

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AUTOTRANSPLANTE DA FRAÇÃO MONONUCLEAR
DA MEDULA ÓSSEA EM ÚLCERA CORNEANA POR
HIDRÓXIDO DE SÓDIO EXPERIMENTAL EM CÃES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Kanciukaitis Tognoli

Santa Maria, RS, Brasil

2008

AUTOTRANSPLANTE DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA EM ÚLCERA CORNEANA POR HIDRÓXIDO DE SÓDIO EXPERIMENTAL EM CÃES

por

Guilherme Kanciukaitis Tognoli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Ney Luis Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AUTOTRANSPLANTE DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA
ÓSSEA EM ÚLCERA CORNEANA POR HIDRÓXIDO DE SÓDIO
EXPERIMENTAL EM CÃES**

elaborada por
Guilherme Kanciukaitis Tognoli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Ney Luis Pippi, Dr, PhD.
(Presidente/Orientador)

Alceu Gaspar Raiser, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Lissandra Dal Lago, Dr, (UFSM)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2008.

DEDICATÓRIA

A meus pais e à Mariana, fontes de amor incondicional e pessoas que sem a ajuda e compreensão, este trabalho não seria possível. Minha eterna gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu orientador Prof Ney Luis Pippi, grande mestre de todas as horas, pela ajuda e credibilidade em mim depositada, os meus profundos agradecimentos e admiração.

Aos professores Adriano Bonfim Carregaro, Alceu Gaspar Raiser, Alexandre Mazzanti e Sônia T. A. Lopes, pelo compartilhamento dos conhecimentos e da amizade e aos funcionários do HVET, em especial, Anita, Belonir, Lúcia e Nelci.

Aos pós-graduandos do LACE: Charles, Daniel, Danieli, Débora, Diego, Eduardo, Fabiano, Fabrício, Fernando, Gabriele, Graziela, Josaine, Kleber, Laetícia, Lisiane, Marina Gabriela, Rafael e os estagiários Arícia, Franciele, João Paulo, Lourenço, Maicon, Melissa, Paula, Priscila, Régis e Tiago pela ajuda em terras gaúchas.

À minha família, à família Carvalho-Rosa e a meus amigos-irmãos de Brasília pelo apoio.

Aos doutores Márcio Botelho Castro e Horácio pelo auxílio com as lâminas da histopatologia. Eduardo Flores e Renata Dezengrini pela possibilidade de utilização dos recursos do Laboratório de Virologia Veterinária da UFSM. Arne Böyum pela atenção e acessibilidade.

Aos Professores Sérgio Fialho e Felipe Wouk pelo incentivo e apoio.

Às empresas Ophthalmos, Ourofino Saúde Animal, Rioquímica e Vetbrands pela cessão dos materiais solicitados.

Aos animais do experimento, minhas desculpas e meu agradecimento imensurável.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

AUTOTRANSPLANTE DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA EM ÚLCERA CORNEANA POR HIDRÓXIDO DE SÓDIO EXPERIMENTAL EM CÃES

Autor: Guilherme Kanciukaitis Tognoli

Orientador: Ney Luis Pippi

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2008.

As células-tronco adulta da medula óssea (MO), em particular a fração de células mononucleares (CM), despertam grande interesse nas pesquisas que visam regeneração tecidual na medicina veterinária, dentre elas, estudos com úlceras de córnea experimentais. Atualmente, acredita-se que o limbo representa a fonte de células-tronco para a reposição de células corneanas lesadas, no entanto, o número de animais que apresentam deficiência límbica com conjuntivalização subsequente aumenta a cada dia. Essa condição pode ser desenvolvida por diversas afecções, em que a queimadura por base é a mais comum. Visando realizar um estudo sobre a confirmação da presença das CM da MO transplantadas, da ocorrência de quimiotaxia (*homing*) das mesmas e comparar histopatologicamente os grupos tratados e controles, utilizou-se um modelo experimental de úlcera de córnea associado ao autotransplante de CM. Dezesesseis cães machos ou fêmeas, sem raça definida, com peso ao redor de 10kg foram submetidos à ulceração experimental de córnea, em que o modelo de queimadura ocular por álcali com papel filtro embebido em hidróxido de sódio foi utilizado. Após a realização das lesões, os animais foram submetidos ao transplante subconjuntival de CM da MO, previamente isoladas. A fração mononuclear foi separada por centrifugação da MO com gradiente de densidade a 678G por 30 minutos e marcada com nanocristais para posterior acompanhamento dos processos de pega e quimiotaxia. A avaliação pós-operatória foi realizada por exames de imunofluorescência no sexto dia após o transplante e por histopatologia passados 15 dias do mesmo procedimento, quando pode se notar que as CM fixaram-se na região lesionada, não sofreram quimiotaxia e, apesar de diminuírem a inflamação do local, não auxiliaram no processo de cicatrização do epitélio corneano em curto prazo. Assim, sugere-se estudos adicionais no transplante de CM da MO na cicatrização da córnea .

Palavras-chave: célula-tronco, medula óssea, fração mononuclear, úlcera de córnea, cão

ABSTRACT

BONE MARROW MONONUCLEAR FRACTION AUTOTRANSPLANT ON EXPERIMENTAL SODIUM HYDROXIDE CORNEAL ULCER IN DOGS

Author: Guilherme Kanciukaitis Tognoli

Advisor: Ney Luis Pippi

Presentation Place and Date: Santa Maria, february, 26th, 2008.

The bone marrow (BM) adult stem cell, mainly the mononuclear cell (MC) fraction, calls great interest in tissue regeneration researches in veterinary medicine, among those, works with experimental corneal ulcers. It is believed that the limbus represents the main stem cell source to replace damaged corneal cells, however, the number of animals showing limbal deficiency with subsequent conjunctivalization increases every day. This condition can be developed for several reasons, where the alkali burn is the most common. Aiming to conduct a study about transplanted BM MC presence confirmation, the homing process and to histopathologically compare the treated and sham groups, an experimental alkali corneal ulcer model, associated with the autologous MC transplant was used. Sixteen male or female, stray dogs, weighing around 10kg were submitted to experimental corneal ulcer, where the sodium hydroxide soaked filter discs alkali burn model was used. After the lesions, the animals were then submitted to subconjunctival autologous BM MC transplantation. The mononuclear fraction was isolated by density gradient centrifugation at 678G for 30 minutes and marked with nanocrystals to engraftment and homing follow-up. The post-operative evaluation was made with immunofluorescence exams in the sixth day after the transplant and for histopathology after 15 days of the same procedure where it could be noticed that the MC fixed in the damaged area, there was no homing phenomenon and despite they reduce the local inflammation, the MC did not help the corneal epithelium cicatrization process in this short term evaluation. Thus BM MC transplant studies in corneal wounds are indicated.

Key words: stem cell, bone marrow, mononuclear fraction, corneal ulcer, dog

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Organograma dos grupos experimentais.....	23
FIGURA 2 – Inserção de agulha para coleta de medula óssea.....	26
FIGURA 3 – Posicionamento do disco de papel para confecção da úlcera.....	27
FIGURA 4 – Teste de fluoresceína.....	28
FIGURA 5 – Halo contendo a fração de células mononucleares.....	29
FIGURA 6 – Fração mononuclear isolada em um eppendorf.....	30
FIGURA 7 – Teste de viabilidade com azul de trypan.....	31
FIGURA 8 – Imunofluorescência das células mononucleares marcadas.....	32
FIGURA 9 – Administração subconjuntival das células mononucleares.....	32
FIGURA 10 – Teste de fluoresceína associado à luz ultravioleta.....	37
FIGURA 11 – Imunofluorescência da impressão da região córneo escleral.....	41
FIGURA 12 – Fotomicrografia da área lesada sem inflamação.....	40
FIGURA 13 – Fotomicrografia comparando espessura do epitélio corneano.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MO – medula óssea
CM – células mononucleares
BM – bone marrow
MC – mononuclear cell
CT – célula-tronco
NaOH – hidróxido de sódio
CTL – célula-tronco límbica
CTH – célula-tronco hematopoética
CTM – célula-tronco mesenquimal
FCM- fração de células mononucleares
g.ml⁻¹ – gramas por mililitro
NC – nanocristais
QD – quantum dots
nm – nanômetros
kg – kilogramas
mg.kg⁻¹ – miligramas por kilograma
OE – olho esquerdo
OD – olho direito
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria
ml.kg⁻¹ – mililitros por kilograma
CPDA – citrato de sódio, adenina, fosfato e dextrose
ml.kg.h⁻¹ – mililitros por kilograma por hora
ml – mililitros
µl – microlitros
µm – micrômetros
µg.kg⁻¹ – microgramas por kilograma
mm – milímetros
2M – dois molar
g.dl⁻¹ – gramas por decilitro
PBS = solução salina tamponada com fosfato
IV = intravenosa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Período trans-operatório.....	21
3.1.1 Isolamento das CM.....	26
3.2 Período pós-operatório.....	28
3.2.1 Avaliação por imunofluorescência.....	30
3.2.2 Avaliação histopatológica.....	30
3.3 Comitê de ética.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Modelo de lesão corneana com NaOH a 2M.....	33
4.2 Separação da fração de células mononucleares da MO.....	34
4.3 Avaliação da localização celular por imunofluorescência indireta.....	35
4.4 Avaliação histopatológica.....	38
5 CONCLUSÕES.....	42
6 REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A ulceração de córnea é a doença ocular mais comum em cães, sendo que as de caráter superficial resolvem-se rapidamente e com mínima formação de tecido cicatricial (STADES et al., 1999); por outro lado, úlceras profundas e complicadas podem levar a sérios déficits visuais devido à cicatriz ou formação de sinéquia anterior, se houver perfuração corneal ou ceratite ulcerativa severa, o que pode acarretar em perda ocular como resultado de endoftalmite, glaucoma ou *Pthisis bulbi* (GELATT, 1991).

As úlceras estromais profundas progressivas requerem terapia agressiva, pois são potencialmente perigosas para a visão e para o bulbo (GONÇALVES, 2000; GELATT, 2003). Para o tratamento dessa condição, os seguintes procedimentos cirúrgicos são preconizados: retalho de terceira pálpebra com pálpebra superior; sutura da terceira pálpebra na conjuntiva dorsolateral; tarsorrafia; recobrimento com tecido conjuntival pediculado ou não; recobrimento com faixa conjuntival; com conjuntiva bulbar; técnicas de sutura corneana; transplante conjuntival livre; recobrimento com enxerto corneano lamelar; transplante livre de córnea a fresco (JENSEN, 1973; GELLAT, 1991; SLATTER & HÅKANSON, 1998; STADES et al., 1999; GELLAT 2003; SLATTER, 2005) ou preservada (GONÇALVES, 2000) e a ceratoplastia com fixação do enxerto por cola de cianoacrilato (BRAGA et al., 2004); no entanto, todas as alternativas existentes apresentam algum tipo de complicação no período pós-operatório.

Nos últimos anos uma nova área da ciência vem sendo desenvolvida, a qual abre perspectivas para a terapia regenerativa potencialmente capaz de alterar o futuro do tratamento das doenças. Essa área é a pesquisa com células-tronco (CT), também denominadas células mãe, que desperta um grande interesse por parte da área médica (NEIVA, 2005), pois constituem a fonte mais promissora da terapia celular para proliferação e diferenciação (HUANG & TSENG, 1991). Essas descobertas no campo da medicina regenerativa levam a crer que, além de originar as células sangüíneas, as CT têm potencial e plasticidade para se transformar em várias outras linhagens celulares (LAKSHMIPATHY et al., 2004), como cardiomiócitos (FUKUDA, 2003), células pancreáticas produtoras de insulina (HESS et al., 2003), hepatócitos

(WANG et al., 2003), pele ou células nervosas do epitélio olfativo (RICE et al., 2003), gordura, polpa dentária, mucosa intestinal, retina, limbo e córnea (DEL CARLO et al., 1999; TOMITA et al., 2002; ZAGO & COVAS, 2004).

No momento, a fonte mais acessível para a terapia com CT é a fração total de células mononucleares (CM) obtidas da medula óssea (MO). A experimentação laboratorial envolvendo essas células evolui rapidamente, mas ainda faltam estudos sobre as diferentes fontes de CT e métodos de purificação e expansão em cultura (ZAGO & COVAS, 2004). O atual estágio de pesquisas com células progenitoras aponta múltiplas possibilidades para reparação tecidual e aceleração dos processos regenerativos (RODRIGUES et al., 2006).

Nesse trabalho, discutir-se-á o transplante autólogo, a implantação e a eficiência da fração de CM de MO em técnica de ulceração corneana experimental com hidróxido de sódio (NaOH) em cães, possibilitando a criação de novas alternativas para auxiliar no tempo e qualidade de cicatrização.

Esta dissertação tem como objetivos avaliar a eficácia do modelo de lesão corneana com discos de papel filtro embebido por hidróxido de sódio, verificar a presença das CM marcadas por nanomarcadores na região límbica e corneana seis dias após a lesão com NaOH a 2M, avaliar a eficiência de marcação celular com nanocristais (NC) e se as células marcadas injetadas por via subconjuntival sofrerão processo de migração (*homing*) para o olho contra lateral seis dias após o transplante nos animais do grupo tratado e ainda, comparar de maneira descritiva o padrão cicatricial dos grupos controle e tratado por histopatologia no período pós-operatório de 15 dias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A túnica mais externa do olho é constituída por esclera opaca e córnea anterior transparente. A zona de transição entre essas duas estruturas é denominada limbo (SLATTER, 2005, BRUNELLI et al., 2006), o qual atua como uma barreira contra o avanço de células conjuntivais (SANGWAN, 2001). A principal função corneana é proporcionar refração ocular e manter barreira física entre o olho e o ambiente (GALERA et al., 2000; GUAIMÁS MOYA et al., 2003). Essa estrutura consiste de epitélio externo, membrana basal, estroma, o qual representa 90% da espessura corneana, membrana de Descemet e endotélio (GELLAT, 2003; HERING, 2003).

O epitélio transparente é altamente especializado com presença de células epiteliais pavimentosas sobre uma camada de células basais uniformes e hexagonais, que são renovadas por toda a vida a partir de uma população de células-tronco límbicas (CTL) (AHMAD et al., 2006). De acordo com SLATTER (2005), a transparência corneana depende de cinco fatores: 1) ausência de vasos e células sanguíneas, 2) ausência de pigmento, 3) controle do conteúdo aquoso, 4) superfície óptica lisa e 5) disposição regular e altamente organizada das fibras colágenas, a qual elimina a interferência destrutiva pela dispersão luminosa. Alguns desses fatores impedem o avanço da conjuntiva sobre a córnea (fenômeno denominado conjuntivalização), os quais são garantidos pelas CTL (HUANG & TSENG, 1991; DUA, 1998; SANGWAN, 2001).

A diferença morfológica do limbo para a córnea reside na presença de células de Langerhans e melanócitos no primeiro, enquanto que entre a córnea e conjuntiva ocorre a presença de células globosas nesta última (CHEN & TSENG, 1990). A diferenciação funcional das células pode ser realizada pois as células da lâmina basal da córnea apresentam células amplificadoras transitórias, as quais possuem um período de vida definido, enquanto que as da mesma camada das CTL não exibem essa limitação (SANGWAN, 2001), promovendo um suporte ilimitado para as células amplificadoras transitórias (HUANG & TSENG, 1991).

O estudo das CT corneanas, ou CTL, tem sido tópico de grande interesse nos últimos anos, em que o foco é quase que exclusivamente voltado para a regeneração do epitélio corneano por meio das CTL (SOSNOVÁ et al., 2005). O

limbo é a zona de transição entre a córnea e a esclera e é considerado um tecido conjuntivo especializado, composto por mais de 10 camadas celulares (BRUNELLI et al., 2006), onde em sua porção mais basal, localizam-se as CTL (COTSARELIS et al., 1999; HAAMANN et al., 1998; HUANG & TSENG, 1991; NAKAMURA et al., 2005), as quais são mantidas por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos tais como o ambiente focal, fatores de sobrevivência e citocinas (PROCKOP, 1997; PITTENGER et al., 1999; DANIELS et al., 2001, SANGWAN, 2001).

As CTL representam a grande fonte de renovação do epitélio corneano (TI et al., 2002), ou seja, constituem uma reserva proliferativa e são responsáveis por uma reepitelização corneana adequada (OFICJALSKA-MLYNCZAK et al., 1998; PAJOOHESH-GANJI & STEPP, 2005).

Estudos adicionais para comprovação da localização dessas células foram realizados por Kenyon & Tseng (1989), em que os autores procederam a remoção cirúrgica do limbo, que resultou em uma regeneração deficiente do epitélio corneano. Já Huang & Tseng (1991) demonstraram que com a limbectomia total, houve maior demora na cicatrização das erosões corneanas e maior incidência de vascularização e conjuntivalização, a qual ocorre por invasão de células globosas sobre a córnea.

A visão é provavelmente o sentido mais importante, pois obtém-se mais de 80% da informação do mundo externo por meio dela. Para que o animal tenha uma boa acuidade visual, é necessário que a córnea, superfície corporal mais especializada, e a lente, apresentem boa capacidade refrativa, uma retina funcional, que a transmissão dos sinais nervosos pelo nervo óptico seja efetuada de maneira correta e que a funcionalidade do córtex visual esteja preservada (SANGWAN, 2001).

Atualmente sabe-se que o epitélio corneano é bem diferenciado e possui uma grande capacidade de auto-renovação em situações normais (HUANG & TSENG, 1991). As células da camada mais externa sofrem constante descamação e são repostas por células basais que proliferam quando em contato com membrana basal (SCHOENAU & PIPPI, 1993), caracterizando desta maneira uma rápida renovação (*turnover*) celular (FORTIER, 2005), o que garante uma substituição do epitélio num período de 7 a 10 dias em condições normais. Nas afecções corneanas com defeitos do epitélio, em pacientes sistemicamente saudáveis, podem ser observadas figuras de mitose na região límbica dentro de um período de 24 horas (WILCOCK, 2005).

Essa reposição celular constante foi estudada por Lauweryns et al. (1993), os quais propuseram a hipótese X, Y, Z, a qual explica como ocorre a manutenção e a integridade da superfície epitelial. As células epiteliais descamadas (componente Z) são continuamente renovadas pela proliferação de células basais (componente X) e pela proliferação e migração centrípeta das células-tronco límbicas (componente Y). Esta hipótese afirma então que, numa situação normal, $X+Y=Z$.

Como a córnea é a porta de entrada para todas as imagens externas e proporciona mais de dois terços de todo o poder refrativo do olho, seu requisito principal é a manutenção da transparência (SANGWAN, 2001). No entanto, devido à sua localização externa, juntamente com o limbo, estas estruturas estão sujeitas a traumas e processos lesivos como lacerações, perfurações, ulcerações (BRAGA et al., 2004) decorrentes ou não de defeitos palpebrais ou ciliares, disfunção nervosa (KERN, 1990; STARTUP, 1984) e queimaduras por agentes térmicos ou químicos (YANLING et al., 2006). Neste último grupo, encontram-se as lesões por álcali, as quais são as lesões oculares mais devastadoras (CONNERS et al., 1997; CYPEL et al., 2004).

As queimaduras oculares, especialmente por substâncias básicas, podem acarretar em danos às CTL, afecção esta, denominada deficiência límbica (NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001). Outras condições que podem ocorrer concomitantemente à destruição parcial ou total destas células são a síndrome de Stevens-Johnson, cicatriz ocular penfigóide, pterígio extenso recorrente (TI et al., 2002) neoplasias de superfície ocular, condições imunológicas e lesões por radiação (SANGWAN, 2001).

A apresentação clínica da deficiência límbica cursa com cicatrização córneo-conjuntival anormal, neovascularização periférica, defeito epitelial crônico, severa inflamação do estroma corneano, conjuntivalização (OFICJALSKA-MLYNCZAK et al., 1998; NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001, TI et al., 2002). Podem ocorrer, ainda, inflamação crônica, fotofobia (VAJPAYEE et al., 2000), redução da capacidade proliferativa, anormalidades na superfície ocular, calcificação, ulceração, perfuração corneana (SWIFT et al., 1996; DUA & AZUARA-BLANCO, 1999; DUA & AZUARA-BLANCO, 2000), instabilidade do epitélio corneano (SANGWAN, 2001), dor (AHMAD et al., 2006) e perda da visão (PAJOOHESH-GANJI & STEPP, 2005; YANLING et al., 2006).

Como as queimaduras oculares por álcali em humanos são freqüentes e por apresentarem potencial de comprometer permanentemente a acuidade visual, o modelo animal de queimadura pontual por NaOH é bem conceituado (LEVINSON et al., 1976; BOLKOVÁ & CEJKOVÁ, 1984; ORMEROD et al., 1989b; JUAN et al., 2003; FECHINE-JAMACARU et al., 2005). As lesões por substâncias básicas encontram-se no grupo de urgências oftalmológicas, em que seu pronto reconhecimento e adequado tratamento são vitais na evolução e controle das complicações precoces ou tardias (CYPEL et al., 2004), pois os tecidos ópticos são sensíveis a diversos processos da reparação, como por exemplo, a fibrose, a qual pode complicar o retorno de uma função e culminar com cegueira (WILCOCK, 2005). Dentre os achados intraoculares o hipópio, hifema, *Phtisis bulbi*, sinéquia anterior, irite, infiltrações inflamatórias do corpo ciliar e edema e opacificação do epitélio da lente são os mais comumente encontrados (WAGONER, 1997).

O tratamento dessa condição é baseado na remoção da causa e na potencialização e estimulação da regeneração corneana espontânea, prevenção de infecções e supressão do espasmo ciliar (GELATT, 1991; STADES et al., 1999). A literatura descreve várias formas de tratamento para queimadura ocular por álcali, tais como lubrificantes artificiais, inibidores de colagenase, lentes de contato terapêuticas, aplicação tópica de fibronectina, transplante de conjuntiva (WAGONER et al., 1997), vitamina C e citrato (BECHARA et al., 1986), soro autógeno (CYPEL et al., 2004). São citados também, o recobrimento com membrana amniótica humana (JOSEPH et al., 2002), a qual pode ser associada com ceratoplastia lamelar ou penetrante (TI et al., 2002), células-tronco mesenquimais (CTM) (YANLING et al., 2006) ou com o transplante de limbo, em que os dois últimos consistem fontes autólogas ou heterólogas de transplante de CT (NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001). No entanto, essa última modalidade terapêutica ainda não possui eficácia comprovada a longo prazo (CHARUKAMNOETKANOK, 2006).

O uso das CT nas terapias regenerativas e reparativas é uma nova modalidade terapêutica, a qual desperta crescente interesse na pesquisa destas células na área cirúrgica, mas a grande promessa esbarra nas dificuldades de isolar, expandir e identificar as CT no tecido lesado após o ato cirúrgico (FORTIER, 2005). CT são células indiferenciadas, que possuem a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, o que permite que ajam como um sistema de reparo do organismo, substituindo células lesadas durante a vida do indivíduo (STRAUER &

KORNOWSKI, 2003; McCULLOCH & TILL, 2005), sendo ainda capazes de auto-renovação (BRYDER et al., 2006). As CT dividem-se em embrionárias e adultas; sendo essas últimas, por sua vez encontradas nos tecidos de organismos adultos, responsáveis pela substituição de tecidos e regeneração (KRUSE et al., 1990; AKPED & FOSTER, 1999; JIANG et al., 2002). Por não apresentarem barreiras éticas (KÖRBLING et al., 2003; STRAUER & KORNOWSKI, 2003; HOWS, 2005), pela facilidade de obtenção e por propiciarem o transplante autólogo, a MO representa o local de maior fonte para obtenção destas células. Vários estudos estão sendo realizados visando aprofundar o conhecimento do comportamento destas células após transplantadas (HUANG et al., 2004; SERAKINCI & KEITH, 2006; TANG et al., 2006), pois nelas deposita-se a esperança de inúmeros pacientes portadores de deficiências incuráveis como as doenças severas da superfície corneana devido à deficiência de CTL (CHARUKAMNOETKANOK, 2006).

A MO produz cerca de seis bilhões de células por quilograma de peso corporal por dia, as quais são divididas em duas categorias, que podem sofrer dois processos distintos de diferenciação (KÖRBLING et al., 2003), transformando-se em células mono ou multinucleares (ROMANOV et al., 2003). Dentre as células mononucleares da MO incluem-se as células-tronco hematopoéticas (CTH) e CTM (MINGUELL et al., 2001), as quais apresentam multi e pluripotencialidade respectivamente (JIANG et al., 2002; FUKUDA, 2003; NAGAYA et al., 2004).

As CTH foram as primeiras CT isoladas e apresentam grande capacidade de auto-renovação e proliferação, o que possibilita sua diferenciação em células progenitoras de linhagem sangüínea e seus derivados a partir de uma única célula. Por essas propriedades, são amplamente utilizadas no tratamento de doenças como leucemia e doenças auto-imunes (CANTLEY, 2005; BRYDER et al., 2006). Em cães estas células podem ser localizadas na MO (BRUNO et al., 1999) e no cordão umbilical (NAKAGE et al., 2003; NAKAGE et al., 2005).

Já as CTM, além da capacidade de auto-renovação, apresentam a característica de diferenciação em várias linhagens de tecido conjuntivo, como o tecido ósseo, cartilaginoso, muscular, tendíneo, adiposo (BLACK & WOODBURY, 2001; FUKUDA, 2003), pulmonar (THEISE et al., 2002), hepático (ALISON et al., 2000) e nervoso (MEZEY et al., 2000). Apesar do transplante de CTH para o tratamento de doenças hematológicas ser universalmente aceito, o uso das CT derivadas da MO na terapia regenerativa encontra-se nos estágios iniciais de pesquisa (HOWS, 2005).

O aumento da possibilidade de realização de auto-transplantes colabora com a geração de novos tecidos na medicina regenerativa, sendo que esta afirmação baseia-se na propriedade da plasticidade das CT adultas, já que estas células podem cruzar a barreira das linhagens celulares do endo, meso e ectoderma (TEMPLE, 2001; HOWS, 2005). A plasticidade, ou potencial de diferenciação é a sua habilidade em produzir uma progênie que expresse vários fenótipos maduros (SERAKINCI & KEITH, 2006).

Ainda não é claro qual a fração celular, CTH ou CTM, apresenta a maior plasticidade (HOWS, 2005). Por essa razão, autores propuseram que a utilização de um conjunto de células que possam dar suporte à proliferação e à manutenção das CT, como a fração de células mononucleares (FCM) da MO, é melhor do que o uso de um único tipo celular (GOWDAK et al., 2004; VILAS-BOAS et al., 2004). Estudos recentes demonstram uma grande potencialidade dessas células no tecido conjuntivo em vários modelos animais (RICE et al., 2003; FAGOT-LARGEAULT, 2004).

A FCM de cães pode ser facilmente isolada através da colheita da MO, a qual posteriormente deve ser submetida à filtração e centrifugação em um gradiente de densidade de 1.077g.ml^{-1} a 678G por 30 minutos, obtendo-se viabilidade e número celular acima de 90% e 0,63 a $1,24 \cdot 10^8$ células respectivamente (TOGNOLI et al., 2007). No cão, 0,001 a 0,01% destas células correspondem a CTM (FORTIER, 2005), números estes que tornam o estudo de autotransplante com cães possíveis, pois é recomendado que para o sucesso do procedimento, obtenha-se 2×10^6 células (GENGOZIAN, 2000).

O tratamento com a MO autóloga elimina a possibilidade da rejeição alogênica (VOLLWEILER et al., 2003; RICE et al., 2003; HOWS, 2005), evitando complicações como a ceratoconjuntivite seca (OGAWA et al., 1999), a conjuntivite pseudomembranosa e a retinopatia microvascular (ANDERSON & REGILLO, 2004), no entanto, são necessários mais experimentos *in vivo* para que pontos duvidosos possam ser esclarecidos.

As melhores vias de administração (ANDERSON et al., 2005), as maneiras de prevenir a quimiotaxia (*homing*) (VERFAILLIE, 2002) e aumentar as concentrações de CT no local de interesse (STRAUER & KORNOWSKI, 2003) e ainda, quais os processos celulares e moleculares envolvidos na cicatrização dos tecidos (HOWS,

2005), são respostas a serem buscadas para que futuramente as CT possam ser transplantadas na rotina clínica (VAQUERO et al., 2006).

Com relação à via de administração, a intravenosa é a de mais fácil execução, porém suas principais desvantagens são o efeito de primeira passagem transpulmonar e a necessidade de várias passagens circulatórias até que as células entrem em contato com a área lesada, o que diminui a quantidade celular no tecido alvo (STRAUER & KORNOWSKI, 2003). Assim, é sugerido que a administração sistêmica tem pouca eficácia e que a via intra-lesional deve ser a de eleição (TOMITA et al., 2004; STRAUER & KORNOWSKI, 2003; VILAS-BOAS et al., 2004; VAQUERO et al., 2006).

Na tentativa de solucionar essas lacunas, os modelos experimentais de transplante de CT em cães desde o trabalho de APPELBAUM et al. (1986) propiciam informações relevantes para terapias com essas células em humanos. Por permitir melhor avaliação clínica, assim como, maiores facilidades na colheita e transporte, por apresentarem a capacidade de reconstituição hematopoética e da plasticidade das CT o modelo provê informações pré-clínicas ao homem de extrema importância (SUTER et al., 2004; NAKAGE & SANTANA, 2006); no entanto, permanece o problema científico acerca da implantação das CT nos tecidos-alvo, levantado por Gowdak et al. (2004) por ainda não existirem marcadores celulares específicos.

Esse impasse começou a ser resolvido com o avanço da nanotecnologia, a qual tornou possível o desenvolvimento de nanocristais (NC), que revolucionaram a marcação celular (DUBERTRET et al., 2002). Os NC, também denominados *quantum dots* (QD), são materiais semi-condutores, resistentes, emissores de luz brilhante, que foram adotados recentemente como uma classe de marcadores fluorescentes (ALIVISATOS et al., 2005), pois mesmo medindo cerca de 2 a 6nm, podem ser facilmente detectados por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (PARAK et al., 2002; MATTHEAKIS et al., 2004).

Este novo marcador celular é constituído de um núcleo, uma camada intermediária e cobertura, em que o primeiro possui poucas centenas de átomos de materiais semicondutores (geralmente cádmio associado ao selênio ou telúrio). A camada intermediária semicondutora, estabiliza o núcleo melhorando suas propriedades ópticas e físicas. A camada mais externa, polimérica, recobre as duas outras camadas, promovendo uma superfície hidrossolúvel (INVITROGEN, 2007).

Dentre as propriedades interessantes dos NC, inclui-se sua resistência à perda de brilho, o que os torna especialmente úteis na marcação de células e tecidos vivos por longo período de tempo (MATTHEAKIS et al., 2004). Outra característica de grande valia é a manutenção de sua fluorescência por até quatro meses *in vivo* (ALIVISATOS et al., 2005), o que é uma vantagem frente aos fluoróforos convencionais (MICHALET et al., 2005) e moléculas de corante orgânico anteriormente utilizados (ALIVISATOS et al., 2005). Ainda, é advogado que esses materiais não apresentam toxicidade celular em ensaios experimentais com embriões (DUBERTRET et al., 2002), diferenciação celular, tráfego de proteínas e fixação dos ligantes ou anticorpos a alvos intracelulares e de membrana (MATTHEAKIS et al., 2004; ALIVISATOS et al., 2005).

A marcação celular ocorre pela internalização destas nanopartículas através de reações mediadas por receptor ou endocitose não-específica e, após a entrada na célula, os QD localizam-se em vesículas no citoplasma, mais precisamente na região perinuclear (MATTHEAKIS et al., 2004; ALIVISATOS et al., 2005) e são passados às células-filhas por até seis gerações e não são transferidas à células adjacentes da população tecidual (INVITROGEN, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizados 16 cães machos ou fêmeas, sem raça definida, com peso ao redor de 10kg cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram submetidos a tratamento anti-helmíntico com pamoato de pirantel ($14,4\text{mg.kg}^{-1}$), praziquantel (5mg.kg^{-1}) e febantel¹ (15mg.kg^{-1}) administrados por via oral, e a um período de 30 dias de adaptação às condições locais, com consumo de ração e água *ad libitum* durante o período do experimento. Após a adaptação, os animais foram separados em dois grupos (H e F), com dez e seis indivíduos respectivamente e submetidos à lesão por NaOH em ambos os olhos. Para avaliação e comparação da cicatrização corneana entre os indivíduos do grupo H, os mesmo foram submetidos a exame histopatológico. Já dos animais do grupo F foram realizadas impressões sobre lâminas de imunofluorescência a fim de detectar a presença de células marcadas com NC (Figura 1).

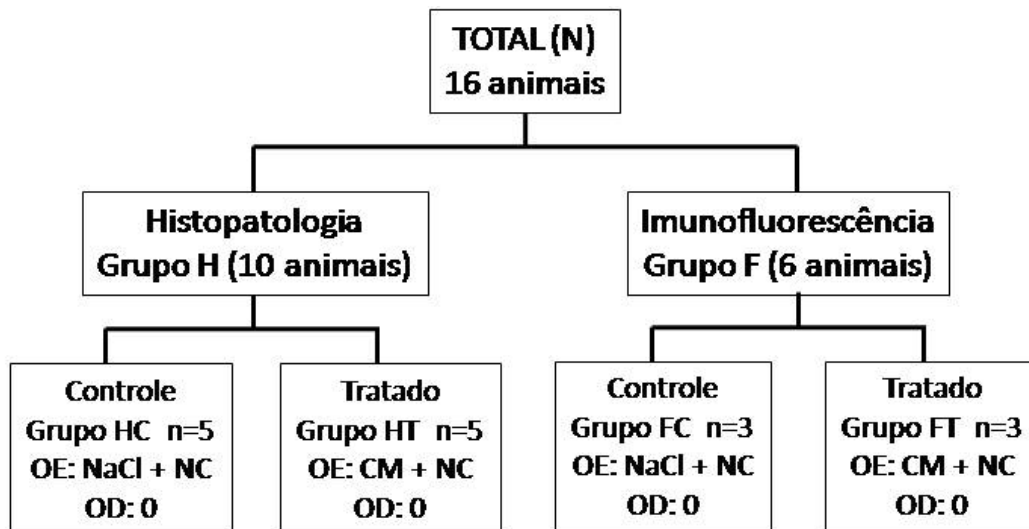


Figura 1- Organograma demonstrando a separação dos animais nos diferentes grupos. Os animais dos grupos HC (histopatologia-controle) e HT (histopatologia-tratado) foram submetidos a exame de histopatologia e os dos grupos FC (imunofluorescência-controle) e FT (imunofluorescência-tratado) a exame de imunofluorescência. OE = olho esquerdo, OD = olho direito, NaCl = cloreto de sódio 0,9%, NC = nanocristais, CM = células mononucleares, 0 = sem administração.

¹ Canex plus 3 – Vetbrands Saúde Animal – Paulínia, SP.

Ainda no período pré-cirúrgico foi realizado exame clínico rotineiro a fim de descartar quaisquer doenças que contra-indicassem o procedimento anestésico-cirúrgico. Com relação à avaliação laboratorial os testes de hemograma, urinálise, perfil bioquímico e pesquisa de hematozoários foram conduzidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFSM. Após a avaliação inicial conduziu-se um exame oftalmológico pelo qual avaliou se a superfície externa do bulbo e anexos, o teste lacrimal de Schirmer tipo I², teste com fluoresceína³ (apenas nos animais do grupo H), tonometria de aplanção e oftalmoscopia direta. Como todos os animais se mostraram hígidos, estes foram admitidos no experimento.

Três dias previamente ao ato operatório (dia 0), foi colhido 10ml.kg⁻¹ de sangue periférico da veia jugular de todos os animais, volume este que foi conservado em bolsa de sangue contendo citrato de sódio, adenina, fosfato e dextrose (CPDA)⁴ e refrigerado em geladeira comum a 4°C, para a reposição volêmica no período trans-operatório.

Para a realização do procedimento cirúrgico os animais receberam banho 24 horas antes da intervenção (dia 02) e submetidos à tricotomia dos membros pélvicos desde a linha média da coluna vertebral até o terço distal da tibia e próximo às veias jugular e cefálica e artéria metatarsiana. O jejum hídrico e alimentar foi de duas e 12 horas respectivamente.

3.1- Coleta de medula óssea e preparação da lesão

Para a indução anestésica (dia 03), utilizou-se propofol⁵ na dose de 5mg.kg⁻¹ de peso vivo, pela via intravenosa sendo o acesso venoso mantido pela administração da solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%⁶ na dose de 10ml.kg⁻¹.h⁻¹. Após a indução anestésica assegurou-se a patência de via aérea por intubação oro-traqueal, sendo este conectado a sistema anestésico semi-fechado para

² Teste de Schirmer Ophthalmos – Ophthalmos – São Paulo, SP

³ Fluoresceína Strips Ophthalmos – Ophthalmos – São Paulo, SP

⁴ Bolsa para coleta de sangue 500ml CPDA-1 – JP Indústria Farmacêutica – Ribeirão Preto, SP

⁵ Diprivan 1% - AstraZeneca do Brasil – Cotia, SP

⁶ Solução de cloreto de sódio 0,9% - Hiplex Laboratório – Campinas, SP

administração de uma mistura de isoflurano⁷ e oxigênio a 100%. A monitoração anestésica consistiu de avaliação dos parâmetros vitais tais como frequência cardíaca, tempo de reperfusão capilar, traçado eletrocardiográfico, auscultação das bulhas cardíacas por estetoscopia convencional e esofágica, ventilometria, pressão arterial invasiva (sistólica, diastólica e média), oximetria de pulso e temperatura corporal.

Com o animal posicionado na mesa cirúrgica em decúbito lateral direito, a anti-sepsia do campo operatório foi realizada através da utilização do protocolo álcool-iodo-álcool e os panos de campo posicionados e fixados de maneira rotineira, a fim de manter a técnica asséptica para a região de colheita de MO.

Iniciadas as punções ósseas percutâneas e aspirações na fossa trocântérica do fêmur esquerdo, com o objetivo de colher 15ml.kg⁻¹ de MO, utilizou-se uma agulha do tipo Steis⁸ e seringas de 20ml previamente heparinizadas⁹ (Figura 2). A MO foi acondicionada em bolsas de transplante de MO¹⁰ previamente heparinizada com 0,1ml de heparina associado a 10ml de NaCl 0,9% para cada 100ml de MO a ser colhida.

O primeiro mililitro de MO colhido foi encaminhado para exame laboratorial, em que com 0,5ml da amostra foi avaliada a porcentagem de células nucleadas e a viabilidade celular com o corante azul de trypan¹¹ em câmara de Neubauer, sendo considerado aceitável uma viabilidade superior a 70%; com o volume restante (0,5ml) foi realizado esfregaço para avaliação morfológica das células

A determinação da viabilidade das células nucleadas foi realizada pela utilização de um tubo de hemólise individual, no qual 50µl de sangue de MO e volume igual de corante azul de trypan 1% foram homogeneizados. Após transferência de uma gota desta mistura para lâmina de microscopia foi realizada a leitura em microscopia de luz, onde as células viáveis se apresentaram sem coloração e as células mortas coradas em azul.

⁷ Isoflurane – Cristália – Itapira, SP

⁸ Agullha Steis - Tucumedy – Marthan Med Tec –Popper – PBN- M.D. Tech- Porto Alegre- RS

⁹ Liquemine® – heparina sódica –(5000 UI/mL=25000UI)- Roche do Brasil – Rio de Janeiro, RJ

¹⁰ Bone Marrow Collection Kit – Baxter Hospitalar – São Paulo, SP

¹¹ Trypan blue – Comercial Química Americana Ltda – Paulínia, SP



Figura 2- Fotografia demonstrando a técnica de colheita da medula óssea a partir de inserção intramedular percutânea de agulha do tipo Steis no fêmur esquerdo de um cão.

Para a avaliação morfológica das células da MO, foram confeccionados esfregaços sobre lâmina de microscopia, as quais foram coradas com kit panótico rápido¹² e avaliadas conforme a relação mielóide e eritróide de normo, hiper ou hipocelularidade da MO, excluindo-se do experimento os animais que apresentavam esta última condição.

Após a colheita da metade do volume desejado o sangue autólogo previamente armazenado foi administrado pela via intravenosa. À obtenção do volume total de MO a ser colhido, a solução de MO e NaCl heparinizada foi filtrada pelos filtros em linha de 850 μ m, 500 μ m e 200 μ m da bolsa de transplante de MO para remoção de espículas ósseas e êmbolos gordurosos. Após a passagem pelo primeiro filtro, MO heparinizada foi coletada para quantificação de células nucleadas, onde esperava-se obter número superior a 2×10^8 células. A solução resultante foi acondicionada em bolsa de transplante de MO estéril, a fim possibilitar o transporte até o Laboratório de Separação de Células Mononucleares do Laboratório de Cirurgia Experimental da UFSM, onde a FCM da MO foi isolada, incubada e marcada com nanocristais como descrito no item 3.1.1.

¹² Kit panótico – Comercial Química Americana Ltda – Paulínia, SP

Concomitantemente ao isolamento e marcação das células mononucleares, as lesões corneanas foram realizadas. Para este procedimento, os animais foram reposicionados em decúbito esternal e tiveram as regiões ocular e periorcular bilaterais preparadas para cirurgia asséptica com solução aquosa contendo 1% de iodo ativo¹³ e a colocação de panos de campo foi procedida de maneira rotineira. Com o objetivo de centralização do bulbo após a colocação de blefarostato de Castroviejo, um bloqueio neuro-muscular foi conduzido com atracúrio¹⁴ na dose de $50\mu\text{g.kg}^{-1}$ pela via intravenosa.

Para a realização das lesões corneanas experimentais, foi utilizada a técnica de discos circulares de papel filtro Whatman número 42¹⁵ preconizada por Levinson et al. (1976), Ormerod et al. (1989)b, Juan et al. (2003), Fachine-Jamacaru et al. (2005) e Campos et al. (2003). Os discos de 6mm foram embebidos em solução de NaOH a 2M, por um período de 2 minutos. O excesso do líquido foi removido tocando-se o disco em gaze estéril para então serem posicionados na região dorso-lateral da transição córneo-escleral em ambos os olhos por 2 minutos (Figura 3).



Figura 3- Fotografia mostrando o posicionamento do disco de papel filtro embebido com NaOH na região córneo escleral do olho direito de um cão.

¹³ Riodeine – Rioquímica – São José do Rio Preto, SP

¹⁴ Tracrium – GlaxoSmithKline – Rio de Janeiro, RJ

¹⁵ Quanty 9cm, JP 42 – Jprolab – Curitiba, PR

Decorrido o tempo preconizado, ambos os olhos foram lavados com 20ml de NaCl 0,9% e secos com cotonete esterilizado por meio de formalina. Os animais do grupo H foram submetidos ao teste de fluoresceína (Figura 4) para certificação da eficiência do modelo e extensão da lesão. Os cães pertencentes ao grupo F, no entanto, não foram submetidos a este procedimento para não haver falsos-positivos no exame de imunofluorescência realizado no período pós-operatório.

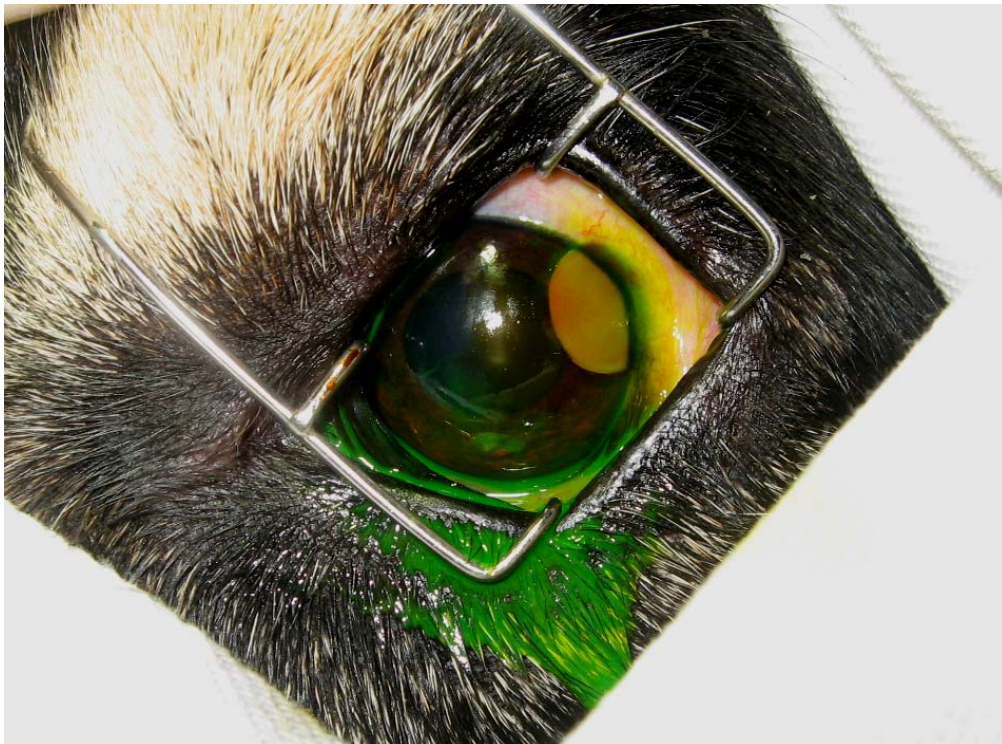


Figura 4- Fotografia de olho esquerdo de um cão, onde é observada lesão do epitélio corneano pelo teste com fluoresceína.

Ao término da criação das lesões oculares com os papéis-filtro umedecidos com NaOH, foi administrado meloxicam¹⁶ na dose de $0,2\text{mg.kg}^{-1}$ pela via subcutânea e sulfato de morfina¹⁷ na dose de $0,1\text{mg.kg}^{-1}$ pela via epidural a fim de proporcionar analgesia pós-operatória imediata e maior conforto e bem estar aos animais submetidos aos procedimentos experimentais. Com o objetivo de prevenir lesões por auto-mutilação, em todos os indivíduos de ambos os grupos foram colocados

¹⁶ Maxicam 0,2% injetável – Ourofino – Ribeirão Preto, SP.

¹⁷ Dimorf® - Cristália – Itapera – São Paulo, SP.

colares elizabetanos, os quais foram mantidos por todo o período pós-operatório do experimento.

3.1.1- Isolamento das CM

Para o isolamento da fração total de células mononucleares foi utilizada a técnica de Boyum (1968) modificada por Tognoli et al. (2007) pela qual, no interior de uma capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e luz ultravioleta, a MO colhida foi disposta em tubos Falcon de 50ml contendo um gradiente de densidade¹⁸ de $1,077\text{g.dl}^{-1}$, respeitando-se a proporção 1:1 de sangue:gradiente. A amostra foi centrifugada a 678G por 30 minutos à temperatura ambiente, processo esse que proporciona a separação das células mononucleares, visíveis na forma de um halo na suspensão (Figura 5).

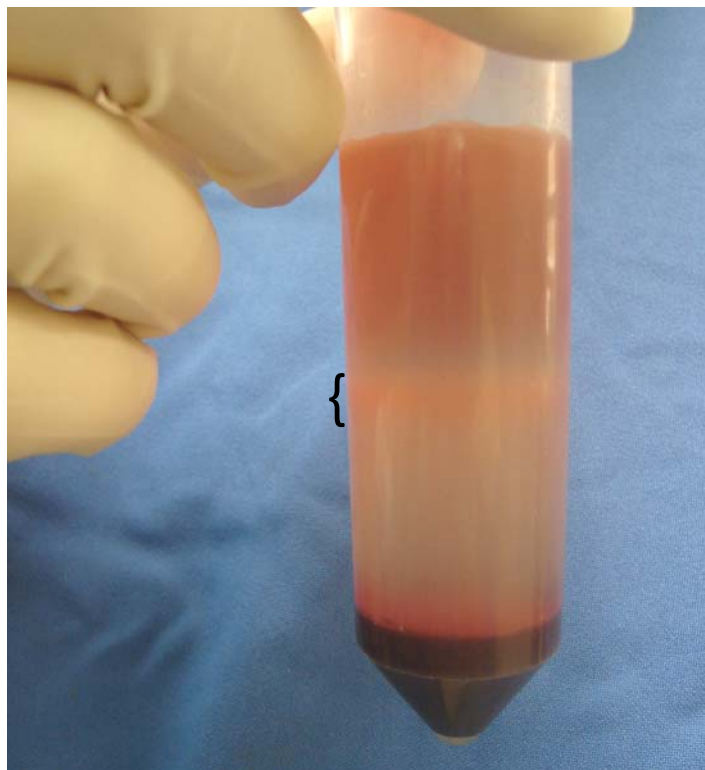


Figura 5- Fotografia de um tubo Falcon de 50ml após a centrifugação da suspensão de medula óssea com gradiente de densidade de 1077g.dl^{-1} . Na figura, encontra-se em destaque o halo contendo a fração de células mononucleares da MO.

¹⁸ Histopaque 1077 – Sigma – São Paulo, SP.

Após este procedimento, com o auxílio de uma pipeta manual, o halo contendo a FCM foi aspirado e submetido a três lavagens e centrifugações consecutivas com soro fetal bovino e DMEM a 678G por 10 minutos, com o objetivo de remover o gradiente de densidade da solução.

Ao término das lavagens, foi obtido na porção final do tubo, um botão (*pellet*) uniforme de 1000 μ l contendo a FCM da MO, o qual foi re-suspendido em NaCl 0,9%, totalizando um volume de aproximadamente 3ml (Figura 6). Essa suspensão foi então incubada com 1 μ l de nanocrystal (Qtracker[®] 655 Cell labeling kit¹⁹) para cada 1,5ml de FCM a ser administrada, agitada por 30 segundos no vórtex e levada à estufa a temperatura de 37°C por 45 minutos, a fim de que as células mononucleares fossem marcadas (por endocitose dos marcadores) para posterior avaliação da presença nos tecidos estudados por meio imunofluorescência em um microscópio de epifluorescência²⁰ com aumento de 40 vezes. Após a incubação, utilizando uma pipeta automática, foi retirada uma alíquota de 50 μ l da amostra para quantificação celular e para o teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de trypan 1%, para certificação que fossem transplantadas no mínimo 2x10⁶ células no local da lesão (Figura 7).



Figura 6- Fotografia de um Eppendorf contendo a suspensão da FCM com NaCl a 0,9%.

¹⁹ Qtracker 655® - Invitrogen – Porto Alegre, RS

²⁰ Microscópio Epifluorescência Zeiss Axioplan® - USA

Uma segunda alíquota de 30µl foi colhida para certificação da marcação da FCM pelos nanocristais por microscopia epifluorescente (Figura 8). Para essa avaliação, os 10µl da fração celular foram colocados em um poço de lâmina para microscopia *multispot*, a qual foi submetida à secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram preparadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), glicerol e lamínula para posteriormente serem avaliadas por microscopia epifluorescente.

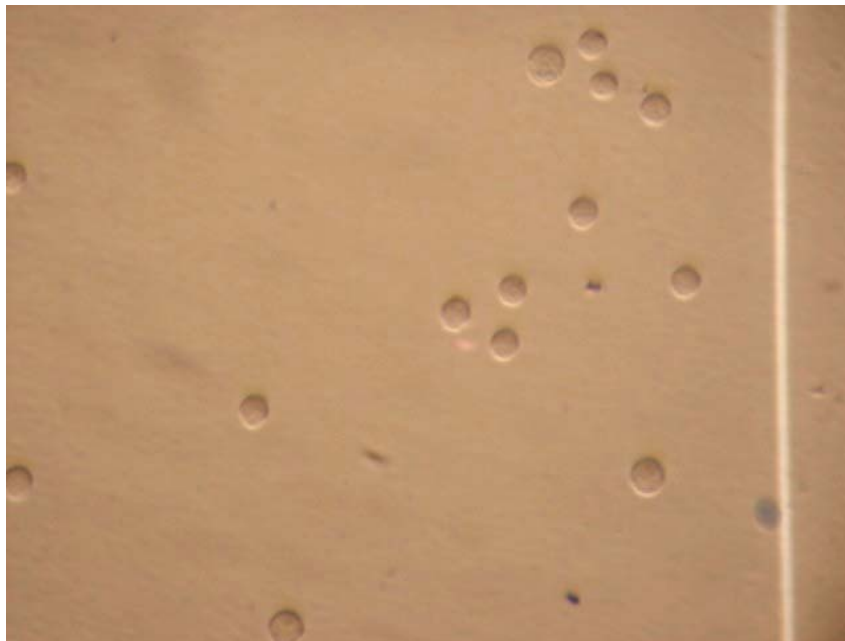


Figura 7- Fotomicrografia da FCM submetida ao teste de viabilidade com o azul de trypan. As células incolores são consideradas viáveis, enquanto que as coradas em azul, são as inviáveis. Aumento de 40X em microscópio de luz.

3.2- Inoculações e cuidados pós-implantação

Após a separação da FCM e incubação com marcadores, os animais dos grupos HT e FT foram submetidos à anestesia tópica com colírio a base de cloridrato de tetracaína a 1% associado a cloridrato de fenilefrina a 0,1%²¹ e à administração das CM pela via subconjuntival no olho esquerdo, após um período de aproximadamente 50 minutos após as confecções das lesões (Figura 9).

²¹ Colírio anestésico – Allergan – Guarulhos, SP

Os animais dos grupos HC e FC foram submetidos à anestesia tópica como descrito anteriormente e à injeção subconjuntival de 3ml de NaCl 0,9% incubados com a mesma substância marcadora e suas células separadas foram enviadas a outros laboratórios da UFSM para pesquisas adicionais.

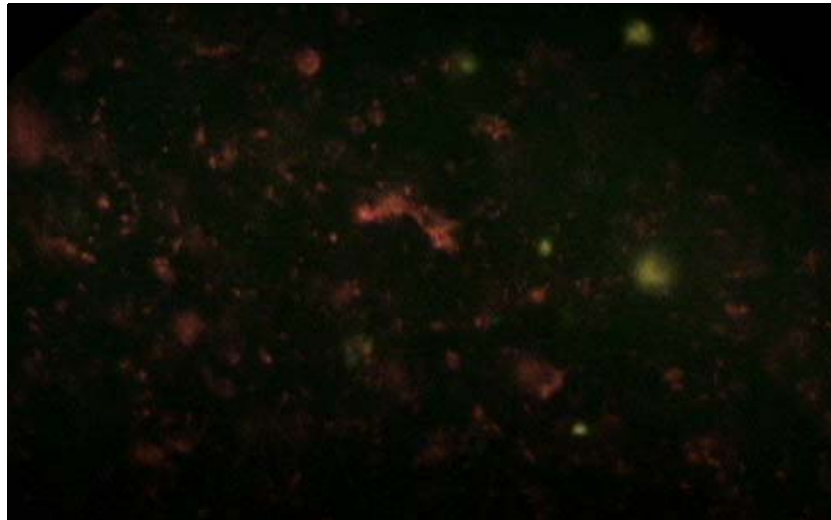


Figura 8- Fotomicrografia da FCM corada com os nanocristais submetida à microscopia epifluorescente em aumento de 40X. Os pontos verdes são as células-tronco marcadas em contraste com o fundo vermelho (controle-negativo dos nanocristais).



Figura 9- Fotografia mostrando a aplicação da FCM por via subconjuntival do olho esquerdo de um cão do grupo HC.

Para analgesia pós-operatória utilizou-se meloxicam na dose de $0,1\text{mg.kg}^{-1}$ a cada 24 horas pela via subcutânea por quatro dias consecutivos e sulfato de morfina

0,5mg.kg⁻¹ pela via intramuscular a cada 8 horas por três dias consecutivos. Como terapia analgésica adicional, administrou-se colírio de atropina 1%²² três vezes ao dia durante todo o período de avaliação.

3.2.1- Avaliação por imunofluorescência

Seis dias após a administração subconjuntival, foi conduzida a avaliação da implantação da FCM marcadas com NC na região límbica de ambos os olhos dos animais do grupo FT e FC. Essa análise constou da realização de anestesia tópica e impressão em lâmina de microscopia dos locais lesionados, as quais foram posteriormente contra-coradas com Evans blue por um período de 4 minutos. As lâminas foram então submetidas a procedimento de lavagem com PBS e água destilada, realizada a secagem e a montagem foi procedida com uma gota de PBS e glicerol na proporção 1:1, com a colocação posterior de lamínula sobre a impressão. As avaliações foram conduzidas no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM. Nesta etapa um único avaliador valendo-se de um microscópio de epifluorescência no aumento de 40 vezes, verificou a presença de células marcadas.

3.2.2- Avaliação histopatológica

Passados 15 dias da administração das CM marcadas, os animais dos grupos HC e HT foram submetidos à eutanásia através de pré-medicação com acepromazina (0,1mg.kg⁻¹) e morfina (1mg.kg⁻¹) pela via intra-muscular, indução anestésica com tiopental sódico (12,5mg.kg⁻¹) pela via intravenosa (IV) e após a confirmação da entrada do animal em plano anestésico profundo, foi administrado rapidamente uma ampola de 10ml cloreto de potássio a 10% pela mesma via. As regiões córneo esclerais lesionadas foram colhidas e fixadas em formol tamponado

²² Colírio de atropina 1% - Allergan – Guarulhos, SP

a 10% por um período mínimo de 10 dias e emblocadas em parafina para a realização dos cortes de microscopia com auxílio de um micrótomo. Os cortes histológicos das amostras foram dispostos sobre lâminas de microscopia e então coradas com hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica. A leitura das lâminas foi executada no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília, quando foi utilizado um quadro para o agrupamento de dados sobre a avaliação da córnea (inflamação, presença de reepitelização, espessura, angiogênese e presença de pigmentação) e limbo (inflamação e angiogênese) por um único avaliador, dispondo de um microscópio óptico conectado a um sistema de captura de imagens.

3.3- Comitê de ética

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (sob o processo número 23081.007106/2006-81 do dia 05 de junho de 2006) por estar de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Somado a isso, foram observadas a preocupação de bem estar dos animais de acordo com a Lei nº. 5.517 de 23 de outubro de 1968, artigo 5º; Lei nº. 6.638 de 08 de maio de 1979; à resolução nº. 592 de 26 de junho de 1992 e Projeto de Lei nº. 9.605/1998 e nº. 1. 691/2003.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Modelo de lesão corneana com NaOH a 2M

O método de lesão corneana com discos de papel filtro Whatman número 42 embebido em solução de NaOH 2M proposto por Levinson et al. (1976), Ormerod et al. (1989)b, Juan et al. (2003), Fachine-Jamacaru et al. (2005) e Campos et al. (2003), demonstrou-se de baixo custo, fácil execução, padronização e reprodução, pois 100% dos cães apresentaram, à remoção dos discos, opacificação estromal com margens distintas, verificando-se uniformidades em todas as lesões. Somado a isto, os animais do grupo submetido à análise histopatológica, foram testados quanto à impregnação estromal de fluoresceína no período transoperatório para verificar a presença de lesão corneana e apresentaram-se positivos ao teste. Fato esse confirmado por recurso complementar incidindo-se luz ultra-violeta (Figura 10). Este achado isenta a necessidade de realização da mesma prova nos animais dos grupos FC e FT, com objetivo de evitar interferências na avaliação por imunofluorescência.

Apesar da fácil realização do modelo, nota-se que é de extrema importância a remoção da umidificação excedente do papel filtro, pois caso este se apresente-se super-hidratado, pode haver lesões adicionais por escorrimento da solução de NaOH, complicação esta já citada por Fachine-Jamacaru et al. (2005).

No momento das lesões, não se observou alterações hemodinâmicas como taquicardia e/ou hipertensão nos animais anestesiados com isofluorano vaporizado com oxigênio a 100% em sistema anestésico semi-fechado. No período pós-operatório, nenhum dos animais experimentais apresentou blefarospasmo e fotofobia, desta maneira a associação da anestesia ocular tópica com hidrocloreto de proparacaína a 0,5% (ORMEROD et al., 1989) ou cloridrato de tetracaína a 1% associado a cloridrato de fenilefrina a 0,1% à anestesia inalatória proposta por Braga et al. (2004) não é necessária, pois pode retardar a epitelização pós-operatória (STADES et al., 1999).

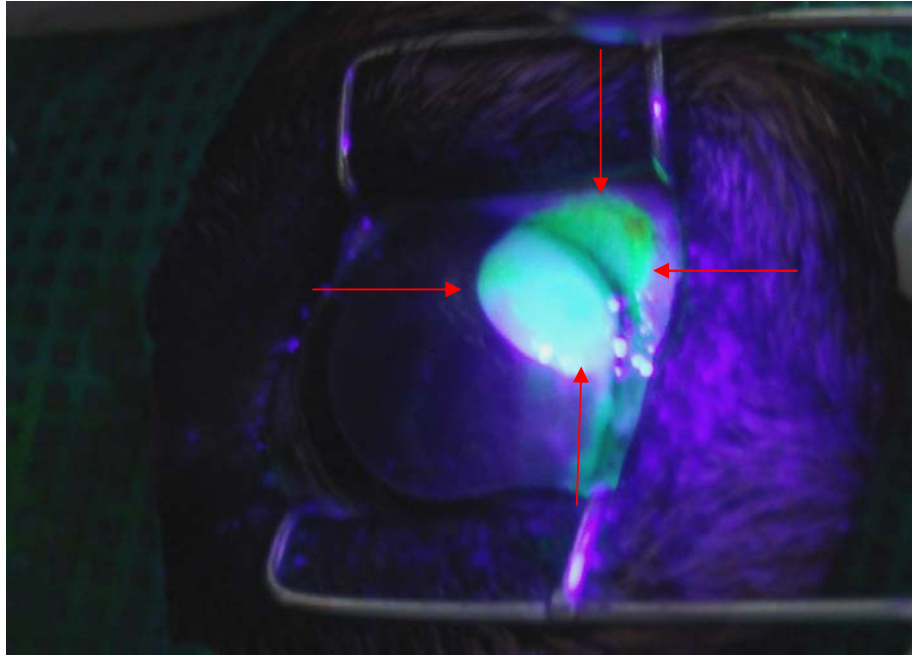


Figura 10- Fotografia demonstrando área da lesão córneo-escleral da região dorso-lateral de olho esquerdo de um cão. O teste de fluoresceína evidencia a região lesada, e ao associar à incidência de luz ultravioleta, obtém-se um destaque da área lesada, como se observa no local com aspecto esverdeado brilhante à direita (em destaque).

Seguindo as recomendações de Hering (2003), no período pós-operatório, a utilização de colar elizabetano foi realizada, com o objetivo de evitar auto-mutilações que podem culminar com perfuração ocular. Com relação ao modelo experimental, perfurações oculares são relatadas por CAMPOS et al., 2003, no entanto, tal condição não foi observada no decorrer do experimento. O que reforça a importância do modelo experimental, uma vez que as lesões por queimadura além de comuns, apresentam não raramente déficit na restauração da acuidade visual (CONNERS et al., 1997).

4.2- Separação e administração da fração de CM da MO

Segundo Covas e Zago (2004), a MO é a fonte celular mais acessível para o isolamento da fração de CM, a qual, por sua vez, provê um recurso de grande valia na obtenção de células-tronco em adultos, o que justifica a escolha da técnica de

Boyum (1968), modificada por Tognoli et al. (2007). Este método permite obtenção de número celular entre $0,63$ a $1,24 \times 10^8$ com 90% de células viáveis, valores estes, que superam o indicado por GENGOZIAN (2000) como ideal para a implantação (“pega”) do enxerto (2×10^6 células).

Neste procedimento, a MO é colhida e as CM isoladas, quantificadas e contadas quanto à sua viabilidade como descritas no item 3.1 deste trabalho. Onde ao final se obteve um número celular entre $1,34$ a $9,5 \times 10^7$ células (média de $5,7 \times 10^7$) e viabilidade entre 88 a 97% (média de 95,3%), números estes já relatados por Tognoli et al., 2007 e considerados adequados quanto à “pega” do enxerto segundo Gengozian, 2000.

Após o isolamento e marcação das CM com NC (tempo ao redor de 50 minutos), a fração mononuclear foi administrada pela via subconjuntival, pois segundo Slatter (2005), essa via promove uma alta concentração da substância terapêutica no tecido corneano.

4.3- Avaliação da localização celular por imunofluorescência direta

As CT adultas são células indiferenciadas capazes de diferenciação em outros tipos celulares, o que as permite agir como um sistema de reparo do organismo (McCULLOCH & TILL, 2005), fato este aceito universalmente na reposição de células sanguíneas ao longo da vida e nos transplantes de MO.

No entanto, a utilização de CT derivadas da MO em terapias visando regeneração não é padronizado e requer estudos adicionais, tais como: qual a fração celular a ser transplantada (HOWS, 2005); qual a via de administração (STRAUER & KORNOWSKI, 2003; ANDERSON et al., 2005); quais maneiras de prevenir a quimiotaxia (VERFAILLIE, 2002), como confirmar a presença das células na lesão por meio de marcadores celulares (GOWDAK et al., 2004); quais os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de diferenciação das células administradas e da funcionalidade das mesmas (HOWS, 2005) e ainda, desconhece-se quais os fatores que auxiliam no reparo ou regeneração de tecidos

lesados. Uemura et al. (2006) sugerem que pode existir uma melhora da condição tecidual por efeitos parácrinos mediado pelas células transplantadas ao invés de um processo de transdiferenciação celular.

Quanto à fração celular transplantada, Gowdak et al. (2004) e Vilas-Boas et al. (2004) afirmam que ao administrar uma fração de células, ao invés de um tipo celular fornece maior suporte à diferenciação celular, justificando a utilização da fração de células mononucleares no presente experimento. Com relação à via de administração, atualmente recomenda-se a via intra-lesional, uma vez que estudos de ANDERSON et al. (2005) e STRAUER & KORNOWSKI (2003) mostraram maiores números de células quando administradas por esta via. Assim neste trabalho, preconizou-se a administração subconjuntival, pois a aplicação da FCM no interior da córnea poderia prejudicar o paralelismo das lamelas corneanas.

Visando aprimorar as técnicas de marcação celular, Dubertret et al. (2002) desenvolveram uma técnica no qual partículas nanométricas (nanocristais) incubadas com células vivas, permitiram o acompanhamento de quimiotaxia celular. Esse trabalho complementado pelo de Mattheakis et al. (2004) e Alivisatos et al. (2005) permite afirmar que os NC são substâncias que são fagocitadas pelas células, o que as torna ideais na marcação de células e tecidos vivos por longos períodos, pois, em certas condições, podem preservar sua fluorescência por até quatro meses, propriedade esta que garante sua superioridade aos fluoróforos convencionais (MICHALET et al., 2005) e corantes orgânicos (ALIVISATOS et al., 2005).

Outros pontos de destaque são a ausência de toxicidade celular destas partículas, como descrito no estudo de Dubertret et al. (2002), os quais realizaram ensaios experimentais com embriões, e a passagem destas substâncias para às células-filhas por seis gerações, sem que haja essa transferência para as células vizinhas (INVITROGEN, 2007). Valendo-se destas informações, os estudos da presença das células mononucleares marcadas com nanocristais foram realizados seis dias após o transplante das mesmas, pois segundo WILCOCK (2005), as primeiras figuras mitóticas límbicas são encontradas 24 horas após a lesão na região perilímbica.

Para a confirmação da presença das CM injetadas pela via subconjuntival, utilizou-se a avaliação de impressões sobre lâminas das regiões de transição cóneo-escleral dos cães dos grupos FC e FT. Por serem detectados por meio de

microscopia de fluorescência (PARAK et al., 2002; MATTHEAKIS et al., 2004), as amostras foram submetidas à análise realizadas por um único avaliador em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan e os resultados obtidos encontram-se agrupados no Quadro 2.

	Olho Esquedo	Olho Direito
Cão 13 Grupo FC	-	-
Cão 14 Grupo FT	+	-
Cão 15 Grupo FT	+	-
Cão 16 Grupo FT	+	-
Cão 17 Grupo FC	-	-
Cão 18 Grupo FC	-	-

Quadro 2- Agrupamento dos resultados obtidos pela verificação da presença das células-tronco marcadas com nanocristal por microscopia epifluorescente em aumento de 40X. Onde FC= animal do grupo controle, FT= animal do grupo tratado, + = positivo quanto à presença de células marcadas, - = negativo quanto à presença de células marcadas.

Analisando as informações acima agrupadas, observou-se que 100% (n=3) dos animais do grupo FT apresentaram resultados positivos com relação à presença de células mononucleares marcadas no olho lesado submetido à ulceração experimental com transplante de CT (olho esquerdo [OE]) (Figura 11a). No entanto, nos olhos contra-laterais, não foram encontradas células marcadas, o que sugere que o procedimento de quimiotaxia (*homing*) não ocorreu.

Nos animais do grupo FC (controle) que receberam apenas solução de NaCl 0,9% incubadas com nanocristais pela via subconjuntival no OE, não foram observados eventos de fluorescência em ambos os olhos (esquerdo e direito [OD]),

sugerindo que os NC, por não serem fagocitados pelas células mononucleares não promoveram artefato de técnica (falso-positivos) (Figura 11b).

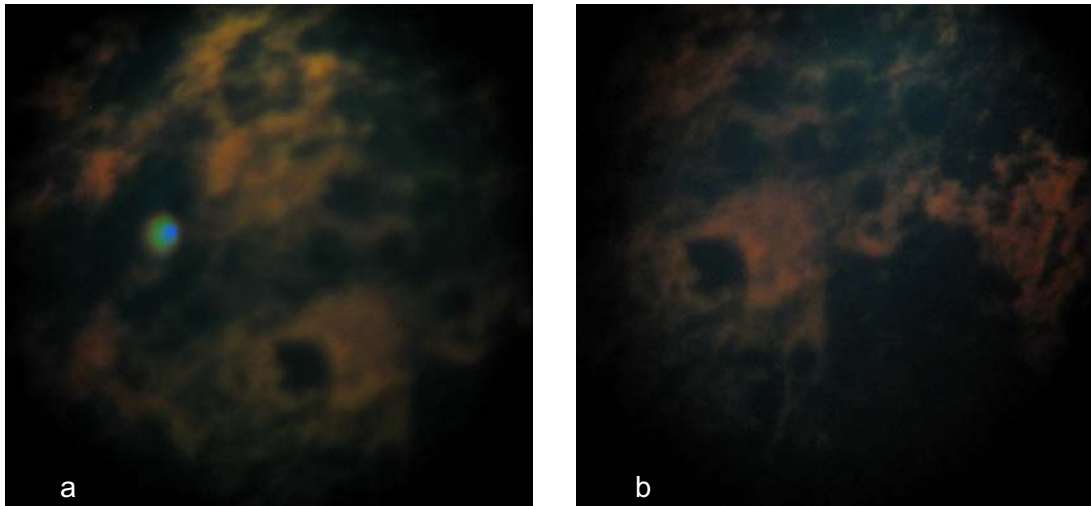


Figura 11- a) Fotomicrografia de impressão da região córneo-escleral de cão do grupo FT submetido à ulceração experimental de córnea e autotransplante de célula mononuclear. Observar a presença de célula marcada com nanocristais (azul-esverdeado) vistas em microscópio de epifluorescência em aumento de 40X. b) Fotomicrografia de impressão da região córneo-escleral de cão do grupo FC submetido à ulceração experimental de córnea. Observar a ausência de células marcadas (controle negativo) vistas em microscópio de epifluorescência em aumento de 40X.

4.4- Avaliação histopatológica

A córnea é uma superfície ocular e é delimitada pelo limbo (SLATTER, 2005). Sua função é atuar como barreira contra o avanço da conjuntiva, proporcionar refração ocular e manter uma barreira física entre o bulbo e o ambiente (SANGWAN, 2001; GUAIMÁS MOYA et al., 2003), para isso, suas cinco camadas devem ser preservadas (HERING, 2003).

Em casos de destruição límbica, como nas queimaduras por bases (CONNERS et al., 1997; NISHIWAKI-DANTAS; CYPEL et al., 2004), ocorre regeneração deficiente do epitélio corneano, demora na cicatrização de erosões corneanas e maior incidência de vascularização e conjuntivalização sobre a córnea (HUANG & TSENG, 1989).

Visando comparar descritivamente os grupos HT e HC, criou-se uma tabela para avaliação dos tecidos lesados, obtendo-se os resultados agrupados no Quadro 3.

Animal	Córnea					Limbo	
	Infl	Reepit	Espess	Angio	Pigment	Infl	Angio
01 – OE NaCl+NC	++ PMN	P	++	-	-	-	-
01 – OD S/A	+ raros	P	+++	+	-	+ MC	-
02 – OE NaCl+NC	+ raros	P fibrose	+++	+	-	-	-
02 – OD S/A	++ PMN	P	+ delgada	+++	-	+	-
03 – OE NaCl+NC	+ raros	P fibrose	++	++	-	+	++
03 – OD S/A	+ raros	P fibrose ++	+	++	-	+	-
04 – OE NaCl+NC	+	P	+	++	-	+++ PMN+MC	++
04 – OD S/A	+	P	+ delgada	++	-	+	-
05 – OE NaCl+NC	++	P	+++	++	-	+	-
05 – OD S/A	+	P fibrose ++	+ delgada	++	-	+	-
06 – OE CM+NC	+	P	+ delgada	+	-	+	++
06 – OD S/A	-	P	+	-	-	-	-
07 – OE CM+NC	+	P	+ delgada	+	-	-	-
07 – OD S/A	++	P	++	+	-	+	-
08 – OE CM+NC	-	P	++	-	-	+	++
08 – OD S/A	+	P	+++	++	-	-	-
09 – OE CM+NC	+	P vacuolização	+ delgada	+++	-	+	-
09 – OD S/A	+	P	+++	+	-	+	-
10 – OE CM+NC	+	P	+	-	-	-	-
10 – OD S/A	+	P	+++	+	-	+	-

Quadro 3- Agrupamento dos resultados obtidos na avaliação histopatológica. Onde Infl = Inflamação, Reepit = Reepitelização, Espess = Espessura, Angio = Angiogênese, Pigment = Pigmentação, OE = olho esquerdo, OD = olho direito, NaCl+NC = administração de solução de cloreto de sódio incubada com nanocristais por via subconjuntival, S/A = sem administração, CM+NC = administração de células mononucleares incubadas com nanocristais pela via subconjuntival, - = ausente, + = leve, ++ = moderada, +++ = acentuada, PMN = polimorfonucleares, MC = monócitos, P = presente 01-10 = número do cão.

Ao analisar o quadro acima quanto à resposta inflamatória dos diferentes grupos, nota-se que dos cinco animais que receberam administração de NaCl 0,9% incubado com nanocristais, 60% (n=3) apresentaram inflamação leve e 40% (n=2) inflamação moderada do local. Dos cinco animais que foram submetidos ao tratamento com células mononucleares, 20% (n=1) não apresentaram inflamação e 80% (n=4) demonstraram inflamação ocular leve (Figura 12). Já nos olhos contralaterais (olhos direitos dos animais de ambos os grupos), observou-se que 10% (n=1) não apresentavam inflamação, contra 70% (n=7) com inflamação leve e 20% (n=2) com inflamação moderada. Assim, sugere-se que as células mononucleares colaboram como mediadores da inflamação ocular por diminuição deste processo nos animais tratados.

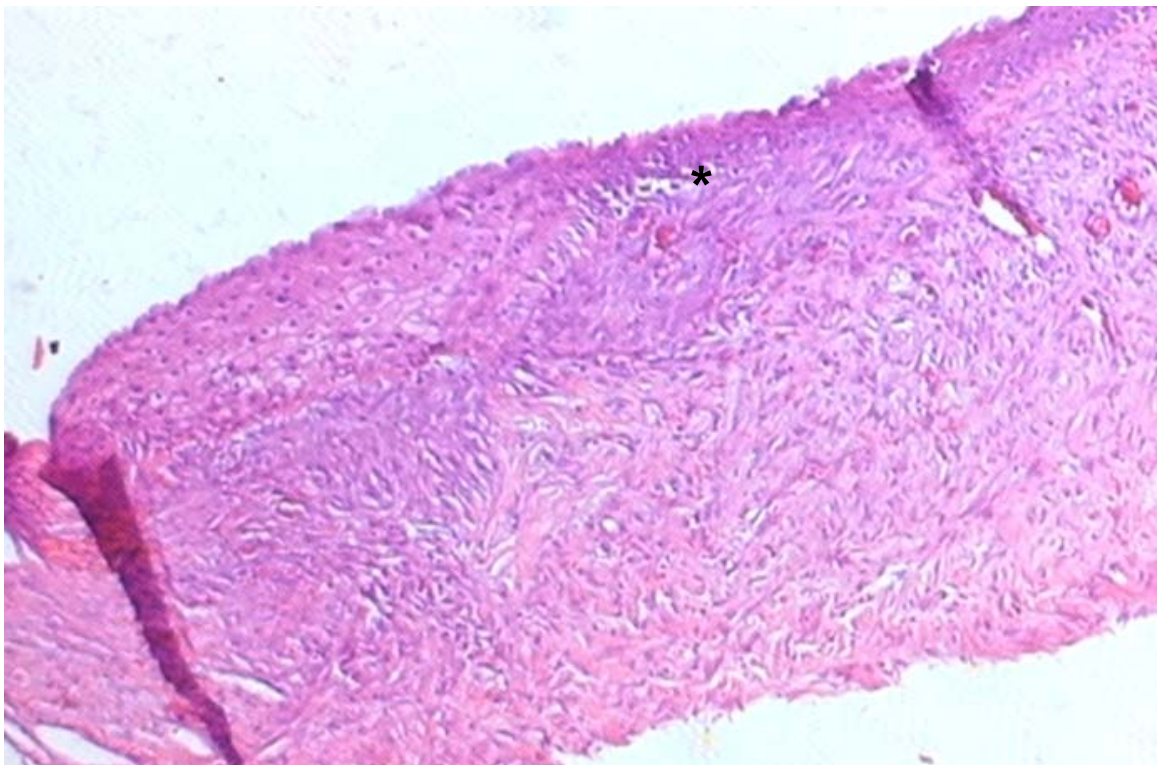


Figura 12- Fotomicrografia realizada sob microscopia óptica convencional. Em destaque encontra-se a área lesada, onde observa-se ausência de processo inflamatório no olho esquerdo do animal número 08 (HE, 40X).

Com relação à reepitelização, 100% dos animais (n=10, ou 20 olhos avaliados) apresentaram esta condição com diferentes graus de resposta, pois dos

cinco bulbos oculares que receberam administração subconjuntival de NaCl 0,9% incubados com nanocristais, 20% (n=1) apresentaram epitélio corneano delgado, 40% (n=2) moderado e 40% (n=2) espesso. Os cinco olhos submetidos ao transplante subconjuntival de células mononucleares incubadas com NC, apresentaram-se da seguinte forma: 80% (n=4) com epitélio corneano de espessura delgada e 20% (n=1) moderada e 0% (n=0) espessa. Já os dez olhos que não receberam administrações subconjuntivais, 50% (n=5) demonstraram fino epitélio corneano, 10%(n=1) moderado e 40% (n=4) com epitélio espesso. Desta forma, o transplante de células mononucleares parece ter influenciado negativamente a regeneração do epitélio corneano (Figura 13).

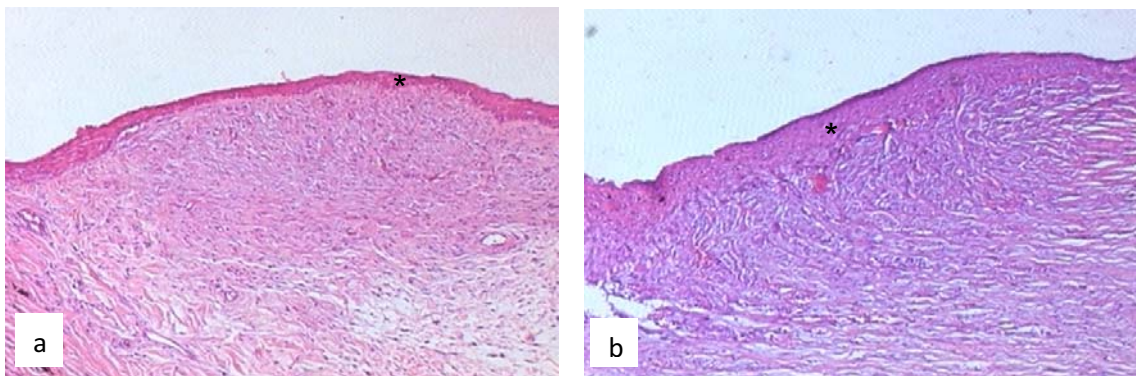


Figura 13- a) Fotomicrografia de análise histopatológica da região lesada do olho esquerdo do cão 09 do grupo HT em microscopia óptica (HE, 4X). Observa-se em destaque, epitélio corneano delgado. b) Fotomicrografia da análise histopatológica da região lesada do olho direito do cão 09 em microscopia óptica (HE, 4X). Observa-se em destaque, o epitélio corneano mais desenvolvido quando comparado à Figura 13a.

5. CONCLUSÕES

Após a realização do experimento e análise dos resultados obtidos é possível concluir que:

1- O modelo experimental de ulceração corneana com papéis filtro Whatman número 42 embebidos em hidróxido de sódio a 2M é de baixo custo, de fácil realização e reprodução, permitindo estudos experimentais no tratamento de úlceras de córnea por substâncias alcalinas.

2- Os nanocristais são eficientes marcadores celulares na avaliação da presença de células mononucleares, a curto prazo, administradas pela via subconjuntival no tratamento experimental de úlcera de córnea iatrogênica por substância de caráter básico em cães.

3- As células mononucleares administradas pela via subconjuntival não auxiliam no processo de cicatrização corneana da úlcera induzida experimentalmente por NaOH a 2M no período de 15 dias.

4- As células mononucleares quando administradas pela via subconjuntival em cães, não sofrem processo de quimiotaxia (*homing*) para o olho lesado contra-lateral.

5- Apesar das células mononucleares não influenciarem de maneira positiva a curto prazo na ulceração de córnea experimentalmente induzida por hidróxido de sódio, estudos abordando o potencial de diferenciação, diminuição do processo inflamatório e funcionalidade destas células devem ser conduzidos.

6. REFERÊNCIAS

APPELBAUM, F. R. et al. Cure of malignant lymphoma in dogs with peripheral blood stem cell transplantation. **Transplantation**, New York, v. 42, n. 1, p. 19-22, jul. 1986.

AHMAD, S. et al. Corneal epithelial stem cells: characterization, culture and transplantation. **Regenerative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 29-44, jan. 2006.

AKPED, E. K.; FOSTER, C. S. Limbal stem cells transplantation. **International Ophthalmology Clinics**, San Bruno, v. 39, p. 71-81, 1999.

ALISON, M. R. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, Boston, v. 406, n. 6793, p. 257, jul. 2000.

ALIVISATOS, A. P. et al. Quantum dots as cellular probes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 7, p. 55-76, ago. 2005.

ANDERSON, D. et al. Cell-based therapy for disc repair. **The Spine Journal**, v. 5, p. 297-303, nov./dez. 2005.

ANDERSON, N. G.; REGILLO, C. Ocular manifestations of graft versus host disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, New Hampshire, v. 15, n. 6, p. 503-507, dez. 2004.

BECHARA, S.J. et al. Uso simultâneo de acetilcisteína e vitamina C na terapêutica das queimaduras corneanas por álcali. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, New York, v. 49, n. 4, p. 109-111, 1986.

BLACK, I. B.; WOODBURY, D. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27, n. 3, p. 632-636, 2001.

BOLKOVÁ, A.; CEJKOVÁ, J. Relationship between various concentrations of NaOH and metabolic effects in experimentally burned rabbit cornea. A biochemical and histochemical study. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, v. 2222, n. 2, p. 86-89, nov. 1984.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.

BRAGA, F. V. A. et al. Ceratoplastia com enxerto autógeno lamelar livre de córnea e pediculado de conjuntiva fixados com adesivo de cianoacrilato em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1119-1126, jul./ago. 2004.

BRUNELLI, A. T. J. et al. Excision of sclerocorneal limbus in dogs and resulting clinical events. Study of an experimental model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 58, n. 1, p. 52-58, out. 2006.

BRUNO, B. et al. CD34⁺ selected bone marrow grafts are radioprotective and establish mixed chimerism in dogs given high dose total body irradiation. **Transplantation**, v. 68, n. 3, p. 338-344, 1999.

BRYDER, D. et al. Hematopoietic stem cells. The paradigmatic tissue-specific stem cell. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 2, p. 338-345, ago. 2006.

CAMPOS, C. F. et al. Ocular alkali lesions in dogs: acetylcysteine and blood serum effects. **Braslian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 40, p. 36-44, jan./fev. 2003.

CANTLEY L. G. Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. **Nature Clinical Practice Nephrology**, Boston, v. 1, n. 1, p. 22-32, nov. 2005.

CHARUKAMNOETKANOK, P. Corneal stem cells: bridging the knowledge gap. **Seminars in Ophthalmology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2006.

CHEN, J. J. Y.; TSENG, S. C. G. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 31, n. 7, p. 1301-1313.

CONNERS, M. S. et al. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 10, p. 1963-1971, set. 1997.

COTSARELIS, G. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. **Experimental Dermatology**, v. 8, p. 80-88, 1999.

CYPEL, M. C. et al. Injeção subconjuntival de soro autógeno no tratamento de queimadura ocular por álcali em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, n. 5, p. 801-805, set./out. 2004.

DANIELS, J. T. et al. Corneal stem cells in review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 6, p. 483-494, 2001.

DEL CARLO, R. J. et al. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 121-126, 1999.

DUA, H. S. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, p. 1407-1411, 1998.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 748-752, 1999.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology**, v. 44, n. 5, p. 415-425, 2000.

DUBERTRET, B. et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. **Science**, Washington, v. 298, p. 1759-1762, nov. 2002.

FAGOT-LARGEAULT, A. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. **Estudos avançados**, v. 18, n. 51, p. 227-245, 2004.

FECHINE-JAMACARU, F. V. et al. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 64-73, jan./fev. 2005.

FORTIER, L. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 415-423, 2005.

FUKUDA, K. Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, p. 25-27, 2003.

GALERA, P. D. et al. Use of fresh autogenous vaginal tunic in the experimental lamellar keratoplasty in dogs (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 457-479, dez. 2000.

GELLAT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1991. 765p.

GELLAT, K. N. Doenças e cirurgias da córnea e esclera do cão. In: _____. **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2003. cap. 7, p.125-164.

GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hematopoietic progenitors. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 16, p. 91-96.

GONÇALVES, G. F. **Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação em solução super saturada de açúcar ou glicerina**. 2000. 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

GOWDAK, L. H. W. et al. Análise crítica da utilização de células-tronco no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n. 1, p. 179-185, 2004.

GUAIMÁS-MOYA, L. E. et al. Queratoplastia lamelar homóloga em caninos: informe preliminar. In: COMUNICACIONES CIENTÍFICAS E TECNOLÓGICAS, 2003, Corrientes. **Anais...** Corrientes: Universidad Nacional Del Nordeste, 2003

HAAMAN, P.; JENSEM, O. M.; SCHIMIDT, P. Limbal autograft transplantation. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 76, p. 117-118, 1998.

HERING, I. P. Corneal surgery: Instrumentation, patient considerations, and surgical principles. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 3, p. 152-160, ago. 2003.

HESS, D. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. **Nature Biotechnology**, Boston, n. 7, p. 763-770, jul. 2003.

HOWS, J. Adult stem cell therapy beyond haemopoietic stem cell transplantation? An update. **Transplant Immunology**, v. 14, p. 221-223, 2005.

HUANG, A. J. W.; TSENG, S. C. G. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 1, p. 96-105, jan. 1991.

HUANG P. P. et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerose obliterans of lower extremities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 3, p. 606-609, 2004.

INVITROGEN. Cellular Analysis. **Biology in context**. California, 2007.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, Boston, v. 418, p. 41-49, jul. 2002.

JENSEN, H. E. **Stereoscopic atlas of ophthalmic surgery of domestic animals**. Saint Louis: Mosby, 1973. 145p.

JOSEPH, A. et al. Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns [commented on *British Journal of Ophthalmology*, v. 86, n. 7, p. 831, 2002]. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 9, p. 165-169, 2001.

JUAN, Y. et al. Effect of exogenous mesenchymal stem cells on wound healing following corneal alkali burn. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 891, 2003.

KENYON, K. R.; TSENG, S. C. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v. 96, p. 709-722, 1989.

KERN, T. J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v. 142, n. 3, p. 643-666, 1990.

KÖRBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, p. 23-24, 2003.

KRUSE, F. E. et al. Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 31, n. 9, p. 1903-1913, 1990.

LAKSHMIPATHY, U. et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. **Stem Cells**, n. 22, p. 531-43, 2004.

LAUWERYNS, B. et al. A new epithelial cell type in the human cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 34, p. 1983-1990, 1993.

LEVINSON, R. A. et al. Ascorbic acid prevents corneal ulceration and perforation following experimental alkali burns. **Investigative Ophthalmology**, v.15, n.12, p. 986-993, dez. 1976.

MATTHEAKIS, L. C. et al. Optical coding of mammalian cells using semiconductor quantum dots. **Analytical Biochemistry**, v. 327, p. 200-208, 2004.

McCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Perspectives on the properties of stem cells. **Nature Medicine**, Boston, v. 11, n. 10, p. 1026-1028, out. 2005.

MEZEY, E. et al. Turning blood into brain: expression of neuronal phenotype in adult mice. **Science**, Washington, v. 290, p. 1775-1779, dez. 2000.

MICHALET, X. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, v. 307, p. 538-544, jan. 2005.

MINGUELL, J. J. et al. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, p. 507-520, 2001.

NAGAYA, N. et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. H2670-H2676, 2004.

NAKAGE, A. P. M. et al. Estudo das células sanguíneas do cordão umbilical de cães. CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS (ANCLIVEPA), 24., 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2003. 1 CD ROM.

NAKAGE, A. P. M. et al. Influência no tipo de parto na hematologia do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 377-380, abr. 2005.

NAKAGE, A. P. M; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 325-329, fev. 2006.

NAKAMURA, T. et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived in mouse cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 2, p. 497-503, fev. 2005.

NEIVA, P. Células que salvam vidas. **Revista Veja**, São Paulo, n. 1932, p. 118-126, 2005.

NISHIWAKI-DANTAS, M. C. et al. Ipsilateral limbal translocation for treatment of partial limbal deficiency secondary to ocular alkali burn. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 9, p. 1031-1033, set. 2001.

OFICJALSKA-MLYNCZAK, J. et al. Limbal stem cell autograft transplantation for persistent epithelial corneal defect after chemical burn of the eye. **Klin Oczna**, v. 100, n. 1, p. 41-43, 1998.

OGAWA, Y. et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 1125-1130, 1999.

ORMEROD, L. D. et al. Dynamics of corneal epithelial healing after an alkali burn. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 8, p. 1784-1793, ago. 1989.

ORMEROD, L. D. et al. Standart models of corneal injury using alkali-immersed filter discs. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 10, n. 10, p. 2148-2153, oct. 1989.

PAJOOHESH-GANJI, A.; STEEP, M. A. In search of markers for the stem cells of the corneal epithelium. **Biology of the cell**, v. 97, n. 4, p. 265-276, 2005.

PARAK, W. J. et al. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. **Advanced Materials**, v. 14, n. 12, p. 882-885, jun. 2002.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Washington, n. 284, p. 143-147, abr. 1999.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, Washington, n. 276, p. 385-405, abr. 1997.

RICE, C. M. Stem cell for the treatment of neurological disease. **Transfusion Medicine**, v. 13, n. 6, p. 353-358, 2003.

RODRIGUES, G. N. et al. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2006.

ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, n. 21, p. 105-110, 2003.

SANGWAN, V.S. Limbal stem cells in health and disease. **Bioscience Reports**, v. 21, n. 4, p. 385-405, ago. 2001.

SCHOENAU, L. S. F.; PIPPI, N. L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **A Hora Veterinária**, v. 12, p. 49-53, 1993.

SERAKINCI, N.; KEITH, W. N. Therapeutic potential of adult stem cells. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 9, p. 1243-1246, 2006.

SLATTER, D. Córnea e esclera. In:_____. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p. 283-338.

SLATTER, D.; HÅKANSON, N. Córnea e esclerótica. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. cap. 86, p. 1436-1461.

SOSNOVÁ, M.; BRADL, M.; FORRESTER, J. V. CD 34⁺ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. **Stem Cells**, v. 23, p. 507-515, 2005.

STADES, C. F. et al. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. 203p.

STARTUP, F. C. Corneal ulceration in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 25, p. 737-752, 1984.

STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**, v. 107, p. 929-934, fev. 2003.

SUTER, S. E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34 cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 101, p. 31-37, 2004.

SWIFT, G. J. et al. Survival of rabbit limbal stem cell allografts. **Transplantation**, v. 62, p. 568-574, 1996.

TANG, J. et al. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 30, p. 353-361, 2006.

TEMPLE, S. Stem cell plasticity – building the brain of our dreams. **Nature Reviews – Neuroscience**, Boston, v. 2, n. 7, p. 513-520, jul. 2001.

THEISE, N. D. et al. Radiation pneumonitis in mice. A severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 11, p. 1333-1338, 2002.

TI, S. E. et al. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 8, p. 2584-2592, ago. 2002.

TOGNOLI, G. K. et al. Isolamento, quantificação e viabilidade da fração total de células mononucleares da medula óssea em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 28., 2007, Florianópolis. **Anais...** Porto Alegre: Acta Scientiae Veterinariae, v. 35, 2007. Suplemento, p. 228-230.

TOMITA, M. et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. **Stem Cells**, v. 20, p. 279-283, 2002.

TOMITA, M. et al. Choroidal neovascularization is provided by bone marrow cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 21-26, 2004.

UEMURA, R. et al. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. **Circulation Research**, v. 98, p. 1414-1421, 2006.

WAGONER, M.D. Chemical injuries of the eye: current topics in pathophysiology and therapy. **Survey of Ophthalmology**, v. 41, n. 4, p. 275-313, 1997.

WANG, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. **Nature**, Boston, n. 422, p. 897-901, abr. 2003.

WILCOCK, B. Patologia geral do olho. In: SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 4, p. 77-96.

VAJPAYEE, R. B. et al. Large-diameter lamellar keratoplasty in severe ocular alkali burns. A technique of stem cell transplantation. **Ophthalmology**, v. 107, n. 9, p. 1765-1768, 2000.

VAQUERO, J. et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats. Systemic or local administration? **Neuroscience Letters**, v. 398, p. 129-134, 2006.

VERFAILLIE, C. M. Hematopoietic stem cells for transplantation. **Nature Immunology**, Boston, v. 3, n. 4, p. 314-317, abr. 2002.

VILAS-BOAS, F. et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chaga's disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Salvador, v. 82, n. 2, p. 185-187, 2004.

VOLLWEILER, J. L. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, p. 1-7, 2003.

YANLING, M. et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 315-321, 2006.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.