

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/04/2021.

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 adposo
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) perilacrimar 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 lacrimal $<15\text{mm}/\text{min}$ 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 perilacrimar nas glândulas lacrimal 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 lacrimal de Schirmer (TLS); sensibilidade corneal; tempo de ruptura do filme lacrimal (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 lacrimal, 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 perilacrimar 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.

Palavras chave: Osmolaridade; Teste de ruptura do filme lacrimal (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.

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 TM 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.