



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

VICTOR MORAES AMORIM

TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM ÚLCERA DE
CÓRNEA PROFUNDA EM CÃES

BRASÍLIA

2021



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

VICTOR MORAES AMORIM

TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM ÚLCERA DE
CÓRNEA PROFUNDA EM CÃES

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Carlos Alberto da Cruz Júnior

BRASÍLIA

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador o professor Carlos Alberto da Cruz Júnior por aceitar conduzir o meu trabalho de iniciação científica e pela orientação na condução do trabalho.

Ao laboratório de biotecnologia animal - Bio cell terapia celular por aceitar a parceria com a faculdade para a realização do trabalho de iniciação científica.

Aos colaboradores do laboratório Bio cell, principalmente as médicas veterinárias Patricia Furtado Malard e Hilana dos Santos Sena Brunel, e a biomédica Carla Lujan, por aceitarem participar do trabalho de iniciação científica de forma voluntária, pela orientação na condução do trabalho, pelos ensinamentos fornecidos, pela orientação diária e pela oportunidade de colocar em prática a teoria vista em sala de aula.

Ao médico veterinário oftalmologista Mário Falcão pelos ensinamentos fornecidos, as dúvidas tiradas e o encaminhamento de vários pacientes para o melhor tratamento de Brasília, a célula-tronco.

RESUMO

A úlcera de córnea consiste na lesão do tecido epitelial a córnea, o qual tem a função de proteger o olho contra o meio externo. A úlcera é uma das doenças oculares mais comuns nos pequenos animais e se não for tratada de forma adequada pode levar à perda de visão do animal. O tratamento atual para a úlcera pode ser realizado de forma clínica, com colírios, ou cirúrgico, utilizando enxertos ou o cobrimento da lesão com a pálpebra e conjuntiva. As células-tronco mesenquimais (CTM) produzem fatores parácrinos (citocinas e fatores de crescimento), que apresentam propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, anti-fibroticas, e estimulam a multiplicação celular, tornando uma possível alternativa para o tratamento da úlcera de córnea. Nesse trabalho foi acompanhado um caso de úlcera de córnea profunda em um cão, fêmea SRD, que não respondeu ao tratamento clínico com colírios e não estava apta a realizar uma cirurgia. O animal foi encaminhado para a Bio Cell Terapia Celular, onde foi realizado a terapia com CTM com a aplicação de 4×10^6 de células derivadas de tecido adiposo, aplicadas por meio de instilação ocular e via subconjuntival. Após o tratamento, o animal apresentou melhora dos sinais clínicos e na cicatrização, sendo que essa foi completa após 14 dias do tratamento, com pouca formação de tecido cicatricial. Os fatores parácrinos da CTM possivelmente atuaram na estimulação da multiplicação celular e na inibição da inflamação crônica, impedindo a formação do tecido cicatricial. Foi concluído que no caso avaliado, o uso de CTM auxiliou na cicatrização da úlcera de córnea profunda.

Palavras-chave: cicatrização; citocinas; efeito parácrino.

SUMARIO

INTRODUÇÃO	1
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
MÉTODO.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
CONSIDERAÇÕES FINAIS (CONCLUSÃO)	9
REFERÊNCIAS	10

INTRODUÇÃO

A úlcera de córnea ou ceratite ulcerativa, é uma doença que consiste na lesão e inflamação da parte mais externa do tecido epitelial ocular a córnea, sendo uma das doenças oculares mais comuns nos pequenos animais, que pode causar perda de visão. A córnea tem a importante função de barreira do olho contra o meio externo, protegendo contra danos, agentes físicos e químicos. (BERCHT, 2009). As principais causas de úlcera de córnea são traumas, alterações nas pálpebras e cílios (entrópio, distiquíase, triquíase), afecções imunomediadas, lesão química, infecções microbianas, alterações na produção do humor aquoso; todos esses agentes podem causar danos ao tecido da córnea.

O diagnóstico da causa da úlcera de córnea é realizado através avaliação minuciosa de todas as estruturas do olho, para identificar alguma alteração de pálpebra, cílios e glândulas, realizar o teste de Schirmer e o teste com a fluoresceína. A confirmação da úlcera de córnea é realizada pelo do teste de fluoresceína, que cora o estroma e as células epiteliais danificadas, identificando o local da lesão. A úlcera de córnea pode ser classificada em úlcera superficial (quando ocorre danos a camada mais superficial da córnea: o epitélio), úlcera profunda (quando o dano afeta a segunda camada da córnea: o estroma) e perfuração corneana (quando ocorre dano em todas as camadas) (SILVA, 2019).

O tratamento para a úlcera pode ser clínico ou cirúrgico, dependendo da gravidade de cada caso. O tratamento clínico consiste na utilização de colírios anti-microbianos, repositores de lágrimas, anti-inflamatórios esteroidal e não esteroidal. Dentro da abordagem cirúrgica, vários procedimentos podem ser realizados, dentre eles os principais são: a aplicação de adesivos teciduais, recobrimento da lesão com terceira pálpebra, recobrimento com tecido conjuntival pediculado, recobrimento conjuntival em 360º e ceratoplastia reconstrutiva (BERCHT, 2009). Mas alternativas de tratamento vêm sendo desenvolvidas, como o uso de terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM).

Segundo Nauta e Fibbe (2007) as CTM são obtidas a partir de diversos tecidos, entre eles a medula óssea, polpa dentária ou tecido adiposo. São células multipotentes, capazes de se multiplicar e diferenciar em várias linhagens de tecidos mesenquimais (como os adipócitos, osteoblastos e condrócitos). As CTM apresentam quimiotaxia pelo processo inflamatório, um

microambiente com grande concentração de citocinas pró-inflamatórias e células em apoptose, gerando uma resposta a esse microambiente em que estão. A resposta das CTM ao microambiente é a produção de fatores parácrinos (citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento), causando a diminuição da inflamação, modulação da resposta imunológica, estimulação da angiogênese, aumento da taxa de multiplicação celular, diminuição da apoptose e auxílio à recuperação das células danificadas (SPEES; LEE; GREGORY, 2016).

Considerando os mecanismos de ação das CTM, alguns trabalhos já relatam os efeitos benéficos do tratamento de úlcera de córnea profunda com o uso de CTM (FALCÃO et al, 2018; DENG, SANTOS & GEE, 2020). O objetivo do estudo foi avaliar a terapia celular com uso de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo para o tratamento de úlcera de córnea profunda não responsiva ao tratamento convencional em cão.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A úlcera de córnea é causada pela perda de pelo menos uma ou mais camadas do tecido da córnea. A córnea é formada por 4 camadas: o epitélio, o estroma, a membrana descemet e o endotélio. O olho do cão é composto por várias estruturas responsáveis pela proteção, nutrição e percepção da luz, importantes para a formação da imagem. A córnea é a parte mais externa do olho, por ser transparente ela que tenha a passagem da luz para a retina no interior do olho. Na retina é onde estão presentes as células fotossensíveis, responsáveis por transformar a luz em impulsos nervosos para o nervo óptico (KLEIN, 2014).

A cicatrização da córnea começa após a lesão com a liberação de algumas substâncias tamponantes e citocinas pró-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias estimulam a angiogênese e atraem por quimiotaxia leucócitos, que através do filme lacrimal e do estroma chegam à área afetada, para realizar a limpeza da área dos debris celulares. Após a limpeza ocorre a mitose do tecido saudável adjacente e o deslize das células saudáveis sobre a área danificada. O processo de cicatrização pode durar por volta de alguns dias a 6 semanas dependendo do tamanho da lesão. Úlceras mais profundas estão mais associadas a uma maior formação de tecido cicatricial, uma maior neovascularização e inflamação crônica, que resultam na liberação de enzimas que degradam o colágeno presente na matriz extracelular do tecido saudável (BERCHT, 2009).

Podem ocorrer complicações no processo de cicatrização quando não há a correção da causa base da lesão ou quando tem a contaminação microbiana da córnea. A córnea, quando está íntegra, é resistente a infecções microbianas, mas por conta da lesão ocorre a tendência à invasão e infecção da área lesionada. A infecção é inicialmente combatida pelos neutrófilos, mas se não for debelada pode levar à cronificação da inflamação. Quando há a inflamação crônica, ocorre a liberação de enzimas, que degradam o colágeno presente no estroma, causando a formação do “melting” e podendo levar a perfuração do olho. A degradação do colágeno da matriz extracelular, causa uma maior formação tecido cicatricial (tecido fibroso) na córnea que limita a visão, por impedir a passagem da luz (MAZZI; DIAS, 2018).

Segundo Deng e colaboradores (2020) as CTM atuam no tecido lesionado produzindo vesículas contendo seus fatores parácrinos (citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento), que tem propriedades anti-inflamatórias, modulam o sistema imune, estimulam a multiplicação celular e possuem efeito anti-fibrótico e anti-angiogênico. Assim, estimulando a multiplicação celular e a cicatrização, e evitando a inflamação crônica e a formação de tecido cicatricial. Essas características tornam o uso de CTM uma alternativa para substituir o tratamento clínico e cirúrgico da úlcera de córnea (FALCÃO; et al, 2018)

MÉTODO

As CTM foram isoladas e cultivadas a partir de tecido adiposo de um cão doador sadio. Para a coleta do tecido adiposo, o doador foi anestesiado, uma incisão foi feita na região lombar e aproximadamente 20 g de tecido adiposo foram coletados da base da cauda. O tecido adiposo foi lavado em solução salina de fosfato para remover resíduos celulares e sanguíneos, cortado em pequenos pedaços e, depois, exposto à hialuronidase, para passar por uma digestão enzimática. Depois disso, as células passaram por um processo de filtração para iniciar uma seleção das CTM. Posteriormente, as células foram colocadas em frascos de cultura com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e foram incubadas a 37,5°C e 5% de CO₂. Após 24h, o meio foi descartado com as células não aderentes e o meio de cultura fresco foi adicionado aos frascos. O meio foi trocado a cada 3 dias, até as células atingirem 80% de confluência, quando foi realizada tripsinização para retirar as células das garrafas, contagem na câmara de Neubauer e envase em palhetas (1x10⁶ células / palheta) para congelamento com DMSO e soro fetal bovino no nitrogênio líquido. Cinco palhetas (5x10⁶ células) foram descongeladas para caracterização das CTM.

A caracterização das CTM foi realizada de acordo com a International Society for Cell Therapy. As CTM devem ser possuir certas propriedades específicas: serem aderentes ao plástico, expressar marcadores de superfície específicos e capaz de se diferenciar em outros tipos de tecido; analisados por citometria de fluxo no Amnis® Imaging Flow Cytometer. As CTM devem apresentar 95% dos receptores de superfície: CD73, CD90 e CD105 e os fatores de transcrição intranuclear: OCT3.4 e SOX-2; não expressando menos de 2% dos receptores: CD14 ou CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79 e MHC classe II. Também devem ser capazes de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos in vitro.

O meio de cultura das células (DMEM) foram analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR), em busca de contaminantes ou patógenos (fungos, micoplasma e bactérias). Foi realizado a viabilidade das CTM após o descongelamento, por meio da citometria de fluxo.

Para o estudo foi selecionado o caso de um cão, fêmea SRD, diagnosticada com úlcera de córnea profunda no olho direito pelo médico veterinário oftalmologista, causada por infecção microbiana. O animal não respondeu ao tratamento clínico com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e Vigamox, e não estava apto a passar por cirurgia, por alterações no

exame de sangue. O animal foi encaminhado para a Bio Cell Terapia Celular para realizar a terapia celular com o uso de CTM derivada de tecido adiposo. O diagnóstico da úlcera de córnea foi realizado por meio da avaliação clínica combinada com a teste de fluoresceína, realizado pelo médico veterinário especialista em oftalmologia.

Para a aplicação das CTM halógenas foram utilizadas as palhetas produzidas pelo laboratório e congeladas com nitrogênio líquido. As CTM foram descongeladas e lavadas utilizando meio de lavagem e suspensas em meio de transporte, produzidos pelo laboratório. O protocolo utilizado para o tratamento foi de 1 aplicação de CTM, com 4×10^6 células divididas em 12 seringas de 1mL. Uma seringa foi aplicada subconjuntival, na hora da aplicação, e as outras 11 seringas foram aplicadas por meio de instilação realizada pelo próprio tutor do animal em casa, com intervalo de 1 hora entre cada aplicação. Antes do tratamento os tutores dos animais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para a terapia com CTM, autorizando a publicação dos resultados obtidos pelo tratamento.

Foi realizado nos dias 1 e 15 após cada aplicação o contato com os tutores por telefone para verificar se houve qualquer reação adversa com o animal. Nos dias 3, 7 e 14 após o tratamento o animal retornou para avaliação oftalmológica, para avaliar a resposta do animal ao tratamento de CTM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o animal não responder ao tratamento clínico foi realizado o tratamento com CTM, que apresentou resposta com melhora dos sinais clínicos e na cicatrização da lesão após 14 dias do tratamento, de acordo com a figura 1.

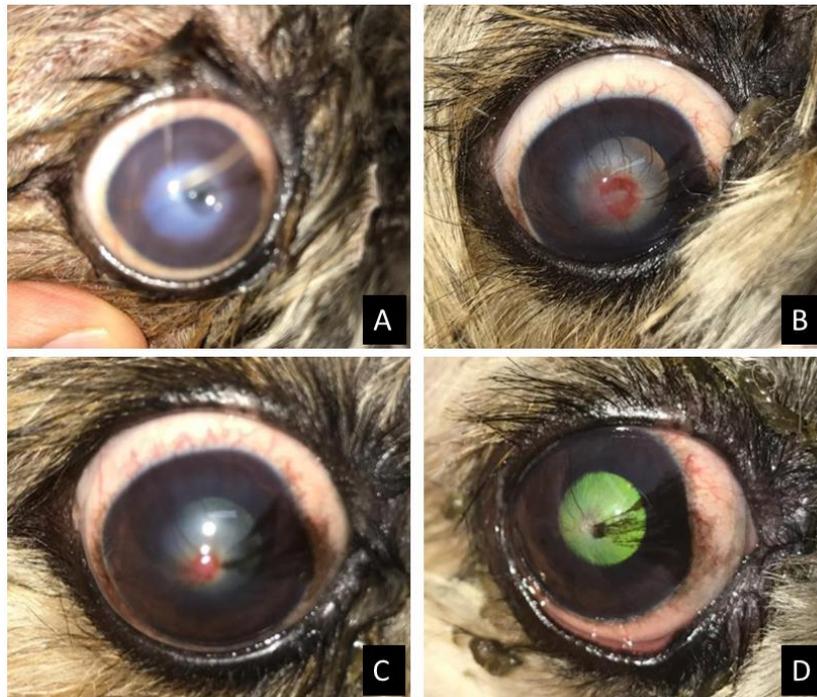


Figura 1 – Progressão da úlcera de córnea ao tratamento com CTM: figura 1A: úlcera antes do tratamento com CTM; figura 1B: úlcera 3 dias após o tratamento, apresentou sinais de melhora na cicatrização; figura 1C: 7 dias após o tratamento, a lesão apresenta-se quase completamente cicatrizada. Na figura 1D: 14 dias após o tratamento, com a cicatrização completa da lesão e a formação de uma pequena área de tecido cicatricial, que não deve dificultar ou limitar muito o campo de visão do animal. Fonte: Imagens cedidas por Mário Falcão.

Segundo Al-Jaibaji e colaboradores (2020) os fatores parácrinos produzidos pela CTM estimulam a multiplicação celular, o que diminui o tempo de cicatrização da lesão, fato que pode ser observado no caso apresentado. De acordo com Hertsenberg e colaboradores (2017) uma menor formação de tecido cicatricial pode ser causada pela ação da CTM através do seu efeito anti-inflamatório, imunomodulador e anti-fibrotico, que inibe a inflamação crônica e a infiltração de leucócitos na área da lesão, impedindo a opacidade da córnea, degeneração da

matrix extracelular e do colágeno impedindo a formação de tecido fibroso (ZEPPIERI; et al., 2017)

CONSIDERAÇÕES FINAIS (CONCLUSÃO)

O presente estudo demonstrou que o tratamento com células-tronco mesenquimais derivada de tecido adiposo auxiliou na cicatrização da úlcera de córnea profunda no olho do animal avaliado, consequentemente preservando a visão do animal. A terapia com células-tronco para úlcera de córnea em cães já é um tratamento reconhecido e autorizado pelas agências reguladoras, podendo ser uma excelente opção para casos refratários como o avaliado no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- AL-JAIBAJI, Olla; et al. Hypothermically Stored Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cell Alginate Bandages Facilitate Use of Paracrine Molecules for Corneal Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 21, v. 16, aug. 2020. DOI: 10.3390/ijms21165849. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32823996/>. Acesso em: 29 jul.2021.
- BERCHT, Stefano. **ÚLCERA DE CórNEA PROFUNDA EM CÃES**. 2009. Monografia (Bacharelado em medicina veterinária) – Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- DENG, Sophie X; SANTOS, Aurelie; GEE, Serina. Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles for the Treatment of Corneal Injuries and Scars. **Translational Vision Science & Technology**, v. 9, n.12, p. 1-10, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1167/tvst.9.12.1>. Disponível em: <https://tvst.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2771905>. Acesso em: 4 jul.2021.
- FALCÃO, Mário Sérgio Almeida; et al. Effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) on corneal wound healing in dogs. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 5, p. 440-445, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.04.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411018307958?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jul. 2021.
- HERTSENBERG, Andrew J.; et al. Corneal stromal stem cells reduce corneal scarring by mediating neutrophil infiltration after wounding. **PLUS One**, v. 12, n. 3. 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0171712](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171712). Acesso em: 30 jun. 2021.
- KLEIN, Bladley G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5. ed. São Paulo: GEN Guanabara Koogan, 2014.
- MAZZI, Marcelo Fialho; DIAS, Mariza D'Agostino. Ceratite ulcerativa corneana traumática em cão: tratamento com oxigenoterapia hiperbárica. **PUBVET: Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 12, n. 12, p. 1-8, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n12a226.1-8>. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/5299/ceratite-ulcerativa-corneana-traumaacutetica-em-catildeo-tratamento-com-oxigenoterapia-hiperbaacuterica>. Acesso em: 23 de jun. 2021.
- NAUTA, Alma J.; FIBBE, Willem E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **BLOOD**, v. 110, n. 10, nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30516112/#:~:text=Abstract,innate%20and%20adaptive%20immune%20response>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- SILVA, Kimberly Félix. OCORRÊNCIA DE ÚLCERA DE CórNEA EM CANINOS: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 310 CASOS. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SPEES, Jeffrey L.; LEE, Ryang Hwa; GREGORY, Carl A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 125, aug. 2016. DOI: 10.1186/s13287-016-0363-7. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0363-7>. Acesso em: 26 jul. 2021.

ZEPPIERI, Marco; et al. Adipose Derived Stem Cells for Corneal Wound Healing after Laser Induced Corneal Lesions in Mice. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 12, dez. 2017. DOI: 10.3390/jcm6120115. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29206194/>. Acesso em 01 de ago. 2021.