et al., 2003), assim como em cães (GELATT, 2013).

No cão são descritas a glândula lacrimal principal e a glândula da terceira pálpebra, ambas, responsáveis por aproximadamente 70 e 30% da produção aquosa da lágrima, respectivamente (GELATT, 2013).

De acordo com Gelatt (2013) a CCS é principalmente diagnosticada pelo TLS, sendo ≥ 15 mm/min considera uma produção normal, 11–14 mm/min = CCS discreta ou subclínica, 6–10 mm/min = CCS de moderada à grave, ≤ 5 mm/min = CCS grave.

Na CCS ocorre disfunção das glândulas lacrimais, porém sua etiologia ainda não é bem elucidada nos cães. As terapias imunomoduladoras são efetivas na maioria dos animais tratados, acreditando-se que seja imunomediada (VAN BLOKLAND; VERSNEL, 2002).

Desde 1979, acreditava-se na similaridade entre a CCS espontânea em cães e a síndrome de Sjögren (SS) em humanos, que é uma doença multifatorial autoimune que leva à uma hipofunção das glândulas sudoríparas e lacrimais em humanos (VAN BLOKLAND; VERSNEL, 2002). Sendo assim sugeriu-se o cão como o principal modelo experimental para o estudo dessa doença (BARABINO; DANA, 2004).

Gao et al. (1998) observaram diminuição na apoptose dos linfócitos que infiltram a glândula lacrimal e aumento das células epiteliais lacrimais acinares e conjuntivais em cães com CCS, comprovando essa similaridade. Desde então, o cão é utilizado como modelo experimental, tendo apenas como desvantagens custos elevados, quando comparado a outros modelos experimentais, não ter uma padronização racial e aprovação do comitê de ética (BARABINO; DANA, 2004).

A SS ocorre devido a infiltração de células T na glândula lacrimal e a

liberação de citocinas pró inflamatórias, que contribuem para o aumento da inflamação local, levando à diminuição da quantidade de lágrima secretada, instabilidade do filme lacrimal e conseqüentemente à hiperosmolaridade da lágrima, acarretando inflamação da superfície ocular (GANESALINGAM et al., 2019).

Além do mais, os pacientes com CCS têm maiores níveis de mediadores inflamatórios, como a interleucina 6, interleucina 8 interferon gama (IFN- γ), quando comparados com olhos saudáveis (LAM et al., 2013).

O diagnóstico do CCS é baseado em sinais clínicos e exames complementares como TLS, teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), meniscometria e composição do filme lacrimal (BARABINO; CHEN; DANA, 2004).

2.2 Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

Existem dois tipos de TLS, sendo o tipo 1 para quantificar a produção aquosa da lágrima reflexa e basal; e a tipo 2, no qual é instilado colírio anestésico, para quantificar apenas a produção basal de lágrima (GELATT, 2013).

Não há padronização sobre realizar o teste de olho aberto ou fechado (BARABINO; CHEN; DANA, 2004). Em oftalmologia médica, os valores de TLS tipo 1 com os olhos abertos mostraram valores mais altos quando comparados aos fechados (NOGUEIRA; HIDA, 2009). Essa diferença pode ser explicada devido ao maior atrito da tira com a córnea durante o reflexo durante a piscar. Entretanto, a desvantagem da realização do TLS com os olhos abertos é a interferência quanto a variações de umidade e temperatura da sala, evaporação, portanto, pode ser menos reprodutível (NOGUEIRA; HIDA, 2009).

2.3 Teste de Osmolaridade da Lágrima

A osmolaridade vem sendo cada vez mais discutida e pesquisada por ter alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da CCS (BARABINO; CHEN; DANA, 2004; LEMP et al., 2011). Há diversos aparelhos para sua mensuração, entretanto, a coleta da lágrima tem sido um fator limitante para sua utilização (BARABINO; CHEN; DANA, 2004), sendo assim, novos aparelhos tem sido

desenvolvidos para suprir essa limitação.

Sebbag et al. (2017) validaram a utilização do Tear Lab™, dispositivo descartável que permite a coleta da lágrima direto do menisco lacrimal em cães com olho seco; com o teste foi possível diagnosticar a CCS em cães, entretanto, relatam dificuldade na realização do exame de animais com deficiência na produção de lágrima, devido à sua diminuição de volume no interior do menisco.

Alternativamente, o aparelho I-pen (I-Med pharma^{inc}) utiliza uma quantidade menor de lágrima e consegue aferir com rapidez e agilidade a osmolaridade, mesmo em pacientes com baixa produção, entretanto, não há estudos na veterinária com cães com CCS e coleta-se a lágrima diretamente com o dispositivo do aparelho.

2.4 Célula tronco mesenquimal na oftalmologia

A utilização de célula tronco mesenquimal vem sendo estudada em SS, sendo o cão um modelo experimental superior aos roedores, considerando a medicina humana (BAKKER et al., 2013).

As CTM têm fatores imunomoduladores, como fator transformador crescimento beta (TGF- β), prostaglandina E2 (PGE2) entre outros, que modulam a inflamação e o seu uso é indicado para o tratamento de doenças imunomediadas (KANG et al., 2008). Além do mais, sua baixa imunogenicidade e seu alto potencial imunorregulatório permitem seu uso alogênico (VILLATORO et al., 2015).

Na literatura veterinária consultada, há dois estudos em que foram utilizadas CTM no tratamento de CCS moderada e grave em cães. Villatoro et al. (2015) realizaram uma única aplicação de CTM-TA alogênica, perilacrimal em 12 cães com CCS e acompanharam os animais depois de três, seis e nove meses. Concluíram que a CTM-TA é uma terapia segura em cães e promove aumento significativo na produção lacrimal além de melhora nos sinais de clínicos.

No segundo estudo, Bittencourt et al. (2016), também após instituir uma única aplicação de CTM-TA alogênica perilacrimal, relataram melhora na produção de lágrima e sinais clínicos. No estudo foram avaliados 15 cães com CCS moderada a grave e acompanhamento aos 7, 14, 21, 28 dias, 6 e 12

meses após a aplicação, observaram normalização do TLS nos cães com CCS moderada e em um com grave.

2.5 Plasma rico em plaquetas na oftalmologia

O PRP é um hemocomponente rico em plaquetas que possuem mais de 30 proteínas bioativas dentre elas as principais citocinas e fatores de crescimento oriundos dos grânulos- α plaquetários (ANITUA et al., 2014).

Estes, por sua vez, promovem a reparação tecidual e influenciam outras células sanguíneas na angiogênese e inflamação local, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator transformador de crescimento β (TGF- β), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I); fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF); e fator de crescimento de ceratinócitos (KGF) (MARX, 2004; VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009; LEE et al., 2013)

A família do TGF- β tem funções importantes no processo de cicatrização como na inflamação, angiogênese, reepitelização, formação de tecido de granulação e conjuntivo, síntese de matriz extracelular, resposta imune, apoptose e diferenciação celular, além de quimiotaxia (CARRINGTON et al., 2006; YU et al., 2010).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o principal mediador do processo de vascularização corneal; auxilia na cicatrização da córnea, entretanto a vascularização pode promover secundariamente a perda da transparência (SUN et al., 2013). O VEGF-A estimula as células endoteliais dos vasos a degradarem a sua membrana basal e a migrarem; além disso, elas liberam matriz metaloproteinases que degradam a matriz extracelular facilitando o deslocamento das células (WITMER et al., 2003).

O PRP é usado com o objetivo de aumentar os efeitos dos fatores de crescimento e citocinas promovendo a reparação tecidual (MARX, 2004; ALIO; ARNALICH-MONTIEL; RODRIGUEZ, 2012).

Este tem sido utilizado com êxito em afecções oculares de superfície, dentre elas: ceratites ulcerativas em cães e em ratos (MERLINI et al., 2014; GANDOLFI, 2016) e humanos (ALIO et al., 2017) e defeito epitelial persistente

(RONCI et al., 2015).

O tratamento com colírio de PRP também foi estudado em olhos secos em humanos, pois sabe-se que os fatores de crescimento e citocinas modulam a inflamação local, tendo como resultado melhora na qualidade do filme lacrimal e nos sinais clínicos (ALIO et al., 2007).

Alio et al. (2007) observaram melhoras significativas em 89% dos casos de pacientes tratados com colírio de PRP. Ademais, o tratamento apresentou redução na inflamação, melhora da qualidade do filme lacrimal e da acuidade visual, assim como nos quadros de ceratites (ALIO et al., 2017). Outro estudo do mesmo grupo com PRP, em 368 pacientes com olhos secos, de moderado a grave, descreveu melhora na superfície ocular com apenas PRP em forma de colírio (ALIO et al., 2017).

Outra via de utilização do PRP é por via subconjuntival, descrita na oftalmologia médica em ceratites químicas (MÁRQUEZ-DE-ARACENA et al., 2007) e em coelhos com ceratite ulcerativa induzida (TANIDIR et al., 2010), ambos com resultados promissores.

Recentemente, Avila; Igua; Mora (2018) aplicaram PRP perilacrimal em humanos, com olhos secos graves, sendo a Síndrome de Sjögren a principal causa. Observaram melhora na produção lacrimal e diminuição da opacidade corneal quando comparado ao grupo tratado apenas com colírio à base de hialuronato de Sódio.

Entretanto, na medicina veterinária, grande parte dos animais acometidos pela CCS são de pequeno porte (GELATT, 2013), o que dificulta a coleta de sangue e contraindica a retirada de grande volume de sangue para a produção do PRP.

O aquecimento do PRP foi desenvolvido para favorecer a utilização de PRP alogênico e em casos que a etiologia de base é autoimune, o intuito é diminuir as proteínas do sistema complemento, do componente inflamatório e Imunoglobulina E (IgE) (ANITUA et al., 2014).

A utilização em vivo do PRP alogênico aquecido em úlceras de córnea em ratos foi bem sucedida e obteve bons resultados (GANDOLFI, 2016).

3 OBJETIVO

3.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar os efeitos clínicos e histopatológicos da superfície conjuntival de cães acometidos naturalmente por ceratoconjuntivite seca e tratados com CTM-TA e PRP alogênica.

Além de correlacionar os resultados do teste de Schirmer com o TRFL, osmolaridade, estesiometria e espessura corneal.

4 HIPÓTESES

Quanto menor a produção de lágrima; menor será o TRFL e a sensibilidade corneal; maior a osmolaridade e a espessura corneal.

A aplicação única de PRP-AA ou CTM-TA pode ser capaz de aumentar a produção lacrimal para padrões próximos dos valores de normalidade.

A injeção perilacrimar de CTM-TA ou PRP-AA é promove melhorara da qualidade do filme lacrimal e superfície ocular.

5 REFERÊNCIAS

ALIO, J. L. et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. **Ophthalmic Research**, v. 39, n. 3, p. 124–129, 2007.

ALIO, J. L. et al. Treatment of Dry Eye Disease with Autologous Platelet-Rich Plasma: A Prospective, Interventional, Non-Randomized Study. **Ophthalmology and Therapy**, 2017.

ALIO, J. L.; ARNALICH-MONTIEL, F.; RODRIGUEZ, A. E. The Role of “Eye Platelet Rich Plasma” (E-Prp) for Wound Healing in Ophthalmology. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 1257–65, 2012.

ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p. 4–15, 2004.

ANITUA, E. et al. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop. **Experimental Eye Research**, v. 119, p. 27–34, 2014.

AVILA, M. Y. Restoration of Human Lacrimal Function Following Platelet-Rich Plasma Injection. **Clinical science**, v. 33, n. 1, p. 33–36, 2014.

AVILA, M. Y.; IGUA, A. M.; MORA, A. M. Randomised, prospective clinical trial of platelet-rich plasma injection in the management of severe dry eye. **British Journal of Ophthalmology**, n. 1, p. bjophthalmol-2018-312072, 2018.

BAKKER, E. et al. Canine mesenchymal stem cells: State of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. **Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 4, p. 225–233, 2013.

BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M. R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: Uses and limitations. **Experimental Eye Research**, v. 79, n. 5, p. 613–621, 2004.

BARABINO, S.; DANA, M. R. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. **Investigative ophthalmology & visual science**,

v. 45, p. 1641–1646, 2004.

BERDOULAY, A.; ENGLISH, R. V.; NADELSTEIN, B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 4, p. 225–232, 2005.

BITTENCOURT, M. K. W. et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. **Cell Medicine**, v. 8, p. 63–77, 2016.

CARRINGTON, L. M. et al. Differential Regulation of Key Stages in Early Corneal Wound Healing by TGF- α Isoforms and Their Inhibitors. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 1886–1894, 2006.

GANDOLFI, M. G. Plasma rico em plaquetas alogênico em úlceras induzidas em córnea de ratos. Dissertação UNESP-Botucatu, 2016.

GANESALINGAM, K. et al. Molecular evidence for the role of inflammation in dry eye disease. **Clinical and experimental**, p. 1–9, 2019.

GAO, J. et al. **The Role of Apoptosis in the Pathogenesis of Canine Keratoconjunctivitis Sicca: The Effect of Topical Cyclosporin A Therapy** *Cornea*, 1 dez. 1998.

GELATT, K. N. *Veterinary Ophthalmology*- 5 ed. In: GILGER, R. E. AND B. C. (Ed.). . Fifth Edition. [s.l: s.n.].

GIRALDO, C. E. et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 2013.

JACKSON, M. A. A Systematic Approach to Dry Eye using LipiFlow Treatment. **Dry Eye Disease**, p. 104–108, 2014.

LAM, H. et al. Tear Cytokine Profiles in Dysfunctional Tear Syndrome Helene. **Am J Ophthalmol.**, v. 147, n. 2, p. 1–19, 2013.

LEE, J. W. et al. Platelet-rich plasma: Quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. **Archives of Plastic Surgery**, v. 40, n. 5, p. 530–535, 2013.

LEIVA, M.; NARANJO, C.; PEÑA, M. T. Comparison of the rebound tonometer (ICare ®) to the applanation tonometer (Tonopen XL ®) in normotensive dogs. **Veterinary Ophthalmology** , v.9, c.1, p. 17–21, 2006.

LEMP, M. A. et al. Tear Osmolarity in the Diagnosis and Management of Dry Eye Disease. **AJOPHT**, v. 151, n. 5, p. 792–798.e1, 2011.

LIN, H.; LIN, S.; CHANG, F. EFFECTS OF AUTOLOGOUS SERUM EYE DROPS FOR TREATMENT OF KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA IN DOGS. **Taiwan Veterinary Journal**, v. 44, n. 3, p. 111–117, 2018.

MÁRQUEZ-DE-ARACENA, R. et al. Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocular burns. Preliminary results. **Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia**, v. 82, p. 475–481, 2007.

MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489–496, 2004.

MERLINI, N. B. et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1742–1750, 2014.

NEBBIOSO, M.; REGNO, P. DEL; GHARBIYA, M. Analysis of the Pathogenic Factors and Management of Dry Eye in Ocular Surface Disorders. **International Journal of Molecular Sciences Review** , n. CL, p. 1–19, 2017.

NOGUEIRA, D. C.; HIDA, R. Y. Schirmer test performed with open and closed eyes : variations in normal individuals. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 72, n. 41, p. 65–67, 2009.

RONCI, C. et al. Platelet-rich plasma as treatment for persistent ocular epithelial defects. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 52, n. 3, p. 300–304, 2015.

SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Veterinary Ophthalmology**, v. 1, p. 7–11, 2001.

SCHAUMBERG, D. A. et al. Prevalence of dry eye syndrome among US women. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 2, p. 318–326, 2003.

SEBBAG, L. et al. Assessment of tear film osmolarity using the TearLab™ osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 4, p. 357–364, 2017.

SUN, Y. et al. H-RN , a peptide derived from hepatocyte growth factor , inhibits corneal neovascularization by inducing endothelial apoptosis and arresting the cell cycle. **BMC Cell Biology**, v.13, c.8, 2013.

TANIDIR, S. T. et al. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. **Cornea**, 2010.

VAN BLOKLAND, S. C. A.; VERSNEL, M. A. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: Characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy. **Clinical Immunology**, v. 103, n. 2, p. 111–124, 2002.

VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Rev. bras. cir. plást**, v. 24, n. 2, p. 212–218, 2009.

VILLATORO, A. J. et al. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

WITMER, A. N. et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 1–29, 2003.

YU, F. X. et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin journal**, v. 81, p. 229–235, 2010.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: [s.n.]. v. 5

Capítulo 1

USO ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO E PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃO

Trabalho a ser enviado para a revista *Research in Veterinary Science*

USO ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO E PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃO

RESUMO

O objetivo do presente estudo é avaliar se a aplicação única de Célula tronco mesenquimal de tecido adiposo (CTM-TA) e plasma rico em plaquetas alogênico aquecido (PRP-AA) perilacrimar em cães com CCS espontânea aumenta a qualidade do filme lacrimal, bem como diminui a inflamação e sinais clínicos da doença e se há diferença na resposta segundo o grau de gravidade da doença. Para isso, foram utilizados 20 cães (40 olhos) com CCS espontânea, com produção lacrimal $<15\text{mm/min}$ no teste lacrimal de Schirmer 1 (TLS) e distribuídos aleatoriamente em dois grupos. O grupo 1 (GCTM-TA) e grupo 2 (GPRP-AA) que receberam na glândula lacrimal principal (5×10^6 de CTM-TA e 0,7mL de PRP-AA) e da terceira pálpebra (3×10^6 de CTM-TA e 0,3mL de PRP-AA). Os mesmos foram avaliados em quatro momentos (M0, M15, M30 e M60 dias), sendo M0 a avaliação antes da aplicação. As variáveis avaliadas foram: osmolaridade da lágrima; TLS; sensibilidade corneal; tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL); pressão intraocular; espessura corneana; e biopsia da conjuntiva bulbar, além das variáveis clínico-oftalmológicas ($p < 0,05$). Houve uma melhora nos dois grupos a partir de M15 ($p < 0,05$) na qualidade do filme lacrimal, avaliada por meio da osmolaridade e TRFL, sem diferença entre os grupos. O TLS aumentou, entretanto, só houve diferença estatística nos animais com CCS discreta no GPRP-AA a partir do M30 e com CCS grave a partir do M30 no GCTM-TA e no M60 no GPRP-AA. Verificou-se melhora dos sinais clínicos da inflamação em ambos os grupos. Aplicação perilacrimar única de CTM-TA e PRP aquecido alogênicos normaliza a qualidade do filme lacrimal e melhora os sinais clínicos da inflamação em cães com CCS e a resposta ao tratamento está associada a gravidade da doença. O PRP alogênico aquecido perilacrimar é uma opção de terapia única com menor custo de produção.

Palavras chave: Osmolaridade; teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL); síndrome do olho seco; síndrome Sjögren; I-pen.

ABSTRACT

The objective of this study is to compare and evaluate the application of allogenic mesenchymal stem cell adipose derived (MSCs-AD) and platelet-rich plasma heated allogenic (PRP-HA), perilacrimal in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS), and if there is difference in the response according to the degree of severity of the condition. Twenty dogs with lacrimal production <15mm/min and randomly assigned to two groups were used. Group treated with MSCs-AD (5x10⁶ and 3x10⁶) (GMSCs-AD) and with PRP-HA (0.7ml and 0.3ml) (GPRP-HA), both intralacrimal in the main lacrimal glands and third eyelid, respectively. They were evaluated in four moments after application (M0 M15, M30, M60). The variables evaluated were: osmolarity of the tear; Schirmer's tear test (STT); sensitivity corneal; tear film break-up time (TBUT); intraocular pressure; corneal thickness; and biopsy of the bulbar conjunctiva, in addition to clinical-ophthalmologic variables. There was improvement in the two groups from M15 (p <0.05) on tear film quality, assessed by osmolarity and TBUT, with no difference between groups. STT increased, however, only statistical difference was observed in animals with mild KCS in the GPRP-HA from the M30 and in the intense KCS from the M30 in the GMSCs-AD and in the M60 in the GPRP-HA. There was an improvement in the clinical signs of inflammation in both groups. The unique Intralacrimal application of MSCs-AD and PRP-HA normalizes tear film quality and improves clinical signs of inflammation in dogs with KCS, response to treatment is associated with disease severity. Intralacrimal PRP allogenic heated is an adjunct therapy option with lower cost of production.

Keywords: Osmolarity, tear film break-up time (TFBT); dry eye; Sjogren syndrome; I-pen.

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou Síndrome do olho seco é uma doença que afeta tanto cães como humanos (Gelatt, 2013), atingindo cerca de 30 milhões de pessoas na América, representando a afecção ocular mais comum em humanos (Jackson, 2014) e cães (English e Gilger, 2013).

Nos cães, a produção da porção aquosa da lágrima, é feita pela glândula principal e a da terceira pálpebra, sendo estas, responsáveis por aproximadamente 70 e 30% , respectivamente (Gelatt, 2013).

O tratamento convencional remete a aplicação diária de lágrimas artificiais e em alguns casos o uso de anti-inflamatório e imunomoduladores por via tópica em que se faz necessário o uso contínuo (Berdoulay et al., 2005). Na medicina veterinária, o uso de medicação diária se torna um desafio para o sucesso do tratamento pois, em muitos casos, depende da disponibilidade do tutor além do fato de que alguns animais não permitem a manipulação adequada.

Segundo a literatura consultada, verificou-se dois trabalhos que utilizaram células tronco mesenquimal do tecido adiposo (CTM-TA) alogênica no tratamento de CCS em cães e ambas apresentaram resultados satisfatórios (Villatoro et al., 2015; Bittencourt et al., 2016).

Outra alternativa de tratamento para CCS é a aplicação perilacrimar de PRP, que foi utilizada em humanos com síndrome do olho seco grave e obtiveram bons resultados (Avila et al., 2018).

Entretanto, na medicina veterinária, a maior parte dos animais acometidos pela CCS são de pequeno porte (Gelatt, 2013), o que dificulta a coleta de sangue e contraindica a retirada de grande volume de sangue para a produção do PRP.

O aquecimento do PRP foi desenvolvido para a aplicação de PRP alogênico e indicado especialmente nos casos que apresentam etiologia de base autoimune, com o intuito de diminuir as proteínas do sistema complemento, componentes inflamatórios e Imunoglobulina E (IgE) (Anitua et al., 2014).

Contudo, não há relatos do uso de plasma rico em plaquetas alogênico aquecido (PRP-AA) perilacrimar no tratamento de CCS em cães, tampouco comparando-o à aplicação de CTM-TA, o que estimulou o desenvolvimento do presente estudo.

Diante deste contexto, o estudo tem como objetivo avaliar se uma única aplicação é capaz de melhorar a qualidade/quantidade do filme lacrimal e superfície ocular. Bem como, se olhos com CCS mais grave respondem de forma diferente aos olhos com CCS discreta à moderada.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi enviado à Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) Campus de Botucatu, processo CEUA 0048/2018 e realizado de acordo com as normas da “Association for Research in Vision and Ophthalmology” (ARVO).

Foram utilizados 20 cães (40 olhos), machos e fêmeas, sem predileção por raça, provenientes do Serviço de Oftalmologia da FMVZ diagnosticados há pelo menos seis meses com CCS, com TLS <15mm/min. Adicionalmente, outros critérios de exclusão foram estabelecidos como animais portadores de moléstias infecciosas, com histórico de cinomose, submetidos à excisão cirúrgica da glândula da terceira pálpebra e administração recente de sulfonamida sistêmica, atropina local e imunomoduladores, com um período de washout superior há dois meses.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=20 olhos) e avaliados por um único avaliador cego, sem conhecimento do referido grupo experimental. No grupo 1 (GCTM-TA) os cães receberam aplicação de dose única de célula tronco alogênica perilacrimal e no grupo 2 (GPRP-AA), aqueles que receberam dose única de PRP-AA. Ao final do experimento, os olhos de cada grupo experimental foram classificados segundo o TLS, em CCS discreta (14-11mm/min), moderado (10-6mm/min) e CCS grave (5-0mm/min) (Gelatt, 2013).

O protocolo utilizado para a obtenção do PRP foi o descrito por Merlini et al., (2014) e foi utilizado um único cão doador, saudável ao exame clínico e hematológico, de cinco anos de idade. Foi utilizado PRP com concentração maior que três vezes a concentração de plaquetas plasmático, em seguida foi aquecido durante uma hora na temperatura de 56°C (Anitua et al., 2014).

O processamento do PRP-AA foi realizado um dia antes da aplicação e mantido refrigerado à 4°C. O volume de 1ml foi distribuído conforme a porcentagem de produção lacrimal descrita para o cão, sendo aplicado 0,7ml na glândula principal e 0,3ml na glândula da terceira pálpebra.

O cultivo das CTM-TA foi baseado no descrito por Villatoro et al. (2015), as células foram analisadas por imunofluorescência, previamente, para os marcadores: CD34; CD90; CD45; CD106; CDC11B; e STRO1. Além disso, a caracterização das células para analisar o potencial de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos também foi realizada. As células apresentaram marcadores compatíveis para células mesenquimais, assim como, as que se diferenciaram nas três linhagens testadas.

Após a caracterização, as células foram criopreservadas, e logo após o descongelamento, as mesmas foram ressuspensas e aplicadas em um intervalo menor que duas horas. No GCTM-AD foi aplicado CTM-TA perilacrimal, na concentração de 5×10^6 na glândula principal e 3×10^6 glândula da terceira pálpebra (Villatoro et al., 2015).

A aplicação foi realizada sob anestesia geral, utilizando o seguinte protocolo anestésico: meperidina (4mg/kg/IM) e propofol (6mg/Kg/IV); bem como foram adotados os critérios de assepsia e antisepsia cirúrgica. A agulha 25x7 BD[®] acoplada à seringa de 1mL foi inserida no terço temporal da pálpebra superior, sentido ao fórnice conjuntival da mesma, na região dorsolateral do bulbo ocular, abaixo do ligamento orbital (Villatoro et al., 2015) e foi introduzida cerca de 4mm de profundidade. Em seguida, a terceira pálpebra foi exposta e procedeu-se a aplicação na base da terceira pálpebra.

Todos os animais foram avaliados antes da aplicação (M0), e aos 15 (M15), 30 (M30) e 60 (M60) dias após aplicação. Em todos os momentos, os cães foram examinados pelo mesmo avaliador, às cegas. As variáveis clínico-oftalmológicas analisadas foram: hiperemia conjuntival; vascularização, opacidade e pigmentação corneal; classificadas em uma escala de 0 a 3, sendo 0- ausente, 1- discreto, 2- moderado e 3- grave (Merlini et al., 2014).

Os testes oftalmológicos foram realizados na seguinte ordem: Osmolaridade (I-pen I-med[®]), TLS (Ophthalmos[®]); Estesimetria (Cochet-Bonnet esthesiometer, Luneau Ophthalmologie, Paris); TRFL; Tonometria (TONOPEN-XL), instilado previamente colírio anestésico (Anestalcon); Paquimetria corneal (paquímetro portátil SP-100 – Tomey- Japan) (Apêndice).

A histologia da conjuntiva bulbar foi realizada na conjuntiva bulbar superior, sendo coletado fragmento de 3x3 mm a 5 mm do limbo, no M0 e M60; este foi fixado em formalina tamponada a 10%, submetida ao processo histológico em seguida corada

com hematoxilina-eosina (HE) e por ácido periódico de Schiff (PAS). Após isso, as amostras foram avaliadas por um único avaliador às cegas e classificadas de 1 a 4, sendo 1- ausente (0%), 2- discreto (1-30%) e 3 - moderado (31-70%) 4 - grave (71-100%), conforme a presença de células inflamatórias, e queratinização conjuntival. O espessamento epitelial foi aferido em seis pontos, sendo dois pontos mais espessos, dois pontos mais finos e dois pontos medianos. A avaliação das células calciformes foi avaliada de 1 a 4, sendo: 1- ausente; 2- discreto, de uma célula a duas por campo; 3- moderado, de duas a dez células por campo; 4- grave, mais de dez células por campo na objetiva de 40x.

O estudo comparativo dos grupos experimentais avaliados, nos diferentes momentos de avaliação, foi realizado pela técnica da análise de variância para modelo de medidas repetidas em grupos independentes (Zar, 2009). Foi adotada a resolução paramétrica se a variável resposta mostrou aderência à distribuição normal de probabilidades; do contrário, a opção foi pela análise não paramétrica. Em ambas situações o estudo foi complementado pelo teste de comparações múltiplas (Bonferroni-paramétrico ou Dunn- não paramétrico).

Foram analisadas a correlação linear de Pearson entre as variáveis Schirmer, osmolaridade, sensibilidade, espessura corneal e TRFL. O tamanho amostral de cada grupo foi determinado em 10 animais (cães), foi estabelecido considerando um nível de 5% de significância e um poder de 80% para um erro de estimação da ordem de 0,50 (Cochran, 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 animais, dez eram machos e dez eram fêmeas. Oitenta por cento dos animais pesavam menos que 8kg corroborando o achado na literatura (Lin et al., 2018), o que dificulta a coleta de um volume grande de sangue para a obtenção de um hemoderivado autólogo (Lin et al., 2018)

Não houve diferença entre olho esquerdo e olho direito nas diferentes variáveis analisadas ($p>0,05$) dessa forma, foi realizada análise total dos grupos GCTM-AD e GPRP-AA e posteriormente em subgrupos considerando a gravidade da CCS do olhos, conforme proposto segundo o TLS, sendo CCS discreta 14-11mm/min (GCTM-AD=6 e GPRP-AA=7), moderado 10-6mm/min(GCTM-AD=4 e GPRP-AA=3) e CCS grave 5-0mm/min (GCTM-AD=10 e GPRP-AA=10) (Gelatt, 2013).

A produção lacrimal aumentou quantitativamente após a instituição dos tratamentos propostos, entretanto, quando comparado o GCTM-AD e GPRP-AA, não houve estatística entre os momentos e grupos (Fig. 1).

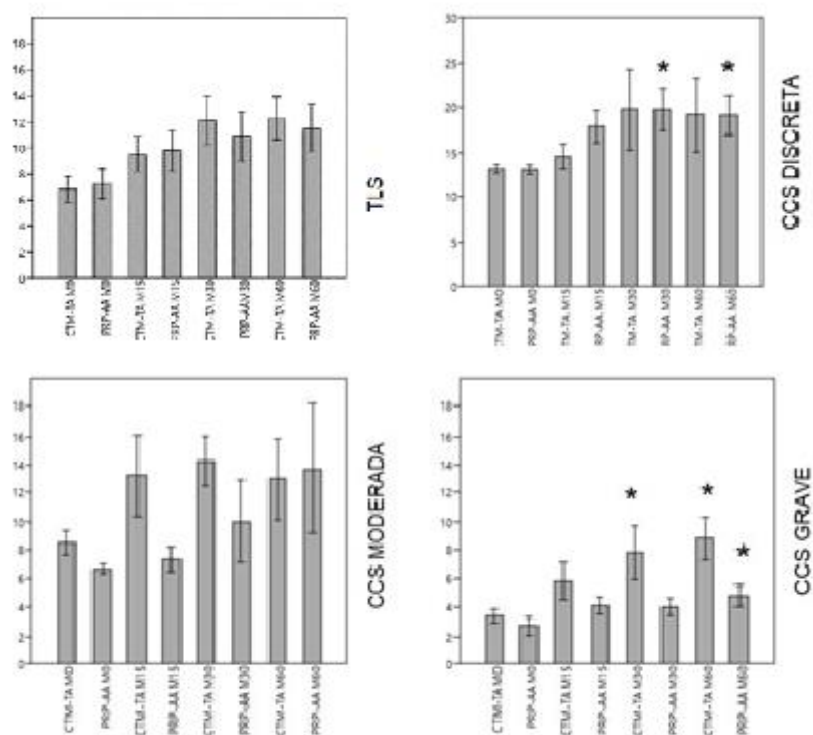


Figura 1 Distribuição da produção lacrimal pelo Teste lacrimal de Schirmer 1 (TLS) nos grupos GCTM-AD, GPRP-AA e subgrupos experimentais CCS discreta, moderada e grave, nos diferentes momentos de avaliação. Legenda: CTM-TA- célula tronco mesenquimal de tecido adiposo (GCTM-AD); PRP-AA- plasma rico em plaquetas aquecido alogênico (GPRP-AA). TLS (mm/min). *diferença significativa entre o M0 e demais momentos avaliados, fixando o grupo experimental ($p < 0,05$).

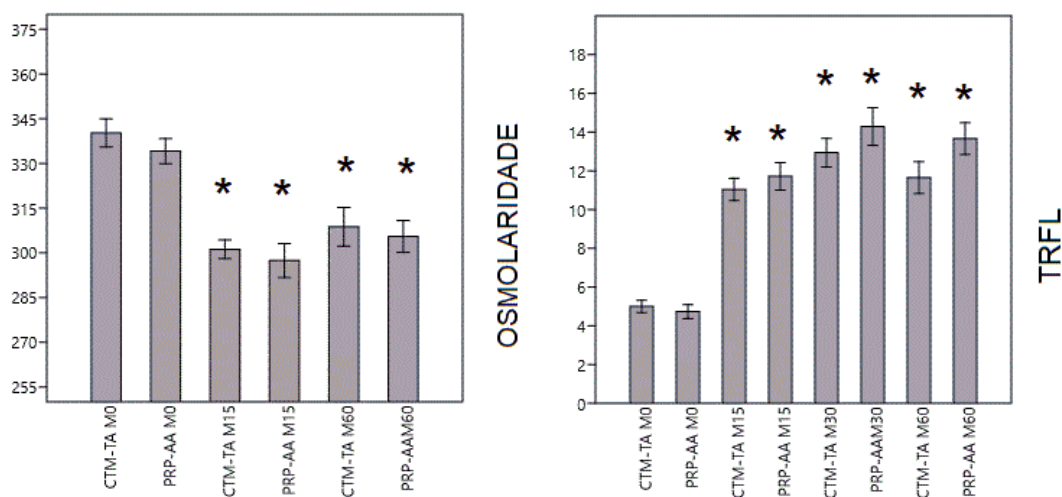
Ao analisar os dados quanto à gravidade dos sinais clínicos nos grupos experimentais, os olhos com CCS discreta no GPRP-AA apresentaram aumento ($p < 0,05$) no TLS a partir do M30 (Fig 2), destaca-se não temos conhecimento de estudos anteriores com o uso de PRP-AA injetável em cães.

Esta resposta foi similar ao descrito na oftalmologia médica por Avila, (2014) e Avila; Igua; Mora, (2018), com o uso do PRP autólogo injetável perilacrimar, os autores descreveram aumento significativamente do TLS após quatro semanas da primeira aplicação (Avila, 2014; Avila et al., 2018). Apesar do aumento significativo apenas no GPRP-AA, nos dois grupos a média do TLS normalizou no M15.

Nos animais com CCS grave, a produção lacrimal aumentou ($p<0,05$) a partir do M30 no GCTM-AD e no M60 no GPRP-AA, quando comparado com o M0. Villatoro et al. (2015) utilizaram a mesma concentração de CTM-TA alogênica e obtiveram aumento significativo do TLS após três meses da aplicação e a média do TLS inicial foi de 5mm/min, sendo animais com CCS grave à moderada.

O mesmo resultado foi encontrado por Bittencourt et al. (2016), no grupo com CCS grave, corroborando ao encontrado no subgrupo CCS grave. Entretanto, nos animais com CCS moderada, não houve diferença estatística no TLS, diferentemente do encontrado por Bittencourt et al., (2016) em animais com CCS discreta à moderada.

Figura 2 Representação gráfica da Osmolaridade (mol/L) e tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos, nos diferentes momentos de avaliação e grupos.



Legenda: CTM-TA- célula tronco mesenquimal de tecido adiposo (GCTM-AD); PRP-AA- plasma rico em plaquetas aquecido alogênico (GPRP-AA). *diferença significativa entre o M0 e demais momentos avaliados, fixando o grupo experimental ($p<0,05$).

A melhora da qualidade do filme lacrimal foi observada pela melhora no TRFL e na osmolaridade, nas quais tiveram resultados significativos ($p<0,05$) a partir no M15 no GCTM-AD e GPRP-AA, quando comparado ao (M0). Não houve diferença entre os grupos (fig. 1), sendo assim, tanto a CTM-TA quanto o PRP são capazes de melhorar a qualidade do filme lacrimal. O mesmo foi descrito por (Bittencourt et al., 2016; Villatoro et al., 2015) que observaram melhora no TRFL em cães tratados com CTM-TA. Assim como, (Avila, 2014; Avila et al., 2018) em humanos tratados com PRP autólogo.

A osmolaridade é considerada um teste de alta sensibilidade e especificidade para diagnosticar a CCS (Barabino et al., 2004). Nos animais selecionados para o estudo a média no M0 foi de $340,20 \pm 21,13$ mOsm/L (GCTM-AD) e $334,76 \pm 19,76$ (GPRP-AA) mOsm/L, similar ao descrito por (Sebbag et al., 2017) em cães Beagle com CCS ($337,4 \pm 16,2$ mOsm/L).

Após o tratamento a osmolaridade média encontrada foi para $301,15 \pm 13,85$ mOsm/L (GCTM-AD) e $301,29 \pm 28,97$ mOsm/L (GPRP-AA) logo no M15, similar ao encontrado em Beagle hígidos $306,2 \pm 18,0$ mOsm/L e mais eficiente que a osmolaridade observada em cães Beagles tratados com ciclosporina 2% duas vezes ao dia por cinco meses ($330,5 \pm 13,7$ mOsm/L) (Sebbag et al., 2017). Do conhecimento dos autores, não se observou estudos utilizando a osmolaridade no tratamento com CTM-TA e PRP injetável em CCS.

A melhora da qualidade do filme lacrimal sugere que o PRP e CTM-TA aumentaram a estabilidade da lágrima e conseqüentemente dos seus componentes, diminuindo a inflamação e aumentando a quantidade de células caliciformes.

Houve melhora da inflamação ocular, avaliada por meio de diversas variáveis, entre elas a pressão intraocular (PIO), na qual, valores abaixo de 10 mmHg indicam uveíte reflexa ou senilidade (Leiva et al., 2006; Gelatt, 2013). No M0 a média encontrada foi de $7,4 \pm 2,96$ (GCTM-AD) e $7,67 \pm 2,3$ mm/Hg (GPRP-AA) e a partir do M15 os animais apresentavam PIO normal (Leiva et al., 2006) com média de $11,95 \pm 4,17$ (GCTM-AD) e $12,19 \pm 2,56$ mmHg (GPRP-AA), resultante de aumento ($p < 0,05$), em ambos os grupos sem diferença entre os tratamentos (Fig. 1).

Além do mais, nenhum animal apresentou PIO acima de 20mm/Hg, sugestivo de glaucoma (Leiva et al., 2006). A PIO também não foi avaliada em nenhum estudo utilizando CTM-TA e PRP em cães com CCS.

Outra variável que demonstrou melhora na inflamação ocular foi a hiperemia conjuntival, na qual observou redução a partir do M15 quando comparado com o M0 no GCTM-AD ($p < 0,01$) e GPRP-AA ($p < 0,05$), similar ao descrito em cães tratados com CTM-TA (Bittencourt et al., 2016; Villatoro et al., 2015) e nos trabalhos com PRP em humanos com CCS, em que também foi relatada melhora na inflamação com a aplicação de PRP, avaliado por meio de questionários (Giraldo et al., 2013; Avila, 2014; Alio et al., 2017; Avila et al., 2018).

Em decorrência dos cães serem distribuídos aleatoriamente nos grupos, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos GCTM-AD e GPRP-AA no M0 e no

M15 ($p < 0,05$), animais do GCTM-AD (2,5) tinham escore de hiperemia conjuntival superior aos do GPRP-AA (2,0). Porém, nos demais momentos não houve diferença estatística entre os grupos. O mesmo comportamento foi verificado para a quemose no M0 ($p < 0,01$).

Ao classificar em grau de gravidade, pode-se observar diminuição na quemose ($p < 0,05$) apenas nos animais com CCS grave a partir do M15 no GCTM-AD e no M60 no GPRP-AA, sem diferença entre os grupos no M0, o que demonstra que os dois tratamentos melhoram a inflamação conjuntival, com uma resposta mais rápida no GCTM-AD em relação ao GPRP-AA.

Não houve diferença significativa quanto à opacidade corneal entre o GCTM-AD e GPRP-AA, entre os momentos de avaliação. Ao analisar os subgrupos, nos animais com CCS discreta observou-se melhora no M60 em comparação ao M0 no GPRP-AA, nestes sugere-se atuação do PRP na diminuição da opacidade.

No subgrupo de CCS grave houve melhora na opacidade no M60 em comparação ao M0 no GCTM-AD. Bittencourt et al., (2016) observaram que somente nos cães com CCS discreta à moderado houve melhora na opacidade ($p < 0,05$), já nos animais com CCS grave não houve diferença estatística, talvez o referido comportamento pode ser associado a dose de CTM-TA utilizada, uma vez que Bittencourt et al., (2016) utilizaram a concentração de 1×10^6 e neste estudo utilizou-se 5×10^6 na glândula principal e 3×10^6 na da terceira pálpebra.

Nos animais tratados com células tronco foi observada diminuição ($p < 0,05$) da vascularização corneal a partir do M15 em comparação ao M0, diferente do observado por (Bittencourt et al., 2016), que não obtiveram diferenças relacionadas a vascularização considerando os diferentes graus de gravidade da CCS. Possivelmente, o aumento na concentração de células tronco utilizadas pode ter potencializado o seu efeito.

Quando avaliada a vascularização nos subgrupos, apenas os animais com CCS discreta apresentaram diminuição ($p < 0,05$) no GPRP-AA a partir do M30 em relação ao M0. Apesar do PRP ter alta concentração de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), pode-se observar uma diminuição da vascularização corneal, porém, o PRP não foi utilizado diretamente na córnea, o que sugere que a melhora da lágrima e da inflamação proporcionaram essa diminuição.

Quanto ao pigmento e sensibilidade corneal, mensurada por meio da estesiometria, não houve diferença entre os momentos e grupos e subgrupos de CCS,

provavelmente devido à cronicidade dos casos selecionado, pois, todos os animais tinham diagnóstico há pelo menos seis meses.

Na avaliação histopatológica, observou-se melhora significativa na inflamação e quantidade de células calciformes no GPRP-AA, enquanto no GCTM-AD houve redução na queratinização e, conseqüentemente na espessura.

Considerando a classificação por gravidade dos sinais, houve melhora na inflamação e quantidade de células calciformes, entretanto, foi mais evidente ($p < 0,05$) nos animais com CCS grave no GPRP-AA e na espessura no GCTM-AD. A melhora da inflamação no GPRP-AA, tanto na histologia quanto nos sinais clínicos pode ser atribuída à alta concentração de fatores de crescimento, citocinas e metaloproteases encontrados no PRP (Anitua et al., 2004).

Ao analisar a correlação linear de Pearson, notou-se correlação significativa entre o Schirmer e as variáveis: osmolaridade ($r=0,255$; $p < 0,05$); sensibilidade corneal ($r = -0,442$; $p < 0,01$); espessura corneal ($r = -0,504$; $p < 0,01$); TRFL ($r = 0,256$; $p < 0,05$). Demonstrando que quanto menor a quantidade de lágrima produzida, pior será a sua qualidade, mais espessa a córnea e menor a sensibilidade, assim a baixa produção lacrimal está associada às demais alterações na superfície ocular condizentes com a síndrome do olho seco, nos animais avaliados.

Nenhum cão apresentou qualquer tipo de reação adversa à administração do PRP-AA, bem como de CTM-TA, sugerindo que, mesmo sendo de origem de outros indivíduos, porém da mesma espécie, não houve sinais de rejeição, uma vez que o PRP aquecido tem menor concentração de IgE (Anitua et al., 2014) Villatoro et al., 2015; Bittencourt et al., 2016), sendo as duas terapias seguras até o momento final de avaliação.

O efeito da célula tronco ainda não foi bem elucidado (Zouukhri, 2010), entretanto, acredita-se que a melhora no GCTM-AD seja pelo efeito de modulação da inflamação, uma vez que há infiltrados de células imunes nas glândulas lacrimais, melhorando a inflamação causada pela CCS (Villatoro et al., 2015), outra hipótese seria pela regeneração tecidual da glândula lacrimal com o uso de CTM-TA (Villatoro et al., 2015), porém, ainda não há estudos que a comprovem.

Mais estudos são necessários e devem ser estimulados para avaliar a efetiva atuação das células tronco e do PRP na fisiopatologia da CCS, bem como a resposta em longo prazo e, intervalo necessário de reaplicação.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a aplicação perilacrimonial única de CTM-TA ou PRP aquecido, ambos alogênicos, é capaz de normalizar a qualidade do filme lacrimal, reduzir a osmolaridade da lágrima, bem como os sinais de inflamação, promovendo melhora na superfície ocular em cães com CCS.

A produção lacrimal aumenta após a aplicação de PRP-AA em CCS discreta e de CTM-TA e PRP em CCS grave. A resposta ao tratamento depende da gravidade e estadiamento da doença.

REFERÊNCIAS

- Aalio, J.L., Colecha, J.R., Pastor, S., Rodriguez, A., Artola, A. 2007. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* 39, 124-129.
- Alio, J.L., Rodriguez, A.E., Ferreira-Oliveira, R., Wróbel-Dudzińska, D., Abdelghany, A.A. 2017. Treatment of dry eye disease with autologous platelet-rich plasma: a prospective, interventional, non-randomized study. *Ophthalmol. Ther.* 6, 285-293.
- Alio, J.L., Arnalich-Montiel, F., Rodriguez, A.E., 2012. The role of “eye platelet rich plasma” (e-prp) for wound healing in ophthalmology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1257–1265.
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T., 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91, 4–15.
- Anitua, E., Muruzabal, F., De la Fuente, M., Merayo-Llodes, J., Orive, G., 2014. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop. *Exp. Eye Res.* 119, p. 27–34.
- Avila, M.Y., 2014. Restoration of human lacrimal function following platelet-rich plasma injection. *Cornea.* 33, 33–36.
- Avila, M.Y., Igua, A.M., Mora, A.M., 2018. Randomised, prospective clinical trial of platelet-rich plasma injection in the management of severe dry eye. *Br. J. Ophthalmol.* Jul. 3. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312072.
- Bakker, E., Van Ryssen, B., De Schauwer, C., Meyer, E., 2013. Canine mesenchymal stem cells: State of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Vet. Q.* 33, 225–233.
- Barabino, S., Chen, W., Dana, M.R., 2004. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: Uses and limitations. *Exp. Eye Res.* 79, 613–621.

- Barabino, S., Dana, M.R., 2004. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 45, 1641–1646.
- Berdoulay, A., English, R.V., Nadelstein, B., 2005. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Ophthalmol.* 8, 225–232.
- Bittencourt, M.K.W., Barros, M.A., Martins, J.F., Vasconcellos, J.P., Morais, B.P., Pompeia, C., Bittencourt, M.D., Evangelho, K.D., Kerkis, I., Wenceslau, C.V., 2016. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Cell Med.* 8, 63–77.
- Carrington, L.M., Albon, J., Anderson, I., Kamma, C., Boulton, M., 2006. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by *tgf- β* isoforms and their inhibitors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1886–1894.
- Gandolfi, M.G., 2016. Plasma rico em plaquetas alogênico em úlceras induzidas em córnea de ratos [dissertation]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu.
- Ganesalingam, K., Ismail, S., Sherwin, T., Craig, J.P., 2019. Molecular evidence for the role of inflammation in dry eye disease. *Clin. Exp. Optom.* Jan 10. doi: 10.1111/cxo.12849.
- Gao, J., Schwalb, T.A., Addeo, J.V., Ghosn, C.R., Stern, M.E., 1998. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin a therapy. *Cornea.* 17, 654–663.
- Gelatt, K.N., Gilger, R.E., Kem, T.J., 2013. *Veterinary Ophthalmology*, five ed. Wiley-Blackwell, Ames.
- Giraldo, C.E., López, C., Álvarez, M.E., Samudio, I.J., Prades, M., Carmona, J.U., 2013. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.* 9, 29.
- Jackson, M.A., 2014. A systematic approach to dry eye disease a systematic approach to dry eye using lipiflow treatment. *US Ophthalmic Rev.* 7, 104–108.
- Lam, H., Bleiden, L., de Paiva, C.S., Farley, W., Stern, M.E., Pflugfelder, S.C., 2013. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear Syndrome Helene. *Am. J. Ophthalmol.* 147, 1–19.
- Lee, J.W., Kwon, O.H., Kim, T.K., Cho, Y.K., Choi, K.Y., Chung, H.Y., Cho, B.C., Yang, J.D., Shin, J.H., 2013. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of

- growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch. Plastic Surg.* 40, 530–535.
- Leiva, M., Naranjo, C., Peña, M.T., 2006. Comparison of the rebound tonometer (ICare ®) to the applanation tonometer (Tonopen XL ®) in normotensive dogs. *Vet. Ophthalmol.* 9, 17–21.
- Lemp, M.A., Bron, A.J., Baudouin, C., Benítez Del Castillo, J.M., Geffen, D., Tauber, J., Foulks, G.N., Pepose, J.S., Sullivan, B.D., 2011. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am. J. Ophthalmol.* 151, 792–798.e1.
- Lin, H., Lin, S., Chang, F., 2018. effects of autologous serum eye drops for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Taiwan Vet. J.* 44, 111–117.
- Márquez-de-Aracena, R., Montero-de-Espinosa, I., Muñoz, M., Pereira, G., 2007. Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocular burns. Preliminary results. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 82, 475-481.
- Marx, R.E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac. Surg.* 62, 489–496.
- Merlini, N.B., Fonzar, J.F., Perches, C.S., Sereno, M.G., Souza, V.L., Estanislau, C.A., Rodas, N.R., Ranzani, J.J.T., Maia, L., Padovani, C.R., Brandão, C.V.S., 2014. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66, 1742–1750.
- Nebbioso, M., Del Regno, P., Gharbiya, M., Sacchetti, M., Plateroti, R., Lambiase, A., 2017. Analysis of the pathogenic factors and management of dry eye in ocular surface disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 18, pii: E1764.
- Serruya, L.G., Nogueira, D.C., Hida, R.Y., 2009. Schirmer test performed with open and closed eyes : variations in normal individuals. *72*, 65–67.
- Ronci, C., Ferraro, A.S., Lanti, A., Missiroli, F., Sinopoli, S., Del Proposto, G., Cipriani, C., De Felici, C., Ricci, F., Ciotti, M., Cudillo, L., Arcese, W., Adorno, G., 2015. Platelet-rich plasma as treatment for persistent ocular epithelial defects. *Transfus. Apher. Sci.* 52, 300–304.
- Saito, A., Kotani, T., 2001. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Vet. Ophthalmol.* 4, 7-11.
- Schaumberg, D.A., Sullivan, D.A., Buring, J.E., Dana, M.R., 2003. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am. J. Ophthalmol.* 136, 318–326.
- Sebbag, L., Park, S.A., Kass, P.H., Maggs, D.J., Attar, M., Murphy, C.J., 2017.

- Assessment of tear film osmolarity using the TearLab™ osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Ophthalmol.* 20, 357–364.
- Sun, Y., Su, L., Wang, Z., Xu, Y., Xu, X., 2013. H-RN, a peptide derived from hepatocyte growth factor, inhibits corneal neovascularization by inducing endothelial apoptosis and arresting the cell cycle. *BMC Cell Biol.* 14, 8.
- Tanidir, S.T., Yuksel, N., Altintas, O., Yildiz, D.K., Sener, E., Caglar, Y., 2010. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea.* 29, 664-669.
- Van Blokland, S.C.A., Versnel, M.A., 2002. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy. *Clin. Immunol.* 103, 111–124.
- Vendramin, F., Franco, D., Franco, T., 2009. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 24, 212–218.
- Villatoro, A.J., Fernández, V., Claros, S., Rico-Llanos, G.A., Becerra, J., Andrades, J.A., 2015. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int.* 2015, 527926.
- Witmer, A.N., Vrensen, G.F., Van Noorden, C.J., Schlingemann, R.O., 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 1-29. Review.
- Yu, F.S., Yin, J., Xu, K., Huang, J., 2010. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res. Bull.* 81, 229-235.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, Third ed. Prentice Hall International, Upper Saddle River.

APÊNCICE

Detalhamento dos testes oftalmológicos realizados:

Os testes oftalmológicos foram realizados na seguinte ordem:

Osmolaridade, por meio do I-pen (I-med®), seguindo as instruções do fabricante; A tira do TLS foi (Ophthalmos®) inserido na porção temporal do saco conjuntivo inferior e as pálpebras foram mantidas fechadas por 60 segundos

A Estesiometria, por meio do estesiometro de Cochet-Bonnet (esthesiometer, Luneau Ophthalmologie, Paris), os valores obtidos em mm, foram convertidos em g/mm², utilizando-se tabela do próprio aparelho para a conversão apropriada

O Teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) foi realizado com instilação previa de fluoresceína e sob a luz de cobalto foi cronometrado o tempo da quebra do filme lacrimal

Para a Tonometria, foi instilado previamente colírio anestésico (Anestalcon®) cloridrato de proximetacaína 5 mg/ml, sendo realizadas cinco medidas consecutivas e somente foram utilizados os valores com 5% de desvio padrão.

A Paquimetria corneal foi realizada previamente ao início do tratamento (M0). A instilação previa de proximetacaína 0,5% foi realizada, utilizando-se o paquímetro portátil (SP-100 – Tomey- Japan).

Detalhamento do exame histopatológico realizados:

Foi coletado um fragmento conjuntival de 3x3 mm da região superior do bulbo ocular com cerca de 5 mm de distância do limbo, fixado em formalina tamponada a 10% em seguida foi processado e realizado a coloração de hematoxilina-eosina (HE) e por ácido periódico de Schiff (PAS).

Detalhamento do cultivo de célula tronco:

No cultivo de CTM-TA foi o descrito por Villatoro et al., (2015) foram isoladas e cultivadas células tronco a partir de uma única cadela clinicamente saudável, desta coletou-se um fragmento periovariano de tecido adiposo durante cirurgia de castração eletiva. Em seguida, o material foi pesado, fragmentado e misturado com PBS, adicionado colagenase tipo II 0,1% e

encubado à 37°C durante 90 minutos em agitação orbital. Após a encubação, as células em suspensão foram centrifugadas e filtradas e depois centrifugadas novamente à 400 g por cinco minutos.

Após a centrifugação, o “pellet” foi separado e lavado. As culturas primarias foram realizadas em frascos 75cm² com Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM-F12), juntamente com soro fetal bovino e solução antibacteriana e antimicótica (anfotericina B, penicilina e estreptomicina) (Anti-Anti antibiotic - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América). A troca dos meios foi realizada a cada 72 horas e sendo feitas apenas duas passagem.

