

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizers pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 91-106, 2005.

CASTANO A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 535-545, 2006.

CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃO COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES

RAMOS S.D.; CRUZ, R.M.A.; MIGLINO M.A.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B., PIGNATARI, G.C.

Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo

Introdução: A Ceratoconjuntivite Seca (KCS – *Keratoconjunctivitis Sicca*) é uma condição multifatorial que geralmente resulta de alterações quantitativas do componente aquoso do filme lacrimal, podendo ainda, decorrer de deficiência dos componentes lipídicos e mucoso, normalmente atribuída a uma desordem imunomediada. O diagnóstico da KCS é baseado nos sinais clínicos tais como: secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, blefaroespasm, fotofobia, incômodo, dor, vascularização, pigmentação e opacidade corneana. Para tanto, dois testes oftalmológicos simples podem ser realizados: o teste de Schirmer e o Butt. O tratamento convencional preconizado hoje são aplicações diárias de pomada ou, então de colírio oftálmicos à base de Ciclosporina 0,2% ou Tacrolimus 0,03%. Esses tratamentos são custosos, não curativos e exigem muito a colaboração do proprietário. Nos últimos anos a terapia celular com células-tronco trouxe uma nova esperança para o cenário da medicina veterinária quanto ao tratamento de doenças que ainda não possuem um tratamento efetivo. A obtenção de células-tronco de anexos embrionários, nos quais os tecidos são comumente descartados no momento do nascimento ou em campanhas de castração, está se tornando muito interessante. Já foi descrito que as células-tronco obtidas da membrana amniótica humana possuem propriedades regenerativas e imunomoduladoras observadas em células-tronco mesenquimais obtidas de outras fontes. O isolamento e a caracterização de células-tronco de membrana amniótica de cães em diferentes períodos gestacionais já foram obtidos com sucesso. Além da caracterização, estas células foram testadas quanto sua capacidade tumorigênica, quando da sua injeção de aproximadamente um milhão destas células-tronco pela via subcutânea na região cervical de camundongos imunossuprimidos e não foi constatada a formação tumoral, após 60 dias da injeção. O presente trabalho foi delineado para avaliar a eficiência do emprego de células-tronco da membrana amniótica para o tratamento da KCS em cães. Foram empregados os parâmetros clínicos rotineiros em oftalmologia para os sinais clínicos bem como, os testes oftálmicos, de Schirmer e Butt. Além disso, o potencial imunomodulador das células foi investigado com a avaliação citológica de um raspado antes e após o tratamento com as células, tendo em vista o controle da evolução do processo inflamatório. **Material e métodos:** Dois animais de espécie canina, sexo feminino da raça *Golden Retriever* provenientes do canil da Faculdade de Medicina Veterinária com idade média de sete anos e em grau crônico de KCS foram selecionados. Após a seleção, esses animais foram submetidos ao tratamento com células-tronco de membrana amniótica após aprovação pelo comitê de ética CEUA/Vet nº 3122/2013. As células-tronco de membrana amniótica foram injetadas em ambas as glândulas lacrimais da terceira pálpebra, duas vezes com intervalo de 30 dias cada. Na primeira injeção foram utilizadas $0,5 \times 10^6$ células em cada glândula e na segunda 1×10^6 . Após o tratamento, os animais foram avaliados semanalmente por exame oftalmológico e testes oftálmicos. **Resultados:**

Antes da injeção celular, os dois animais incluídos no estudo foram submetidos a um exame oftalmológico que novamente confirmou o padrão crônico da KCS (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da avaliação oftalmológica dos animais incluídos no tratamento com células-tronco de membrana amniótica antes da injeção nas caninas 1 e 2

Testes/Avaliação Oftalmológica	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	02/03	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração +++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	11/13	13/11
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Mudanças significativas não foram observadas nos parâmetros oftalmológicos após sete dias de tratamento. Entretanto, o aspecto das glândulas lacrimais destes animais se apresentaram mais próximos da normalidade após sete dias do tratamento (tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da avaliação oftalmológica após sete dias de tratamento com as células-tronco de membrana amniótica nas caninas 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	03/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração: ++ AO	Degeneração: +++ AO
PIO	12/13	13/13
Aspecto corneano	Opacidade: ++OD +++OE Pigmentação: +++ AO	Opacidade: ++++ AO Pigmentação: ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Conforme mostra a tabela 3, após 14 dias de tratamento com as células-tronco, os dois animais apresentaram um aumento no teste de Schirmer, sendo este bem mais significativo no animal 1. Além disso, a secreção mucopurulenta mostrou-se reduzida nos olhos do animal 2.

Tabela 3 - Resultados da avaliação oftalmológica 14 dias após tratamento com células-tronco de membrana amniótica nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	09/09	00/01
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Após 21 dias da implantação, a quantidade da secreção continuava a mesma, porém houve uma redução em torno de 50% no teste lacrimal de Schirmer. Nenhuma mudança no aspecto das glândulas lacrimais da terceira pálpebra essa fase foi distinta do observado aos após sete dias de tratamento.

Tabela 4 - Resultados da avaliação oftalmológica aos 21 dias de tratamento dos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	04/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++ OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

O exame oftalmológico 30 dias após implantação demonstrou que o Teste de Schirmer apresentou valores iguais ao do início do estudo e as glândulas lacrimais da terceira pálpebra voltaram também ao seu aspecto inicial, ou seja, o que eram antes da implantação. No entanto, notou-se nos dois animais a

pigmentação corneana encontrava-se menos homogênea (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da avaliação oftalmológica 30 dias após implantação das células-tronco nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	04/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação +++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Nesta mesma ocasião, 30 dias após injeção foi realizada nova aplicação com cerca de 1.000.000 de células-tronco em cada glândula lacrimal da terceira pálpebra. Após sete dias dessa nova injeção houve uma redução no teste de Schirmer do cão1, a menos afetada foi observada. O teste de Schirmer também se apresentou reduzido, porém notou-se que a secreção mucopurulenta também foi reduzida significativamente não voltando ao estágio inicial, principalmente no cão2, a mais afetada.

Tabela 6. Resultados da avaliação oftalmológica aos sete dias após a segunda implantação das células-tronco nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	02/03	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++ OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação +++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Conclusão: Após a injeção das células-tronco de membrana amniótica houve melhora no teste de Schirmer após quinze dias da inoculação, porém ao longo do período de tratamento não foi observada melhora clínica significante. Entretanto, o aspecto da glândula foi diferenciado, e a secreção mucopurulenta apresentou redução na sua quantidade desde a primeira semana de tratamento. Diante destes resultados pode-se concluir que o estágio crônico o qual os animais se encontravam pode ser um fator limitante tornando a KCS irreversível nesses casos. Dessa forma precisa ser avaliado, o tratamento de animais que estejam em estágios menos avançados da doença.

SUSCEPTIBILIDADE DE HAMSTERS FRENTE À INFECÇÃO PELO HERPESVIRUS EQUINO TIPO 1 CAUSANDO ENCEFALITE E DOENÇA RESPIRATÓRIA

ARÉVALO, A.F.¹; MORI, E.^{1,2}; MORI, C.M.C.¹; CUNHA, E.M.S.³; LARA, M.C.C.S.H.³; VILLALOBOS, E.M.C.³; MIYASHIRO, S. I.¹; ZANATTO, D. A.¹; TONIETTI, P.O.¹; GAMON, T.H.¹; MAIORKA, P.C.¹

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
2. Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil
3. Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil

Introdução e objetivos: O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) é um patógeno de suma importância, responsável por perdas significativas nos plantéis, fato que, sob o ponto de vista econômico, o torna uma ameaça potencial à criação mundial de cavalos uma vez que a sua distribuição é cosmopolita. Esse vírus tem sido identificado como a causa de abortamentos, mortalidade neonatal, doença respiratória e manifestações neurológicas em cavalos [1,2]. Modelos experimentais de infecção pelo EHV-1 utilizando roedores, como camundongos e hamsters, são úteis para o estudo da resposta

do hospedeiro ao vírus, pois muitos dos aspectos da etiopatogenia da doença nessas espécies se assemelham aos observados no hospedeiro natural [3]. O camundongo é um excelente modelo para estudo da etiopatogenia da encefalite causada por estirpes neuropatogênicas do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) [4]. No entanto, pesquisas recentes evidenciaram que a infecção estabelecida pela via intranasal em hamsters resultou em sintomas mais agudos e severos do que nos camundongos, sugerindo uma maior susceptibilidade da espécie ao agente [5,6]. Com base nesses dados, o presente trabalho foi delineado para avaliar as alterações respiratórias e neurológicas decorrentes da infecção pelo EHV-1 em hamsters, comparando a susceptibilidade desse modelo com estudos realizados em camundongos e equinos. **Materiais e métodos:** Hamsters Sírios machos, com três semanas de idade, foram infectados pela via intranasal com estirpes do EHV-1, obtidas de fetos abortados e potros infectados pelo vírus (A4/72, A9/92, A3/97 e ISO/72). Os hamsters foram pesados e examinados diariamente observando-se o aparecimento de manifestações neurológicas e/ou respiratórias da doença. De acordo com o aparecimento dos sintomas, grupos de cinco hamsters foram submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano e deles foram coletados os materiais: SNC, pulmões, timo, fígado e baço que foram encaminhados tanto para a realização de isolamento viral em cultura de células E-dermal como para exame histopatológico. Em uma segunda etapa que também utilizou cinco hamsters por grupo, inoculados com as mesmas estirpes virais, após eutanásia por aplicação intraperitoneal de overdose de cetamina e xilazina, foi realizada para a obtenção do lavado bronco-alveolar (LBA). Foi determinada a contagem total e diferencial de glóbulos brancos a partir do LBA dos hamsters. **Resultados e discussão:** De forma similar aos experimentos realizados com camundongos, os hamsters desafiados com as estirpes A4/72 e A9/92 apresentaram manifestações clínicas severas no 3º dia pós-inoculação (dpi) tais como a perda de peso representada no gráfico 1, apatia, dispnéia, desidratação, decúbito e morte. Também foram observados sinais neurológicos como hiperexcitabilidade, paralisia espástica, perda de propriocepção, andar em círculos e convulsões. Ao contrário do modelo murino, em que não foi desenvolvida a doença, os hamsters inoculados com as estirpes A3/97 e ISO/72 apresentaram sintomas clínicos e neurológicos no 4º dpi, onde as alterações respiratórias foram as mais evidentes, com destaque para a epistaxe. O isolamento do vírus do SNC foi positivo em todos os animais; no entanto, os pulmões foram positivos apenas nos grupos infectados pelas estirpes A9/92 e A4/72. Nos demais órgãos houve variação de resultado entre os grupos como visualizado na tabela 1. O LBA mostrou que a contagem total de leucócitos apresentou maior número de células brancas nos hamsters infectados por A4/72 quando comparado com A9/92, A3/97 e ISO/72 e grupo controle. Entretanto, o aumento de leucócitos total encontrado nos grupos de hamsters inoculados não foi significativo ($p > 0,05$) quando comparado ao valor de leucócitos total do grupo controle. Macrófagos ativados com citoplasma bastante vacuolizado, alguns deles contendo grânulos intracitoplasmáticos e uma grande quantidade de eritrócitos foi observada em esfregaços da maioria dos animais inoculados ao contrário dos esfregaços do grupo controle, que em sua maior parte apresentou apenas células macrofágicas de citoplasma vacuolizado e raros eritrócitos. Os valores apresentados na tabela 2 revelam que a contagem total e diferencial de leucócitos variou tanto entre as estirpes como também entre os indivíduos de um mesmo grupo. De modo semelhante ao descrito em cavalos em experimentos de inoculação com EHV-1 [7], na contagem diferencial no LBA notou-se nos hamsters infectados apresentaram um aumento no número de neutrófilos acompanhado de um decréscimo de macrófagos, enquanto no grupo controle a célula predominante foi o macrófago variando de 90 a 100% da contagem total dos leucócitos como observado na tabela 2. Os grupos de hamsters infectados por A3/97 e A4/72 apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) de neutrófilos, porém, apenas o grupo infectado por A3/97 apresentou uma diminuição significativa de macrófagos