

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/01/2025.

**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

2023

**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.

2023

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

FABRÍCIO SINGARETTI DE OLIVEIRA

Data: 05/07/2023 15:27:24-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

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

Documento assinado digitalmente

ANNELISE CARLA CAMPESINI DOS SANTOS

Data: 05/07/2023 10:52:09-0300

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 Exc
Santana/BA

Documento assinado digitalmente

RENATA MARIA MONÇÃO DA SILVA

Data: 05/07/2023 09:11:34-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente

TIAGO BARBALHO DE LIMA

Data: 04/07/2023 08:37:26-0300

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. Graduou-se em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense (IFC) – Câmpus de Araquari, em fevereiro de 2018. Mestre 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 Littrasso 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.

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.

Fabiana Pilarski
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 calciformes. 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 calciforme 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 calciforme 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.

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.

3. CONCLUSÕES

Conclui-se que a evidência de célula calciforme 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.

4. AGRADECIMENTOS

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

5. 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 limbais 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, poster.

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 Universitesi 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 Universitesi 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.

Patrino 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.

Puangrucharern 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.