



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

LUÍS FELIPE DA COSTA ZULIM

**DIMENSÃO FRACTAL COMO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE DIFERENTES
PROTOCOLOS NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Presidente Prudente - SP
2020



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

LUÍS FELIPE DA COSTA ZULIM

**DIMENSÃO FRACTAL COMO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE DIFERENTES
PROTOCOLOS NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Orientadora:
Dra. Sílvia M. C. Franco Andrade

Presidente Prudente - SP
2020

636.078
Z94d

Zulim, Luís Felipe da Costa.

Dimensão fractal como método de avaliação de diferentes protocolos no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães / Luís Felipe da Costa Zulim. – Presidente Prudente, 2020.
68f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Sílvia M. C. Franco Andrade

1. Olho seco. 2. Fractal. 3. Ômega. 4. Tacrolimus. I.
Título.

LUÍS FELIPE DA COSTA ZULIM

**DIMENSÃO FRACTAL COMO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE DIFERENTES
PROTOCOLOS NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Presidente Prudente, 30 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sílvia M. C. Franco Andrade
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof Dr Leandro Teixeira
University of Wisconsin
Wisconsin – USA

Dr. Eduardo Perlmann
Petcare - São Paulo - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por sempre estar presente me amparando e cultivando em mim forças para ir além, minha família (mamãe Izaura e papai Zulim) que acreditam e confiam no meu potencial desde sempre, e ainda a distância nessa pandemia sempre estiveram “perto”, me dando forças, amor e carinho, a minha orientadora Dra Sílvia F. Andrade que também acredita e confia no meu potencial, e enxerga coisas que eu nem imagino, e sempre me ampara profissionalmente e pessoalmente, e a todos animais e seus tutores, que contribuíram para esta linha de pesquisa em ceratoconjuntivite seca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, sem ele nada disso seria possível, agradeço a minha família que é minha base e minha fortaleza, agradeço por todas as palavras de incentivo e orações em todos os momentos,

Agradeço aos meus pets (Mel, Argus, Gael, Louise, Noah, Maine, Leona e Leoncio) que sempre estão do meu lado me dando amor e carinho, principalmente Noah e Maine que tiveram muita paciência comigo !

Agradeço a meus pacientes e seus tutores, pela confiança em meu trabalho e parceria, e compreensão nos momentos que tive que me ausentar por conta dos estudos.

Agradeço a todos meus amigos, que sempre me apoiam e compreendem minha ausência e sumiço (rs!)

Agradeço minha orientadora Dra Sílvia, mais do que uma orientadora, uma mãe, amiga, um exemplo profissional e pessoal, que sempre me aconselha e me impulsiona a ir além!!!

Agradeço a Universidade por todo apoio e infraestrutura e por acreditar, confiar e nos preparar para irmos além,

Agradeço as profs que considero como mães: Sílvia, Rosa e Adriana, com as quais já aprendi em sala de aula e aprendo muito no dia a dia sobre a profissão e sobre a vida, somos uma equipe, uma família! Vocês fazem parte dessa história, vocês (cada uma do seu jeito) contribuíram muito e sempre por tudo isso! Amo vcs!

Agradeço a toda equipe do hospital veterinário (alunos, estagiários, funcionários, colegas professores), em especial as residentes Isabela, Tauane, Aline e Larissa.

Agradeço profa Gláucia por todo apoio e aprendizado e agradeço profa Renata, sempre me dando conselhos e dicas em relação ao meio científico.

Agradeço a toda equipe da pós graduação, em especial a equipe “orientado master”, e mais especial ainda a Danielle, que trabalhamos juntos no início deste trabalho e Marcos que também faz parte desse trabalho, gratidão!!!

Agradeço a profa Cristiane, que me aconselhou com muito carinho a fazer o doutorado agora e não “depois”.

Agradeço a professora Gisele e a professora Francis que me ensinaram bastante nesses estudos, com toda paciência e carinho.

Agradeço a professora Cecília que participou da minha banca de mestrado, foi minha professora e sempre me ensina e me ajuda muito no hospital e na pós.

Agradeço aos membros da banca externa por cederem seu tempo para ler, fazer considerações e participar de minha banca.

Agradeço a Avert® e Regenera® pelo apoio e incentivo a pesquisa.

Agradeço a todos professores e funcionários da pós graduação, em especial as funcionárias da secretaria que sempre nos ajudam tanto e sempre alegres e solícitas

E agradeço a toda equipe MEDICINA VETERINÁRIA UNOESTE, que durante essa fase difícil nos mantivemos mais unidos e aprendendo e compartilhando juntos.

*“Vou perseguir tudo aquilo que Deus já sonhou pra mim,
Realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou.
Vou persistir e mesmo nas marcas daquela dor, do que ficou vou me lembrar,
Realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou,
Em meu lugar está, na espera de um novo que vai chegar,
Vou persistir, continuar a esperar e crer,
Mesmo quando a visão se turva e o coração só chora,
Mas na alma a certeza da vitória,
Posso, tudo posso, naquele que me fortalece,
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.”*

(Padre Fábio de Melo)

RESUMO

Dimensão fractal como método de avaliação de diferentes protocolos no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma oftalmopatia crônica, maior parte de origem imunomediada, comumente diagnosticada em cães e seres humanos. O tratamento convencional consiste no uso de colírios imunossupressores e lubrificantes oculares, e como adjuvante a suplementação oral de ácidos graxos e antioxidantes. Pesquisas recentes apontam o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) em diversas doenças crônicas e degenerativas, sendo assim uma nova alternativa para o tratamento de CCS devido sua capacidade de regeneração tecidual e ações imunorreguladoras. O cálculo de dimensão fractal (DF) tem sido utilizado em diversas áreas da medicina como método adicional, matemático e quantitativo na avaliação de estruturas complexas e irregulares. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar, diferentes protocolos de tratamento na CCS, através do método de DF. No artigo 1 foram avaliadas 210 lâminas de biopsia de conjuntiva palpebral de cães, divididos em 7 grupos: grupo normalidade (olhos saudáveis), T0 (tacrolimus antes do tratamento), T6 (tacrolimus pós tratamento), TO0 (tacrolimus associado à ômega 3 oral antes do tratamento), TO6 (tacrolimus associado à ômega 3 oral pós tratamento), TOA0 (tacrolimus associado a ômega 3 + antioxidantes antes do tratamento) e TOA6 (tacrolimus associado a ômega 3 oral + antioxidantes pós tratamento). No artigo 2 foram avaliadas 84 lâminas histopatológicas divididas em 3 grupos: Grupo controle normal (n=28), grupo CTM0 no momento do diagnóstico CCS (n=28) e CTM6 após 6 meses do tratamento com CTM (n=28). No artigo 1 o grupo normalidade apresentou valor de dimensão fractal maior que os demais grupos ($1,84 \pm 0,04$) e o grupo T0 menor valor ($1,66 \pm 0,07$). Foi encontrada diferença estatística significativa entre todos os grupos ($p < 0,05$), menos no grupo TO6 ($1,81 \pm 0,06$) que apresentou valores mais próximos do grupo da normalidade. No artigo 2 houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado o grupo CTM0 ($1,71 \pm 0,15$) com os grupos normalidade ($1,78 \pm 0,03$). O grupo CTM6 (pós tratamento) apresentou valores de DF semelhantes ao grupo da normalidade e sem diferença estatística ($p = 0,2$). Concluímos que o cálculo DF avaliou matematicamente que tratamento com tacrolimus tópico associado a suplementação oral de ômega 3 apresentou valores mais próximos à normalidade, e o tratamento com CTM apresentou valores semelhantes ao grupo da normalidade, o que pode sugerir que estes protocolos de tratamento conseguiram restabelecer melhor o tecido conjuntival. Desta maneira, o método de dimensão fractal apresentou uma boa aplicabilidade e foi uma ferramenta importante para a análise das amostras de biopsias quantitativamente, podendo ser uma avaliação adicional de lâminas histopatológicas no estudo de patologias oculares.

Palavra-chave: Fractal. Olho seco. Ômega 3. Tacrolimus. Quantitativo. Biopsia.

ABSTRACT

Fractal dimension as a method of evaluating different protocols in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs

keratoconjunctivitis sicca (KCS) is a chronic ophthalmopathy, of immune-mediated origin, commonly diagnosed in dogs and humans. Conventional treatment consists of the use of immunosuppressive eye drops and lubricants, and as an adjunct to oral supplementation of omegas and antioxidants. Recent research points to the use of mesenchymal stem cells (MSC) in several chronic and degenerative diseases, thus being a new alternative for the treatment of KCS due to its capacity for tissue regeneration and immunoregulatory actions. The fractal dimension (FD) calculation has been used in several areas of medicine as an additional, mathematical and quantitative method in the evaluation of complex and irregular structures. The objective of the study was evaluate and to compare different treatment protocols in CCS, using the DF method. In article 1, 210 slides of dogs' palpebral conjunctiva biopsies were evaluated, divided into 7 groups: normal group (healthy eyes), T0 (tacrolimus before treatment), T6 (tacrolimus after treatment), TO0 (tacrolimus associated with oral omega 3 before treatment), TO6 (tacrolimus associated with oral omega 3 after treatment), TOA0 (tacrolimus associated with omega 3 + antioxidants before treatment) and TOA6 (tacrolimus associated with oral omega 3 + antioxidants after treatment). In article 2, 84 histopathological slides divided into 3 groups were evaluated: normal control group (n = 28), group CTM0 at the time of diagnosis CCS (n = 28) and CTM6 after 6 months of treatment with CTM (n = 28). In article 1, the normal group had a higher fractal dimension value than the other groups (1.84 ± 0.04) and the T0 group had a lower value (1.66 ± 0.07). A statistically significant difference was found between all groups ($p < 0.05$), except in the TO6 group (1.81 ± 0.06), which presented values closer to the normality group. In article 2, there was a statistical difference ($p < 0.05$) when the CTM0 group (1.71 ± 0.15) was compared with the normal groups (1.78 ± 0.03). The CTM6 group (post treatment) presented DF values like the normal group and without statistical difference ($p = 0.2$). We conclude that the DF calculation mathematically evaluated that treatment with topical tacrolimus associated with oral omega 3 supplementation showed values closer to normality, and treatment with MSC presented values similar to the normality group, which may suggest that these treatment protocols managed to restore better connective tissue. In this way, the fractal dimension method showed good applicability and was an important tool for the analysis of biopsy samples quantitatively and may be an additional evaluation of histopathological slides in the study of ocular pathologies.

Keyword: Fractal, Dry Eye, Omegas, Tacrolimus, Quantitative, Biopsy.

LISTA DE SIGLAS

CCS	– Ceratoconjuntivite seca
TLS	– Teste lacrimal de schirmer
TRFL	– Tempo de ruptura do filme lacrimal
TF	– Teste de fluoresceína
CTM	– Células-tronco mesenquimais
DF	– Dimensão fractal

SUMÁRIO

1 ARTIGO 1.....	12
2 ARTIGO 2.....	35
ANEXO A – NORMA DA REVISTA CURRENT EYE RESEARCH.....	57
ANEXO B – NORMA DA REVISTA STEAM CELL DEVELOPMENT..	61

ARTIGO 1

Dimensão fractal da conjuntiva palpebral de cães com ceratoconjuntivite seca tratados com tacrolimus 0,03% tópico associado ou não com suplementação oral de ômega 3 e antioxidantes

Luís Felipe da Costa Zulim^a, Danielle Alves Silva^a, Felipe Franco Nascimento^a, Francis Lopes Pacagnelli^b, Gisele Alborghetti Nai^b, Silvia Franco Andrade^b

^aDiscente do curso de pós graduação em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista

^bDocente do curso de pós graduação em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista

RESUMO

Propósito: A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma oftalmopatia crônica, de origem imunomediada. O tratamento consiste principalmente no uso de colírios imunossuppressores e lubrificantes oculares, e recentemente também recomendado como adjuvante suplementação oral de ômegas e antioxidantes. O cálculo de dimensão fractal vem sendo utilizado em muitos estudos na área da saúde, como forma quantitativa para mensurar alterações estruturais em diferentes tipos de imagem. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar pela análise de dimensão fractal das características estruturais do tecido da conjuntiva palpebral de cães saudáveis e com CCS tratados com tacrolimus tópico associado ou não com ômega 3 oral e antioxidantes.

Material e Métodos: Foram avaliadas pela dimensão fractal 210 lâminas de biópsia de conjuntiva palpebral de cães, divididos em 7 grupos: grupo normalidade (olhos saudáveis), T0 (tacrolimus antes do tratamento), T6 (tacrolimus pós tratamento), TO0 (tacrolimus associado à ômega 3 oral antes do tratamento), TO6 (tacrolimus associado à ômega 3 oral pós

tratamento), TOA0 (tacrolimus associado a ômega 3 + antioxidantes antes do tratamento) e TOA6 (tacrolimus associado a ômega 3 oral + antioxidantes pós tratamento).

Resultados: O grupo normalidade apresentou valor de dimensão fractal maior que os demais grupos ($1,84 \pm 0,04$), ou seja, uma organização estrutural do tecido da conjuntiva e o grupo T0 menor valor ($1,66 \pm 0,07$). Foi encontrado diferença estatística significativa entre todos os grupos ($p < 0,05$), menos no grupo TO6 ($1,81 \pm 0,06$) que apresentou valores mais próximos do grupo da normalidade.

Conclusão: O cálculo de dimensão fractal avaliou matematicamente que o tratamento com tacrolimus tópico associado a suplementação oral de ômega 3 apresentou valores mais próximos à normalidade, o que pode sugerir que esse tratamento foi o que conseguiu restabelecer melhor a conjuntiva palpebral. Desta maneira, o método de dimensão fractal apresentou uma boa aplicabilidade, podendo ser mais uma ferramenta, de maneira qualitativa, de análise de imagens de lâminas histopatologia.

Palavra-chave: Dimensão fractal, olho seco, tacrolimus, ômegas, antioxidantes

Introdução

A ceratoconjuntivite seca (CCS), conhecida como síndrome do olho seco, trata-se de uma oftalmopatia crônica, na maioria das vezes de origem imunomediada, comumente diagnosticada em cães e seres humanos.¹⁻² O infiltrado inflamatório resulta em alteração tecidual, glandular e conseqüentemente diminuição de células caliciformes.³ Essas alterações levam a uma instabilidade do filme lacrimal pré-corneano, que pode ser qualitativa (deficiência na camada aquosa) ou quantitativa (deficiência na camada lipídica ou de mucina levando a evaporação excessiva da lágrima).⁴ Os principais sinais clínicos observados são secreção ocular, blefaroespasma, hiperemia conjuntival, vascularização e opacidade corneal, e em casos avançados úlcera e pigmentação de córnea.³ O diagnóstico é baseado nos sinais

clínicos e confirmado principalmente pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) e Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL).⁵⁻⁶

A terapia convencional consiste no uso de colírios imunossupressores (tacrolimus e ciclosporina) e lubrificante oculares; e secundariamente antibióticos, anti-inflamatórios e mucolíticos.⁷⁻⁸⁻⁹ Como terapia adjuvante na CCS, estudos apontam a importância da suplementação de ácidos graxos essenciais e antioxidantes por via oral.^{5,10-11} O óleo de peixe, rico em ômega 3, possui o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) que possuem ação anti-inflamatória e imunomodulatória.¹² Os antioxidantes também auxiliam na redução inflamatória e principalmente na manutenção da estabilidade do filme pré-lacrimal. A vitamina E previne peroxidação lipídica preservando integridade estrutural celular e a vitamina C principalmente na formação do colágeno.¹³⁻¹⁴

O método de avaliação da dimensão fractal vem sendo utilizado em muitos estudos na área da saúde, como forma quantitativa para mensurar alterações em diferentes tipos de imagem, estas denominadas estruturas complexas ou irregulares, um dos métodos utilizados é o de “box-counting”, trata-se de uma fórmula geométrica baseada no termo “auto similaridade”, ou seja, a quebra da imagem analisada em quadrados menores (r) e quantos quadrados similares são necessários para cobrir a imagem (Nr). A avaliação fractal pode ser aplicada em diferentes tipos de imagens ou tecidos, dentre elas destaca-se alterações retinianas, pupilares, vasculares, imagens radiográficas, cortes histopatológicos de neoplasias e amostras teciduais de diferentes órgãos.¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷

O objetivo desse trabalho foi avaliar pelo método de dimensão fractal, lâminas histológicas de conjuntiva palpebral de cães submetidos ao tratamento convencional para olho seco com tacrolimus 0,03% tópico associado ou não com ômega 3 e antioxidantes oral.

Materiais e Métodos

Foram avaliadas 210 lâminas de biopsia da conjuntiva palpebral bilateral (olho direito e esquerdo) de cães com olhos saudáveis, e de cães portadores de CCS no momento do diagnóstico e após 6 meses de tratamento com tacrolimus 0,03% tópico associado ou não com suplementação de ômega 3 e antioxidantes. O estudo foi cadastrado no comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista sob protocolo nº 3900.

As lâminas analisadas foram divididas em 7 grupos:

- Grupo normalidade (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com olhos saudáveis.
- Grupo T0 (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com CCS antes do tratamento com tacrolimus 0,03% tópico
- Grupo T6 (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com CCS do grupo T0 após 6 meses de tratamento com uso tópico de colírio de tacrolimus 0,03% (Laboratório Ophthalmos, São Paulo, Brasil), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos.
- Grupo TO0 (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com CCS, antes do tratamento com uso tópico de colírio de tacrolimus 0,03% (Laboratório Ophthalmos, São Paulo, Brasil), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos e suplementação de ômega 3 por via oral.
- Grupo TO6 (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com CCS do grupo TO0, após 6 meses de tratamento com uso tópico de colírio de tacrolimus 0,03% (Laboratório Ophthalmos, São Paulo, Brasil), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos e suplementação de ômega 3 por via oral (1,5 EPA : 1 DHA) (Ograx[®]-3 500/Laboratório Avert,

1 cápsula de 500 mg/7kg/dia ou Ograx[®]-3 1000/Laboratório Avert, 1 cápsula de 1000 mg/14kg/dia).

- Grupo TOA0 (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com CCS, antes do tratamento com uso tópico de colírio de tacrolimus 0,03% (Laboratório Ophthalmos, São Paulo, Brasil), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos e suplementação de ômega 3 + antioxidantes por via oral.

. - Grupo TOA6 (n=30): 30 lâminas da conjuntiva palpebral bilateral de 15 cães com CCS do grupo TOA0, após 6 meses tratamento com uso tópico de colírio de tacrolimus 0,03% (Laboratório Ophthalmos, São Paulo, Brasil), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos e suplementação oral de ômega 3 + antioxidantes (1 EPA : 4,5 DHA + vitamina E + vitamina C + selênio) (Seniox[®] 500/Laboratório Avert, 1 cápsula de 500 mg/10kg/dia ou Seniox[®] 1000/Laboratório Avert, 1 cápsula de 1000 mg/20kg/dia).

Os exames oftálmicos realizados nos cães para o diagnóstico de CCS foram: Teste lacrimal de Schirmer sem colírio anestésico (TLS) (Teste de Schirmer[®] - Ophthalmos, São Paulo, Brasil) para avaliar a porção quantitativa da lágrima, valores < 10 mm/min foram considerados positivos para CCS e Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) para avaliar a porção qualitativa da lágrima, após instilar 1 gota do colírio fluoresceína (Fluoresceína[®], Allergan, São Paulo, Brasil), foi visualizado com o auxílio do biomicroscópio o tempo (segundos) da ruptura do filme lacrimal, valores < 20 segundos foram considerados positivos para CCS. ⁵⁻¹⁸⁻¹⁹

Exame Histopatológico

A biópsia conjuntival foi realizada após três instilações de colírio anestésico (0,5% proximetacaína, Allergan, São Paulo, Brasil) e foi retirado um fragmento, de tamanho 1-3

mm, do fornix inferior medial da conjuntiva. O fragmento foi colocado em um pedaço de papel de 1x1 cm e fixado em formol, e então processado e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).⁸⁻¹⁰

Dimensão fractal (DF)

As imagens das lâminas foram capturadas através do microscópio LEICA na objetiva de 100x, acoplado a uma câmera de vídeo, em seguida as imagens foram analisadas pelo software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos –NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) pelo método de Box-Counting, onde a técnica consiste na sobreposição de quadrados progressivamente menores, nas seguintes etapas: quando necessário receberam ajuste de cor para contraste entre células e tecido, posteriormente foram binarizadas e então submetidas ao cálculo da dimensão fractal (DF) em que o resultado expresso pela fórmula $DF = \frac{\log N_r}{\log r}$, N_r é a quantidade de quadrados de lado r para sobrepor a imagem. A DF então será a inclinação da linha de regressão daqueles dois logvalores, onde N_r é o número de fragmentos iguais para preencher o objeto, ou seja a dimensão fractal será obtida através da inclinação da regressão da linha dos valores de log, o tamanho do lado “ r ” é o número de quadrados “ N_r ”, e o programa considerou valores entre 0-2, sem distinção entre texturas.¹⁵⁻²⁰⁻²¹

Análise Estatística

GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, EUA) foi utilizado para a análise estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade. Devido à falta de distribuição normal nas amostras examinadas, foi utilizado um teste não

paramétrico. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar 2 valores de dimensão fractal (DF). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Os valores de DF do grupo de normalidade de biopsia conjuntival (Grupo controle) e os valores de DF dos diversos grupos antes e após os 6 meses de tratamento de CCS estão descritos na Tabela 1.

O grupo normalidade (Grupo controle) apresentou uma menor dispersão entre os valores de DF, ou seja, valores mais homogêneos, compatível com tecido conjuntivo sadio, isentos de inflamação, os valores deste grupo auxiliam como importante valor referencial, uma vez que até o momento não existe na literatura estudos sobre valores fractais de lâminas histopatológicas de conjuntiva de cães. O processo de análise fractal do grupo normalidade está representado na Figura 1.

Apesar de não apresentarem semelhança entre si, após os 6 meses de tratamento, os valores de DF da maioria dos grupos de tratamento aumentaram. Os grupos T0, TO0 e TOA0, no momento do diagnóstico de CCS apresentaram maior dispersão de valores, e esta variação é justificada pelo tempo de evolução individual e gravidade da oftalmopatia. O processo de contraste de imagem e binarização dos grupos está descrito na Figura 2.

Na comparação dos valores de DF entre o grupo da normalidade ($1,84 \pm 0,06$) e os demais grupos, foi encontrado diminuição estatística significativa ($p < 0,05$) entre quase todos, com exceção do grupo TO6 ($1,81 \pm 0,06$) que não foi estatisticamente significativo ($p = 0,248$) e foi o grupo que mais se aproximou dos valores de DF das biopsias de conjuntiva normal. O grupo de tratamento que apresentou o menor valor de DF foi T0 ($1,66 \pm 0,07$) (Fig3).

Discussão

Os valores de DF menores nos grupos no momento zero, ou seja no momento do diagnóstico de CCS (T0, TO0 e TOA0), quando comparados com o grupo controle, são justificados pelo edema e inflamação da conjuntiva causada pela ceratoconjuntivite seca, que culminam em frouxidão tecidual, enquanto os valores maiores nos grupos T6, TO6 e TOA6 mostra, de forma analítica, quantitativa e não subjetiva, um padrão que se assemelha à normalidade, pois se aproximaram do valor de DF do grupo da normalidade. Esse padrão de DF com valores próximos da normalidade após tratamento está de acordo com a melhora dos sinais clínicos observados em outros estudos com a suplementação por via oral de ômega 3 (EPA e DHA) em estudo laboratorial com coelhos experimentalmente induzidos a CCS e estudo clínico com cães com CCS, demonstrou um aumento de valores de TLS e TRFL.⁵⁻¹¹ Cães e seres humanos são as espécies mais acometidas pelo olho seco, estudo realizado com a suplementação de ômega 3 em seres humanos portadores de olho seco, observou aumento do TLS e melhora dos sinais clínicos, principalmente do desconforto causado pela síndrome.²²

O cálculo de DF neste estudo visou avaliar o processo inflamatório e o edema no tecido conjuntival provocado pela CCS e pós o tratamento, observou-se que após o processo de binarização das imagens histopatológicas o núcleo e fibras teciduais estavam descolados do restante das células, justificando a frouxidão tecidual ocasionada pelo infiltrado inflamatório do olho seco. As técnicas para avaliação histopatológica na maioria das vezes são realizadas por método qualitativo: classificação do tecido através da morfologia celular, tamanho, posição do núcleo e contagem de células inflamatórias.^{8 10} O cálculo fractal, apresenta como vantagem ser independente de um avaliador, trata-se de uma análise automática, sendo um parâmetro adicional para avaliações em pesquisa, como já utilizada em diversas áreas da medicina como neurologia, cardiologia, oncologia, ortopedia e avaliação de retina na oftalmologia.¹⁵⁻¹⁷⁻²³⁻²⁴⁻²⁵

Estudo realizado com pacientes que foram submetidos a transplante cardíaco, avaliou através de lâminas histopatológicas do músculo cardíaco, o grau de rejeição pós transplante, foi graduado a rejeição de acordo com a DF de 0 a 3, onde quanto maior o grau de rejeição, maior valor fractal ($1,17 \pm 0,15$; $1,31 \pm 0,14$; $1,53 \pm 0,11$ e $1,55 \pm 0,11$) respectivamente, valores que diferem do nosso estudo, onde encontramos maior DF no grupo normalidade e no nos grupos pós tratamento.²⁶

Na área de oftalmologia existem alguns estudos do cálculo de DF, e a maioria na avaliação da vascularização retiniana, um estudo avaliou imagens de retina de seres humanos normais, e comparou diferentes métodos do cálculo, evidenciando que a escolha do cálculo pode influenciar no resultado, uma vez que encontrou diferença estatística entre o cálculo contagem de caixas (box counting), segmentação e dimensão raio²⁷, e autores ressaltam a importância para a avaliação, uma padronização de grupo controle, ou seja, olhos sadios, como realizado em nosso trabalho.¹⁷

Ainda na área de oftalmologia e avaliação retiniana, dentre eles, destaca-se um estudo realizado através de imagens da vascularização da retina para mensuração da incidência do risco de acidente vascular cerebral, onde foi observado valores fractais maiores no grupo controle (1,987) comparado ao grupo com alteração em imagem retiniana (1,981), demonstrando que a diminuição da complexidade da vascularização retiniana é um indicador de doença; dados que corroboram com o nosso estudo, onde foi visualizado valores menores no momento de diagnóstico de CCS e valores maiores de DF no grupo de normalidade e no pós tratamento.²⁷ Teoria esta, que é explicada pela diminuição da complexidade de estruturas como parâmetro de alguma enfermidade.²⁸

A técnica de DF mostra uma interessante aplicabilidade em diversas áreas, estudo recente onde foi avaliado a DF, pelo método de box-counting, através de imagens da vascularização pulmonar por tomografia computadorizada, mostrou que cães saudáveis

apresentavam maior número de DF quando comparados com cães com doença pulmonar (com ou sem evidência de tromboembolismo), dados que se assemelham ao nosso estudo, onde cães saudáveis ou pós tratamento apresentaram maior valor fractal que cães no momento do diagnóstico.²⁹

Grande parte dos estudos na área da oftalmologia, na avaliação citopatológica e histopatológica utiliza-se termos como “leve”, “moderado” ou “severo” para infiltrado inflamatório ou a contagem de células, avaliação da morfologia e tamanho entre núcleo e citoplasma, todavia sabe-se que as amostras podem sofrer influência sob o avaliador e/ou a quantidade de material a ser avaliado, tornando então o método de análise fractal uma avaliação adjuvante em estudos.⁸⁻¹⁰⁻³⁰

A limitação do presente estudo é que para o cálculo da dimensão fractal de imagens microscópicas é preciso a captura de imagens seriadas de campo completo para que não ocorra interferência no cálculo. Para realização de biopsia conjuntival de cães, retira-se um fragmento pequeno (1-3 mm) variando de acordo com o grau de inflamação e principalmente o porte do paciente (que na medicina veterinária pode ocorrer grande variância), logo não é possível grande número de imagens por completo.

Conclusão

Concluimos que o cálculo de DF da conjuntiva palpebral de cães sadios e com CCS tratados com diferentes protocolos, avaliou matematicamente que o tratamento com tacrolimus tópico associado a suplementação oral de ômega 3 apresentou valores de DF mais próximos à normalidade, o que pode sugerir que esse tratamento foi o que conseguiu restabelecer melhor a conjuntiva palpebral. Desta maneira, o método de dimensão fractal apresentou uma boa aplicabilidade, podendo ser mais uma ferramenta, de maneira qualitativa, de análise de imagens de lâminas de histopatologia.

Agradecimentos

Ao laboratório Avert® Saúde Animal por gentilmente ter cedido os ômega 3 e antioxidantes para este estudo e agradecemos a Universidade do Oeste Paulista por todo apoio e incentivo a estudos.

Conflitos de interesse

Os autores do estudo não apresentam conflito de interesses.

Referências

1. Hessen M, Akpek EK. Dry eye. An inflammatory ocular disease. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*. 2014;9(2):240–50.
2. Linares-Alba MA, Gómez-Guajardo MB, Fonzar JF, Brooks DE, García-Sánchez GA, Bernad-Bernad MJ. Preformulation studies of a liposomal formulation containing sirolimus for the treatment of dry eye disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2016;32(1):11–22. doi: 10.1089/jop.2015.0032
3. de Oliveira JK, Williams DL, Bollmann C, de Seabra NM, Bortolini M, Montiani-Ferreira F. Comparative efficacy of topical oclacitinib 0.1% and tacrolimus 0.01% in canine keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology*. 2019;22(5):633–43. doi: 10.1111/vop.12634
4. Dodi P. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2015;341. doi: 10.2147/VMRR.S66705
5. Silva DA, Nai GA, Giuffrida R, Sgrignoli MR, Santos DR ds, Donadão IV, et al. Oral omega 3 in different proportions of EPA, DHA, and antioxidants as adjuvant in

- treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2018;81(5):421–8. doi: 10.5935/0004-2749.20180081
6. Izci C, Celik I, Alkan F, Erol M, Sur E. Clinical and light microscopic studies of the conjunctival tissues of dogs with bilateral keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. *Biotechnic and Histochemistry*. 2015;90(3):223–30. doi:10.3109/10520295.2014.930177
 7. Grahn BH, Storey ES. Lacrimostimulants and lacrimomimetics. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 2004;34(3):739–53. doi: 10.1016/j.cvsm.2003.12.009
 8. Zulim LF da C, Nai GA, Giuffrida R, Pereira CSG, Benguella H, Cruz AG, et al. Comparison of the efficacy of 0.03% tacrolimus eye drops diluted in olive oil and linseed oil for the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2018;81(4):293–301. doi: 10.5935/0004-2749.20180059
 9. Radziejewski K, Balicki I. Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2016;64(3):313–29. doi: 10.1556/004.2016.030
 10. Neves ML, Yamasaki L, Sanches ODC, do Amaral MSP, Stevanin H, Giuffrida R, et al. Use of linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Journal of ophthalmic inflammation and infection [Internet]*. 2013;3(1):4. doi:10.1186/1869-5760-3-4
 11. Silva DA, Nai GA, Giuffrida R, Barbero RC, Pereira Kuhn JM, Da Silva AC, et al. Comparison between fish and linseed oils administered orally for the treatment of experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Open Veterinary Journal*.

- 2017;7(3):277–85. doi: 10.4314/ovj.v7i3.13
12. Destefanis S, Giretto D, Muscolo MC, Di Cerbo A, Guidetti G, Canello S, et al. Clinical evaluation of a nutraceutical diet as an adjuvant to pharmacological treatment in dogs affected by Keratoconjunctivitis sicca. *BMC Veterinary Research*. 2016;12(1):1–12. doi:10.1186/s12917-016-0841-2
 13. Gus PI, Belló-Klein A, Llesuy S, Quinto GG, Matos GH, Bechara SJ. Potencial antioxidativo da lágrima de adultos jovens. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2006;69(4):565–70. doi: 10.1590/S0004-27492006000400020
 14. McCusker MM, Durrani K, Payette MJ, Suchecki J. An eye on nutrition. The role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clinics in Dermatology*. 2016;34(2):276–85. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.11.009
 15. Pacagnelli FL, Sabela AKD de A, Mariano TB, Ozaki GAT, Castoldi RC, do Carmo EM, et al. Fractal dimension in quantifying experimental-pulmonary-hypertension-induced cardiac dysfunction in rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2016;107(1):33–9. doi: 10.5935/abc.20160083
 16. Garcia TA, Tamura Ozaki GA, Castoldi RC, Koike TE, Trindade Camargo RC, Silva Camargo Filho JC. Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. *Tissue and Cell*. 2018;54:120–6. doi: 10.1016/j.tice.2018.08.014
 17. de Melo de Mendonça MB, de Amorim Garcia CA, de Albuquerque Nogueira R, Andreade Filgueira Gomes M, Morais Valença M, Oréfica F. Fractal analysis of retinal vascular tree: Segmentation and estimation methods. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2007;70(3):413–22. doi: 10.1590/S0004-27492007000300006.

18. Williams D, Hewitt H. Tear ferning in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Open Veterinary Journal*. 2017;7(3):268–72. doi: 10.4314/ovj.v7i3.11
19. Spatola R, Nadelstein B, Berdoulay A, English R V. The effects of topical aqueous sirolimus on tear production in normal dogs and dogs with refractory dry eye. *Veterinary Ophthalmology*. 2018;21(3):255–63. doi: 10.1111/vop.12503
20. Fávero PF, Vieira de Lima VA, Helena dos Santos P, Marques Andrade AP, Mendes LO, Pacagnelli FL, et al. Differential fractal dimension is associated with extracellular matrix remodeling in developing bovine corpus luteum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;516(3):888–93. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.002
21. Saneshigue Dos Santos IKN, Iziqoe Goiozo PF, De Brito AF, De Melo GH, De Pauli Pereira C, Barilli Nogueira RM. Fractal dimension in liver histological findings of wistar rats experimentally intoxicated with venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2019;47(1):1–7. doi: 10.22456/1679-9216.91990
22. Aga Lewelt. n–3 Fatty Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease. *Physiology & behavior*. 2015;176(3):139–48. doi: 10.1056/NEJMoa1709691.
23. Taylor AM, MacGillivray TJ, Henderson RD, Ilzina L, Dhillon B, Starr JM, et al. Retinal vascular fractal dimension, childhood IQ, and cognitive ability in old age: The lothian birth cohort study 1936. *PLoS ONE*. 2015;10(3):1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0121119
24. Breki CM, Dimitrakopoulou-Strauss A, Hassel J, Theoharis T, Sachpekidis C, Pan L, et al. Fractal and multifractal analysis of PET/CT images of metastatic melanoma before and after treatment with ipilimumab. *EJNMMI Research*. 2016;6(1). doi: 10.1186/s13550-016-0216-5
25. Zandieh S, Haller J, Bernt R, Hergan K, Rath E. Fractal analysis of subchondral bone

- changes of the hand in rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(11):1–5.
doi: 10.1097/MD.00000000000006344
26. Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, Neves LA, de Godoy MF. Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2011;26(2):155–63. doi: 10.1590/S0102-76382011000200004
27. Aliahmad B, Kumar DK, Hao H, Unnikrishnan P, Che Azemin MZ, Kawasaki R, et al. Zone specific fractal dimension of retinal images as predictor of stroke incidence. *Scientific World Journal*. 2014;2014. doi: 10.1155/2014/467462
28. Lipsitz LA, Goldberger AL. Loss of ‘Complexity’ and Aging: Potential Applications of Fractals and Chaos Theory to Senescence. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1992;267(13):1806–9. doi: 10.1001/jama.1992.03480130122036
29. Müller A V., Marschner CB, Kristensen AT, Wiinberg B, Sato AF, Rubio JMA, et al. Pulmonary vasculature in dogs assessed by three-dimensional fractal analysis and chemometrics. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2017;58(6):653–63. doi: 10.1111/vru.12536
30. Lejarza-Illaro M, Rodriguez-Alvaro A, Sanchez-Maldonado B, Gonzalez-Alonso-Alegre E. Characterisation of corneal impression cytology in dogs and its application in the diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Record*. 2019;184(22):678. doi: 10.1136/vr.105003

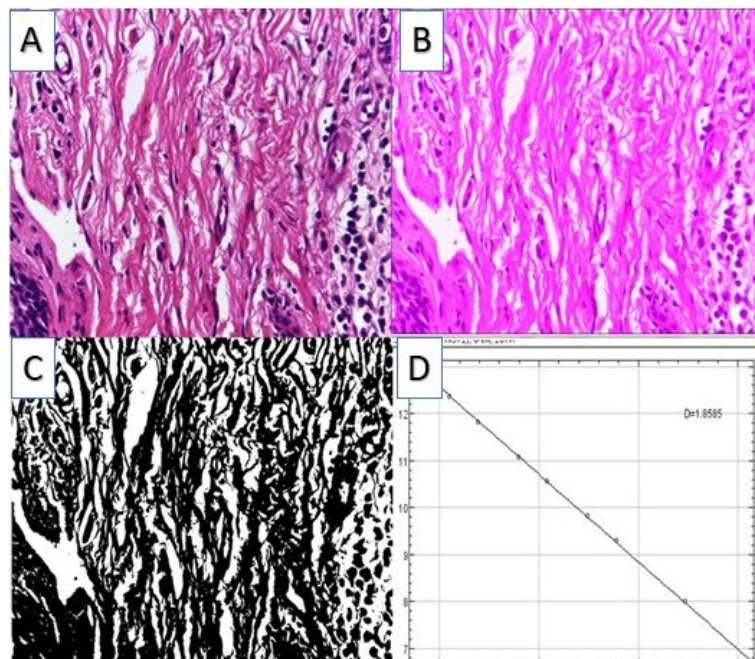


FIG.1. Cálculo da análise fractal do grupo controle – A - Corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo controle (olhos sadios) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x. B- Após o ajuste de cor, melhorando contraste da imagem. C – Após a binarização da imagem e D- gráfico de regressão Log, cálculo de dimensão fractal.

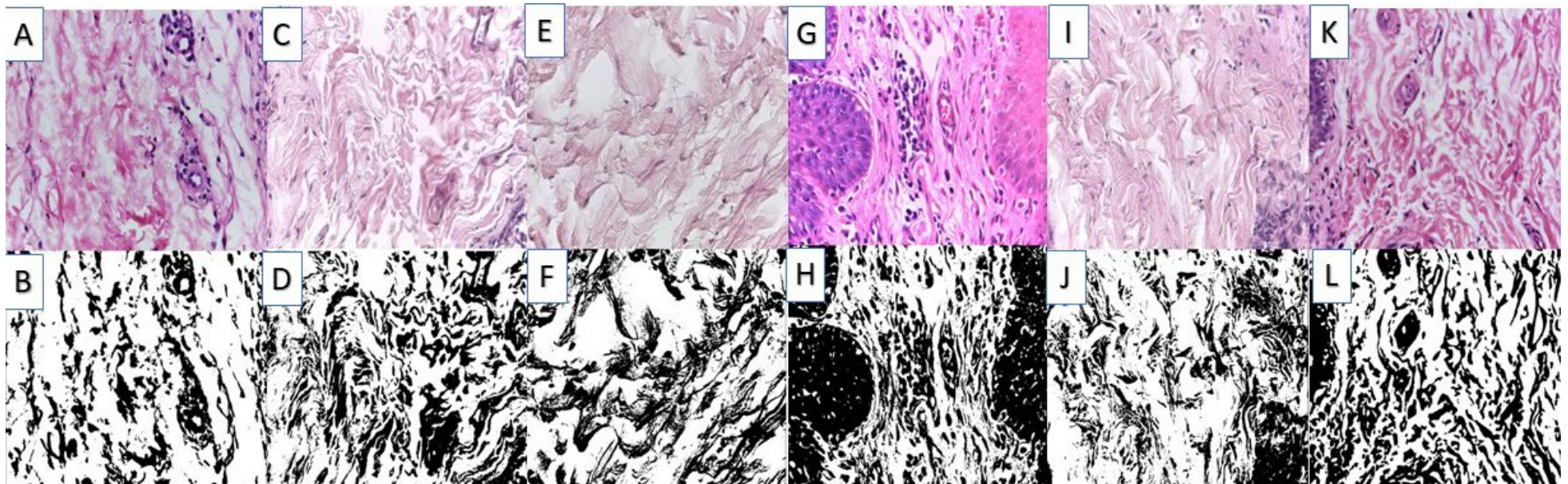


Fig 2. A- processo de contraste da imagem da lâmina corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo T0 (momento do diagnóstico) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x; B – processo de binarização T0; C - processo de contraste da imagem da lâmina corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo T6 (após 6 meses de tratamento com tacrolimus) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x; D – processo de binarização T6; E- processo de contraste da imagem da lâmina corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo TO0 (momento do diagnóstico) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x; F- processo de binarização TO0; G - processo de contraste da imagem da lâmina corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo TO6 (após 6 meses de tratamento com tacrolimus associado a suplementação de ômegas) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x; H- processo de binarização TO6; I- processo de contraste da imagem da lâmina corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo TOA0 (momento do diagnóstico) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x; J- processo de binarização TOA0; K- processo de contraste da imagem da lâmina corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo TOA6 (após 6 meses de tratamento com tacrolimus associado a suplementação de antioxidantes) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x; L- processo de binarização TOA6.

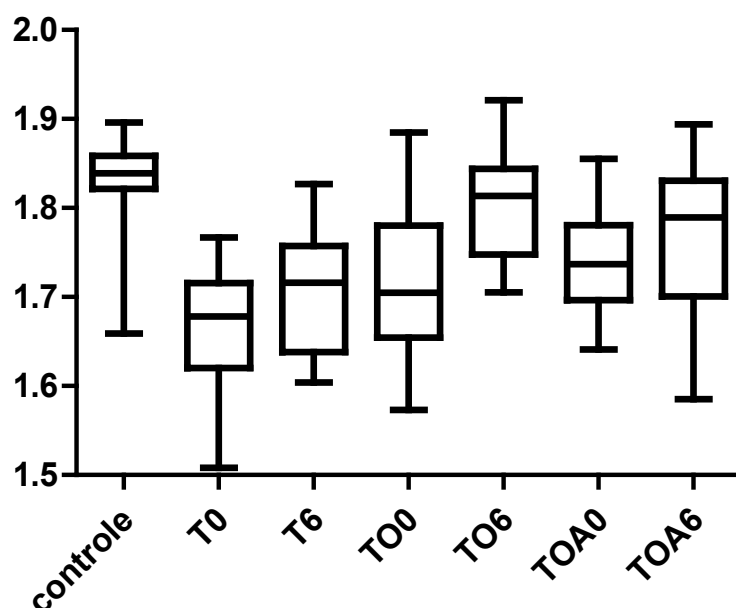


Fig3. Valor mínimo, valor máximo, média e desvio padrão dos valores fractais dos grupos: controle (normalidade), T0 (no momento do diagnóstico), T6 (após 6 meses de tratamento com tacrolimus 0,03% tópico), TO0 (no momento do diagnóstico), TO6 (após 6 meses de tratamento com tacrolimus + ômega-3), TOA0 (no momento do diagnóstico) e TOA6 (após 6 meses de tratamento com tacrolimus + antioxidantes).

Tabela 1. Média e desvio padrão dimensão fractal (DF) de todos os grupos

Grupo	Valores DF	<i>p</i> -valor ^a
Controle	1,84±0,04	-
T0	1,66±0,07*	<0,001
T6	1,70±0,07*	<0,001
TO0	1,71±0,08*	<0,001
TO6	1,81±0,06	0,248
TOA0	1,74±0,06*	<0,001
TOA6	1,77±0,08*	<0,001

^a*p*-valor para comparação entre o grupo de tratamento e grupo controle

*diferença estatística significativa (Teste de Mann-Whitney)

ARTIGO 2

Dimensão fractal da conjuntiva palpebral de cães com ceratoconjuntivite seca tratados topicamente com células tronco heterólogas mesenquimais.

Luís Felipe da Costa Zulim,¹ Marcos Rogerio Sgrignoli,¹ Danielle Alves Silva,¹ João Victor Goulart Consoni Passareli,¹ Gisele Alborghetti Nai,² Francis Lopes Pacagnelli,¹ Michele Andrade de Barros,³ Bruna Pereira de Moraes,³ Maura Krähembühl Wanderley Bittencourt,³ Sílvia Franco Andrade¹

¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

³Laboratório de Células Tronco Regenera, Campinas, SP,

RESUMO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou olho seco, é uma oftalmopatia crônica de origem imunomediada comum em cães e nos seres humanos. O tratamento convencional consiste no uso de imunossupressores tópicos e lubrificantes oculares. O uso de células tronco mesenquimais (CTM) é uma nova alternativa para o tratamento devido sua capacidade de regeneração e restauração tecidual, além de ações imunorreguladoras. A análise da dimensão fractal (DF) tem sido utilizada em diversas áreas da medicina como método adicional, matemático e quantitativo na avaliação de estruturas complexas e irregulares. O objetivo do estudo foi avaliar e comparar lâminas histopatológicas de biopsia conjuntival de cães com olhos saudáveis e cães com CCS antes e após o tratamento com CTM, de maneira adicional às avaliações convencionais, pelo método de DF. Foram avaliadas 84 lâminas histopatológicas divididas em 3 grupos: Grupo controle normal (n=28), grupo CTM0

no momento do diagnóstico CCS (n=28) e CTM6 após 6 meses do tratamento com CTM (n=28). Houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado o grupo CTM0 ($1,71 \pm 0,15$) com os grupos normalidade ($1,78 \pm 0,03$). O grupo CTM6 (pós tratamento) apresentou valores de DF semelhantes ao grupo da normalidade e sem diferença estatística ($p = 0,2$). O cálculo de DF avaliou quantitativamente que as biopsias conjuntivais palpebrais dos animais tratados com CTM tópica apresentaram valores próximos à normalidade, demonstrando eficácia no tratamento. Concluímos que o cálculo DF foi uma ferramenta importante para a análise das amostras de biopsias quantitativamente, podendo ser uma avaliação adicional de lâminas histopatológicas no estudo de patologias oculares.

Palavras-chave: olho seco, análise fractal, células tronco mesenquimal, quantitativo

Introdução

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou olho seco, é uma oftalmopatia crônica comumente diagnosticada em seres humanos e cães, com principal causa reações imunomediadas que levam a destruição tecidual e glandular e a uma instabilidade do filme lacrimal. O tratamento consiste principalmente no uso de imunossupressores tópicos, como ciclosporina e tacrolimus, e lubrificantes oculares, associado secundariamente ao uso de antibióticos e mucolíticos tópicos, além da suplementação oral de ômega [1-3]. Uma nova e promissora alternativa para o tratamento de doenças crônicas e degenerativas é o uso de células-tronco [4-5]. A importância do uso de células-tronco se dá pela capacidade de regeneração e restauração tecidual, e seu mecanismo de ação baseia-se na liberação de moléculas bioativas com capacidade imunomoduladora, principalmente para linfócitos T helper

CD4 e linfócitos B, inibição de interleucinas e apoptose, bem como estímulo de mitose celular, angiogênese e liberação de mediadores pró-inflamatórios [6 -7].

O uso de células-tronco tem se mostrado promissor em diversas áreas da saúde, estudos recentes com uso de CTM em cães portadores de CCS, foi observado aumento de TLS e TRFL, e melhora dos sinais clínicos como hiperemia de conjuntiva, opacidade de córnea e secreção mucóide [4,8], além de considerável redução de células inflamatórias, e redução dos níveis de expressão dos marcadores imunológicos CD4, IL-1, IL-6 e TNF α na conjuntiva palpebral e na terceira glândula palpebral; adicionalmente houve o aumento da densidade das células caliciformes [5,7-10,17].

As células-tronco são classificadas principalmente quanto a sua origem e capacidade de diferenciação. As células-tronco mesenquimais (CTM) também são classificadas de acordo a relação doador-receptor, sendo elas autólogas, alogênicas ou heterólogas ou xenogênicas; autólogas são células coletadas e administrada no mesmo paciente, heteróloga coletada e utilizada em outro paciente da mesma espécie e xenogênica coletada e administrada em outra espécie[11]. As CTM possuem baixa ação de imunogenicidade e alto potencial imunorregulatório, podem ser extraídas de diferentes tecidos como líquido amniótico, cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo e possuem capacidade de diferenciação em outros tipos de células como osteogênicas, adipogênicas, condrogênicas, miogênicas e outras [6].

Aliado ao contexto de pesquisas que visam novas alternativas terapêuticas, ressalta a importância de outras ferramentas, como método adicional na avaliação da eficácia destas intervenções. A análise fractal ou dimensão fractal (DF) é uma

técnica utilizada em diversas áreas da medicina (cardiologia, oncologia, ortopedia, oftalmologia), para avaliação de estruturas consideradas irregulares ou complexas, como imagens de tomografia, radiografias, lâminas histopatológicas entre outras [12-13]. Fractal quer dizer “quebrar”, ou seja, produzir pedaços menores; o cálculo é realizado através de um software (Image j®) e o método mais utilizado é o de box-counting, baseado na equação logarítmica: $DF = \frac{\log Nr}{\log r}$, onde a quebra da imagem analisada em quadrados menores (r) e quantos quadrados similares são necessários para cobrir a imagem (Nr), desta forma avaliando alterações de imagem de forma geométrica [14-15]. O presente estudo tem o objetivo de avaliar, de maneira clínica, citopatológica, histopatológica e fractal, a eficácia do uso de células-tronco mesenquimais na ceratoconjuntivite seca em cães.

A hipótese é que após o tratamento, a ação imunomoduladora das CTM reduza os sinais clínicos provocados pela CCS, bem como infiltrado inflamatório na citopatologia e histopatologia, e que a dimensão fractal (DF) possa quantificar essa alteração tecidual antes e pós tratamento. Desta maneira, o objetivo deste estudo é avaliar pelo método de DF as alterações estruturais da conjuntiva palpebral provocadas pela CCS em cães, antes e pós tratamento de CTM.

Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) sob protocolo nº2954 e nº 4621. O fator de inclusão para pesquisa foram cães que apresentaram Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) com valor entre 5 - 10 mm/min e/ou Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) \leq 15 segundos, e presença de sinais clínicos específicos de CCS como opacidade, secreção ocular, conjuntivite, pigmentação, neovascularização e presença ou não de úlcera de córnea. E o fator de exclusão

foram animais com TLS de 0-4 mm/min (devido à gravidade da CCS com a possibilidade de pouca presença de células viáveis, na conjuntiva, na glândula lacrimal e de terceira pálpebra, que respondam ao tratamento com CTM), portadores de neoplasias (devido ao risco de aumento de células neoplásicas) e com uso de corticoide e/ou imunossupressor há pelo menos 1 mês (devido à possível interferência com a viabilidade das CTM).

Animais

Foram avaliados 28 cães, divididos em: Grupo controle de normalidade (14 cães n=28 olhos, olhos saudáveis), Grupo CTM-0 (grupo de tratamento no momento do diagnóstico - 14 cães n=28 olhos com CCS) e Grupo CTM-6 (grupo de tratamento após 6 meses – 14 cães n=28 olhos).

Delineamento Experimental

Os animais foram acompanhados durante 10 momentos expressos nos dias (M0, M7, M14, M21, M30, M60, M90, M120, M150, M180). Em todos os momentos foram avaliados os sinais clínicos com lâmpada de fenda, Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF), Teste de Lissamina Verde (TLV), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), no M0, M90 e M180 foi realizado citologia esfoliativa conjuntival, e no M0 e m180 biopsia da conjuntiva.

Exames Oftálmicos

Os sinais clínicos foram avaliados com lâmpada de fenda portátil e preenchida ficha oftálmica individual: opacidade, pigmentação e neovascularização de córnea, secreção ocular e conjuntivite, sendo adotados os seguintes escores: (1) sem alteração; (2) leve; (3) moderado e (4) severo [16-18].

O Teste Lacrimal de Schirmer (Teste de Schirmer® - Ophthalmos, São Paulo, Brasil) para avaliar a porção quantitativa da lágrima, introduzindo 0,5 cm da tira no saco conjuntival durante um minuto e considerado positivo ≤ 10 mm/min. O Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), para avaliar a porção qualitativa da lágrima, sendo mensuradas duas vezes consecutivas e a média calculada. Após instilar uma gota de colírio de fluoresceína® 1 % (Allergan, São Paulo, Brasil), com uma lâmpada de fenda (Kowa, Japan), foi observado o tempo entre o último piscar e o aparecimento de manchas ou pontos escuros no filme lacrimal, sendo considerados positivos para TRFL valores ≤ 15 segundos. Em seguida os olhos eram lavados com solução fisiológica para realização do Teste de Fluoresceína (TF) e avaliação da presença ou não de úlceras na córnea e graduado em um escore de acordo com sua gravidade e extensão (1 – negativo, 2 – úlcera superficial pequena, 3 – úlcera superficial média, 4 – úlcera superficial extensa, 5 – úlcera estromal pequena, 6 – úlcera estromal média, 7 – úlcera estromal extensa, 8 – descemetocelose e 9 – ceratomalacia ou úlcera em “*melt*”). [3] [17] e O Teste de Lissamina Verde (TLV) para avaliar a presença de células desvitalizadas da córnea e conjuntiva, sendo utilizado a fita de lissamina verde (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), introduzindo a fita em contato com o menisco lacrimal do fundo do saco inferior, e após 2 minutos realizado a análise. Foi utilizado o seguinte escore: (1) sem corar; (2) somente a conjuntiva corada; (3) somente a córnea corada; (4) conjuntiva e córnea corada [3,19].

Citopatologia e Histopatologia

Após a limpeza ocular com solução fisiológica e instilação de colírio anestésico (Allergan®, São Paulo, Brasil). As amostras foram colhidas da conjuntiva inferior através de swab estéril umedecido com solução fisiológica, e confeccionada uma

lâmina de cada olho, que posteriormente foram fixadas em álcool 90% por cinco minutos, e posteriormente corada pela técnica de coloração do ácido periódico de Schiff (PAS) (Merck, EUA) e MGG (May-Grunwald-Giemsa). Foram avaliados os seguintes parâmetros: quantidade de polimorfonucleares, quantidade de mononucleares, quantidade de células caliciformes, quantidade de células metaplásicas, presença de mucina e relação núcleo-citoplasma (normal, aumentada ou diminuída). A contagem das células, foi feito em toda extensão da lâmina, utilizando-se microscópio óptico [20-21].

A biópsia da conjuntiva foi realizada após instilação de colírio Anestésico® (cloridrato de tetracaína a 1% + cloridrato de fenilefrina a 0,1%, Allergan, São Paulo, Brasil) com a retirada de fragmento com 1-3 mm no fórnix da conjuntiva inferior medial. O corte histológico foi alocado em um fragmento de papel em tamanho padronizado de 1x1 cm fixados em formol, e inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Posteriormente corado pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil), PAS (Merck, EUA) e avaliados os seguintes parâmetros, na coloração HE: a contagem de células polimorfonucleares e mononucleares, presença de metaplasia escamosa no epitélio e presença de edema; no PAS: a contagem da densidade de células caliciformes (em 10 campos), em objetiva de 40x, ao microscópio óptico [17,20].

Células Tronco Mesenquimais (CTM)

As CTM foram fornecidas pelo laboratório Regenera de Campinas, Brasil, inscrita no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo sob CRMV-SP 33715-PJ (nº depósito de patente: 860130011774). As CTM foram fornecidas em frascos criotubos com doses unitárias (1×10^6 C-TM) por animal,

juntamente com a solução de descongelamento, a solução de lavagem 1 e 2 e as 3 pipetas de Pasteur que foram necessárias no procedimento de preparo. Os animais foram tratados topicamente com células tronco mesenquimais (CTM), 50 μ L/administrado com pipeta milimétrica, em ambos os olhos, em 4 aplicações a cada 7 dias, e colírio lubrificante a base de propilenoglicol, 1 gota, 3 vezes ao dia, em ambos os olhos, por 30 dias. O colírio lubrificante foi utilizado somente para promover conforto ocular durante a terapia de CTM, uma vez que, o uso isolado de lubrificante no tratamento de CCS, não é considerado como tratamento específico e sim apenas como coadjuvante.

Análise Fractal

As imagens das lâminas foram capturadas através do microscópio LEICA na objetiva de 100x, acoplado a uma câmera de vídeo, em seguida as imagens foram analisadas pelo software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) pelo método de Box-Couting, onde a técnica consiste na sobreposição de quadrados progressivamente menores, nas seguintes etapas: quando necessário receberam ajuste de cor para contraste entre células e tecido, posteriormente foram binarizadas e então submetidas ao cálculo da dimensão fractal em que o resultado expresso pela fórmula $DF = \frac{\log N_r}{\log r}$, N_r é a quantidade de quadrados de lado r para sobrepor a imagem. A DF então será a inclinação da linha de regressão daqueles dois logvalores, onde N_r é o número de fragmentos iguais para preencher o objeto, ou seja a dimensão fractal será obtida através da inclinação da regressão da linha dos valores de log, o tamanho do lado “ r ” é o número de quadrados “ N_r ”, e o programa considerou valores entre 0-2, sem distinção entre texturas [22-23].

Análise Estatística

Para as variáveis DF, TLS, TRFL, densidade de células calciformes, número de células escamosas, células metaplásicas, neutrófilos e linfócitos, utilizamos duas análises de variância (ANOVA) para amostra pareada com contraste pelo método de Tukey. Para variáveis TF e TLV, utilizamos teste não paramétrico de Friedman com contrastes pelo método de Dunn e para variáveis binomiais (sinais clínicos) foi utilizado o teste de Qui-Quadrado de McNemar, para comparar momentos. Foi adotado nível de $p < 0.05$ de significância. O software utilizado para análise estatística foi o R, versão 3.2.2.

Resultados

Houve uma melhora significativa ($p < 0.05$) nos sinais clínicos avaliados (opacidade, pigmentação e neovascularização de córnea, secreção e conjuntivite), após 180 dias de tratamento com aplicação tópica de CTM (Tabela 1). Nos 30 primeiros dias de tratamento todos os animais tiveram melhora.

Houve um aumento significativo ($p < 0.05$) do M14 até M180 do TLS (Fig. 1A). No TRFL o aumento foi significativo ($p < 0.05$) do M60 até o final do estudo M180 (Fig. 1B).

Nos valores do TLV, no M0, dos 28 olhos analisados, 52,2% (15 olhos) sem corar, 6,8% (2 olhos) somente a conjuntiva corada, 13,7% (4 olhos) somente a córnea corada e 27,3% (7 olhos) conjuntiva e córnea corada. No M180, 100% dos olhos não coraram para o TLV.

Nos valores do TF no M0, 81,8% (23 olhos) foram negativos para úlceras e 18,2% (5 olhos) foram positivos sendo 3 olhos com úlcera superficial pequena, 2

olhos úlcera estromal pequena e 1 olho com descemetocèle. Após 30 dias, todos os olhos positivos para o TF apresentaram adequada cicatrização corneal.

Na avaliação citopatológica da conjuntiva (Fig. 2) houve uma diminuição significativa ($p < 0.05$) do M90 ao M180 da contagem (células/mm²) das células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares e das células escamosas e do M90 das células metaplásicas. Na avaliação da densidade das células calciformes na citologia conjuntiva os valores no M0 ($2,0 \pm 2,64$), havendo um aumento significativo ($p < 0.05$) do M90 ($134,0 \pm 49,0$) até o M180 ($138,0 \pm 41,9$).

Na avaliação histopatológica da conjuntiva (Fig 3) houve uma diminuição significativa ($p < 0.05$) no M180 da contagem (células/mm²) das células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares, e na avaliação da densidade das células calciformes (células/mm²), os valores no M0 foram ($6,0 \pm 2,71$), havendo um aumento significativo ($p < 0.05$) no M180 ($252,0 \pm 66,1$).

Os valores de DF do grupo normalidade de biópsia conjuntiva (grupo controle) e os valores de DF dos grupos antes e após o tratamento com CTM estão descritos na tabela 2. Os valores de DF do grupo normalidade apresentaram menor variância, valores mais homogêneos entre si, justificados pela isenção de inflamação ou patologia ocular pré existente (Fig 8). O processo de análise fractal do grupo normalidade e o processo de binarização do grupo CTM0 e CTM9 estão descritos respectivamente na Figura 4 e 5. Na comparação dos valores de DF do grupo normalidade ($1,78 \pm 0,03$) foi encontrada diferença estatística quando comparado com o grupo CTM0 ($p < 0,05$), enquanto o grupo CTM9 (pós 6 meses de tratamento) apresentou valores de DF semelhantes ao grupo normalidade ($p = 0,2$). No grupo CTM0 houve uma grande variação de valores de DF ($1,71 \pm 0,15$) que é justificada

pela fase da oftalmopatia e infiltrado inflamatório tecidual de cada paciente. Os valores mais baixos de DF no momento do diagnóstico, é justificado pelo infiltrado inflamatório, edema e frouxidão entre as fibras teciduais.

Discussão

Na avaliação dos sinais clínicos do olho seco, foi observado melhora significativa nos parâmetros entre o M0 e M180, resultados semelhantes a um estudo com células-tronco recente realizado com cães com CCS, entretanto diferindo a técnica utilizada, onde foi injetado célula-tronco e em nosso estudo utilizado por via tópica [8].

Na avaliação da porção aquosa da lágrima com TLS, podemos observar um aumento significativo até 90 dias, com diminuição dos valores em 120 dias, porém ainda acima dos observados inicialmente, e aumento novamente de 120 até 180 dias. Isso possivelmente, tem uma relação com a volta dos sintomas em alguns animais, e principalmente na volta da reação imunomediada às glândulas lacrimais, principais produtoras da porção aquosa do filme lacrimal pré-corneal. Outros estudos, também demonstraram aumento nos valores de TLS com uso tópico em ratos[5], e com o uso injetável na glândula lacrimal de CTM em camundongos [6] e em cães[8,10]. Nos valores do TRFL, qualidade do filme lacrimal pré-corneal há um aumento significativo a partir de 60 dias até o final do estudo (180 dias).

Houve melhora na cicatrização das úlceras de córnea com o TF em todos os animais positivos, inclusive em úlceras graves como descemetocelose, descrita também com o uso de CTM em outros estudos[8,10]. No TLV que serve para avaliar a presença de células desvitalizadas da córnea e conjuntiva no início do estudo 47,8% dos olhos tiveram alguma marcação na conjuntiva ou córnea, sendo que ao

final, nenhuma marcação foi observada, demonstrando melhora na superfície ocular após o tratamento tópico com CTM.

Tanto na análise citológica quanto histopatológica da conjuntiva foi observado diminuição significativa das células inflamatórias e aumento significativo das células calciformes até o final do estudo (180 dias). As células metaplásicas na análise citológica da conjuntiva a diminuição é significativa aos 90 dias. Esses resultados podem ser devido as CTM além de possuírem capacidade de restauração tecidual também possuem ação imunomoduladora causado pela liberação de moléculas bioativas que são imunossupressoras, especialmente para linfócitos T helper CD4, linfócitos B, inibindo assim a liberação de interleucina como a IL-6 presentes na ceratoconjuntivite seca (CCS) [4,9].

O aumento da densidade das células calciformes observado com o uso de CTM tópico foi extremamente relevante. O aumento observado na contagem histopatológica foi aproximadamente 3 vezes maior quando comparado ao início do estudo. As células calciformes são responsáveis pela produção de mucina no filme pré-lacrimal, o que ajuda na lubrificação e qualidade da superfície ocular [24]. Estudo experimental utilizando camundongos e outro com ratos também observaram um aumento significativo da densidade das células calciformes e melhora da qualidade da superfície ocular[5-6].

O cálculo da dimensão fractal tem sido utilizado em diversas áreas da medicina, na área de oftalmologia esse é o primeiro estudo que avalia imagens histopatológicas de conjuntiva de cães saudáveis, portadores de olho seco e pós intervenção terapêutica. Ainda na área da oftalmologia, existem estudos recentes avaliando através da DF, alterações dos vasos retinianos [25-26].

Os estudos na área da oftalmologia, na avaliação citopatológica e histopatológica utiliza-se termos como “leve”, “moderado” ou “severo” para infiltrado inflamatório, contagem de células, avaliação da morfologia e tamanho entre núcleo e citoplasma, e esta mensuração é dependente de um avaliador, o que a torna uma avaliação qualitativa, tornando então o método de análise fractal uma avaliação adjuvante em estudos [17,27-28].

A técnica de DF tem apresentado aplicabilidade em diversas áreas, avaliando pelo método de box-counting, lâminas histopatológicas, alterações teciduais provocadas por neoplasias, possível rejeição pós transplante cardíaco[13], sendo assim um método adicional em doenças de caráter imunomediado, como a ceratoconjuntivite seca que pela ação de auto anticorpos ocasiona alteração e destruição tecidual [29].

A limitação do presente estudo é que para o cálculo da dimensão fractal de imagens microscópicas é preciso a captura de imagens seriadas de campo completo para que não ocorra interferência no cálculo. Para realização de biopsia conjuntival de cães, retira-se um fragmento pequeno (1-3 mm) variando de acordo com o grau de inflamação e principalmente o porte do paciente (que na medicina veterinária pode ocorrer grande variância), logo não é possível grande número de imagens por completo.

Conclusão

Concluimos que a avaliação da DF de biopsia de conjuntiva palpebral de cães com CCS antes e pós tratamento, apresentou boa aplicabilidade na avaliação do tratamento tópico com células-tronco mesenquimais, uma vez que os valores de DF pós tratamento assemelharam-se ao grupo da normalidade, associando com as

avaliações clínicas, citopatológicas e histopatológicas, o cálculo de DF é uma ferramenta adicional na avaliação de lâminas histopatológicas.

Agradecimentos

Ao Laboratório Regenera de Campinas, São Paulo, Brasil por gentilmente ter cedido as células-tronco utilizadas neste estudo. À pós graduação da Universidade do Oeste Paulista por todo apoio para execução deste estudo.

Declaração de divulgação do autor

Nenhum interesse financeiro concorrente existe

Informação sobre Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [2016 / 07044-1].

Referências

1. Dodi P. (2015). Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*.341.
2. Stevenson W, S Chauhan and R Dana.(2012). Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Archives of Ophthalmology* 130: 90–100.
3. Silva DA, GA Nai, R Giuffrida, MR Sgrignoli, DR ds Santos, IV Donadão, FF Nascimento, HR Dinallo and SF Andrade.(2018). Oral omega 3 in different proportions of EPA, DHA, and antioxidants as adjuvant in treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 81: 421–428.

4. Hoffman AM and SW Dow.(2016). Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells* 34: 1709–1729.
5. Beyazyildiz E, FA Pinarli, Ö Beyazyildiz, ER Hekimoğlu, U Acar, MN Demir, A Albayrak, F Kaymaz, G Sobaci and T Delibaşı.(2014). Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells International* 2014:9
6. Lee MJ, AY Ko, JH Ko, HJ Lee, MK Kim, WR Wee, SI Khwarg and JY Oh.(2015). Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Molecular Therapy* 23: 139–146.
7. Sgrignoli MR, DA Silva, FF Nascimento, DAM Sgrignoli, GA Nai, MG da Silva, MA de Barros, MKW Bittencourt, BP de Moraes, HR Dinallo, BTD Foglia, WB Cabrera, EC Fares and SF Andrade.(2019). Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF α in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research* 39: 101525.
8. Bittencourt MKW, MA Barros, JFP Martins, JPC Vasconcellos, BP Moraes, C Pompeia, MD Bittencourt, KDS Evangelho, I Kerkis and C V. Wenceslau.(2016). Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Medicine* 8: 63–77.
9. Trohatou O and MG Roubelakis.(2017). Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Cellular Reprogramming* 19: 217–224.
10. Villatoro AJ, V Fernández, S Claros, GA Rico-Llanos, J Becerra and JA Andrades .(2015). Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *BioMed Research International* 2015:.
11. Voga M, N Adamic, M Vengust and G Majdic.(2020). *Stem Cells in Veterinary*

Medicine—Current State and Treatment Options. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1–20.

12. Jurczyszyn K, K Kazubowska, P Kubasiewicz-Ross, P Ziółkowski and M Dominiak.(2018). Application of fractal dimension analysis and photodynamic diagnosis in the case of differentiation between lichen planus and leukoplakia: A preliminary study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 27: 1729–1736.

13. Moreira RD, AR Moriel, LO Murta Junior, LA Neves and MF de Godoy.(2011). Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 26: 155–163.

14. Tălu S, C Vlăduiu and CA Lupaşcu.(2015). Characterization of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes using multifractal analysis. *International Journal of Ophthalmology* 8: 996–1002.

15. Garcia TA, GA Tamura Ozaki, RC Castoldi, TE Koike, RC Trindade Camargo and JC Silva Camargo Filho.(2018). Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. *Tissue and Cell* 54: 120–126.

16. Radziejewski K and I Balicki.(2016). Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Veterinaria Hungarica* 64: 313–329.

17. Zulim LF da C, GA Nai, R Giuffrida, CSG Pereira, H Benguella, AG Cruz, BTD Foglia, A da S Batista and SF Andrade.(2018). Comparison of the efficacy of 0.03% tacrolimus eye drops diluted in olive oil and linseed oil for the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 81: 293–301.

18. Silva DA, GA Nai, R Giuffrida, RC Barbero, JM Pereira Kuhn, AC Da Silva, RH Zakir Pereira, MF Abbade, LFDC Zulim, CSG Pereira and SF Andrade.(2017). Comparison between fish and linseed oils administered orally for the treatment of

experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Open Veterinary Journal* 7: 277–285.

19. Smith SM, E Holt and GD Aguirre.(2020). Conjunctival staining with lissamine green as a predictor of tear film deficiency in dogs. *Veterinary Ophthalmology* 23: 624–631.

20. Neves ML, L Yamasaki, ODC Sanches, MSP do Amaral, H Stevanin, R Giuffrida, ER Candido, JE Góes, LFDC Zulim, A Schweigert, RM Fukui, CC Meirelles, CA Sasaki and SF Andrade.(2013). Use of linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 3: 4.

21. Parrilha LR, GA Nai, R Giuffrida, RC Barbero, LDF Padovani, RHZ Pereira, DA Silva, MC Alves Silva, MS Diniz and SF Andrade.(2015). Comparison of 1% cyclosporine eye drops in olive oil and in linseed oil to treat experimentally-induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 78: 295–299.

22. Fávero PF, VA Vieira de Lima, P Helena dos Santos, AP Marques Andrade, LO Mendes, FL Pacagnelli and A César de Souza Castilho.(2019). Differential fractal dimension is associated with extracellular matrix remodeling in developing bovine corpus luteum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516: 888–893.

23. Pacagnelli FL, AKD de A Sabela, TB Mariano, GAT Ozaki, RC Castoldi, EM do Carmo, RF Carvalho, LC Tomasi, K Okoshi and LCM Vanderlei.(2016). Fractal dimension in quantifying experimental-pulmonary-hypertension-induced cardiac dysfunction in rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 107: 33–39.

24. Zhang X, M Vimalin Jeyalatha, Y Qu, X He, S Ou, J Bu, C Jia, J Wang, H Wu, Z

- Liu and W Li.(2017). Dry eye management: Targeting the ocular surface microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1–28.
25. Taylor AM, TJ MacGillivray, RD Henderson, L Ilzina, B Dhillon, JM Starr and IJ Deary.(2015). Retinal vascular fractal dimension, childhood IQ, and cognitive ability in old age: The lothian birth cohort study 1936. *PLoS ONE* 10: 1–16.
26. Kim AY, Z Chu, A Shahidzadeh, RK Wang, CA Puliafito and AH Kashani.(2016). Quantifying microvascular density and morphology in diabetic retinopathy using spectral-domain optical coherence tomography angiography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 57: OCT362–OCT370.
27. Lejarza-Illaro M, A Rodriguez-Alvaro, B Sanchez-Maldonado and E Gonzalez-Alonso-Alegre.(2019). Characterisation of corneal impression cytology in dogs and its application in the diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Record* 184: 678.
28. de Melo de Mendonça MB, CA de Amorim Garcia, R de Albuquerque Nogueira, M Andreade Filgueira Gomes, M Morais Valença and F Oréfice.(2007). Fractal analysis of retinal vascular tree: Segmentation and estimation methods. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 70: 413–422.
29. Hessen M and EK Akpek.(2014). Dry eye: An inflammatory ocular disease. *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 9: 240–250.

Tabela 1. Porcentagem dos sinais clínicos observados em 28 olhos de cães (n=28) com CCS, antes e após o tratamento tópico com CTM heterólogas de tecido adiposo canino (1×10^6 CTM/50 μ L).

Sinais Clínicos	Antes do Tratamento (M0)	Depois do Tratamento (M180)
Opacidade de córnea	45,5% (negativo)	84,0% (negativo)*
	36,4% (leve)	13,7% (leve)*
	11,3% (moderado)	2,1% (moderado)*
	6,8% (grave)	0% (grave)*
Pigmentação de córnea	47,7% (negativo)	63,7 (negativo)*
	38,6% (leve)	35,3% (leve)
	4,5% (moderado)	1,0% (moderado)
	9,0% (grave)	0% (grave)*
Neovascularização de córnea	61,4% (negativo)	79,6% (negativo)
	22,7% (leve)	11,4% (leve)*
	15,9% (moderado)	9,0% (moderado)*
	0% (grave)	0% (grave)
Secreção conjuntival	15,9% (negativo)	59,1% (negativo)*
	65,9% (leve)	36,4% (leve)*
	11,3% (moderado)	4,5% (moderado)*
	6,8% (grave)	0% (grave)*
Conjuntivite	29,5% (negativo)	63,6% (negativo)*
	43,3% (leve)	27,3% (leve)*
	22,7% (moderado)	9,0% (moderado)*
	4,5% (grave)	0% (grave)*

(1) negativo; (2) leve; (3) moderado e (4) grave. Momento zero sem tratamento (M0) e 180 dias após o tratamento (M180).

* $p < 0.05$ (Teste de Qui-Quadrado de McNemar comparado com momento zero)

Tabela 2. Média e desvio padrão dimensão fractal (DF) de todos os grupos

Grupo	Valores DF	<i>p</i>-valor^a
Controle	1,78±0,03	-
CTM0	1,71±0,15*	<0,002
CTM6	1,78±0,09	-

^a*p*-valor para comparação entre o grupo de tratamento e grupo controle

**p* < 0.05 (Teste de Tukey)

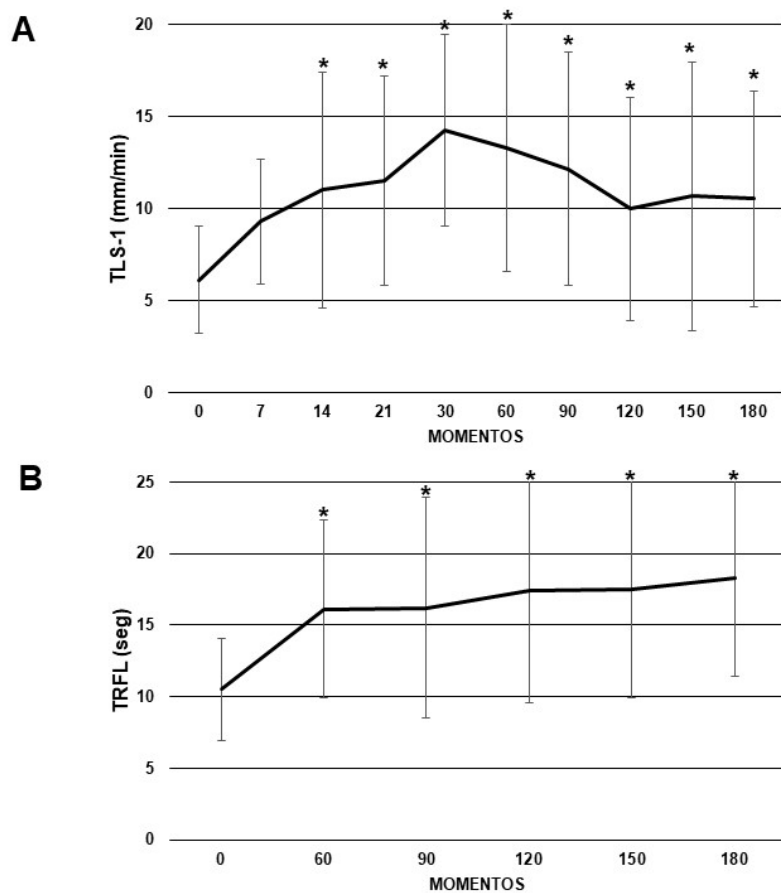


Fig. 1 (A) Médias e desvio padrão do TLS-1 (mm/min) e (B) Médias e desvio padrão do TRFL (segundos) de cães (n=14) com CCS, antes e após o tratamento tópico com CTM heterólogas de tecido adiposo canino (1×10^6 CTM/50 μ L).

* $p < 0.05$ (Teste de Tukey)

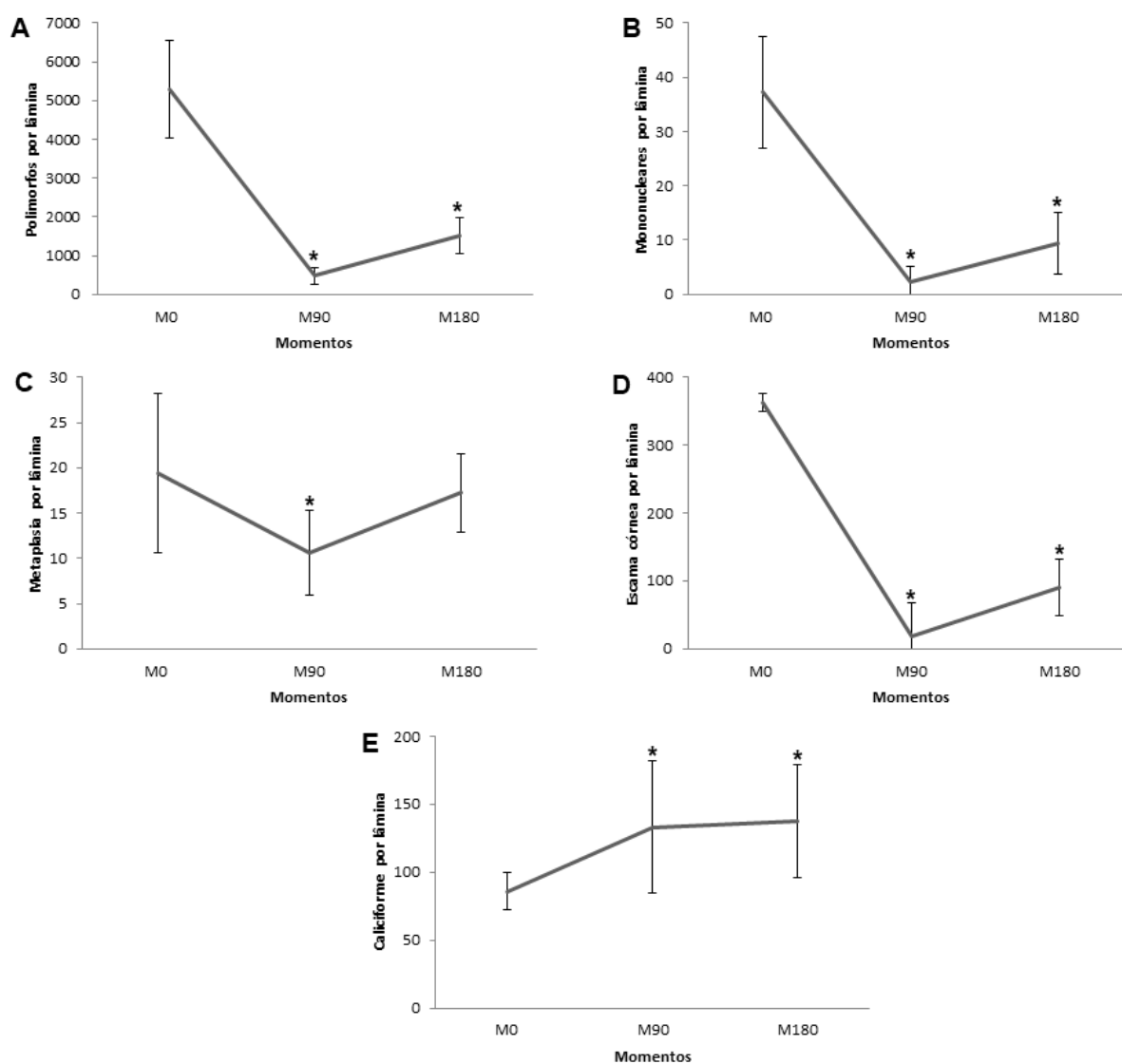


Fig. 2 Média e desvio padrão da contagem de polimorfonucleares (A), mononucleares (B), células metaplásicas (C), células escamosas (D) e células calciformes (E), da citologia esfoliativa conjuntival (CE), nos momentos 0 (M0), 90 (M90) e 180 (M180) dias após o tratamento tópico com CTM heterólogas de tecido adiposo canino (1×10^6 CTM/50 μ L).

* $p < 0.05$ (Teste de Tukey) em relação ao M0.

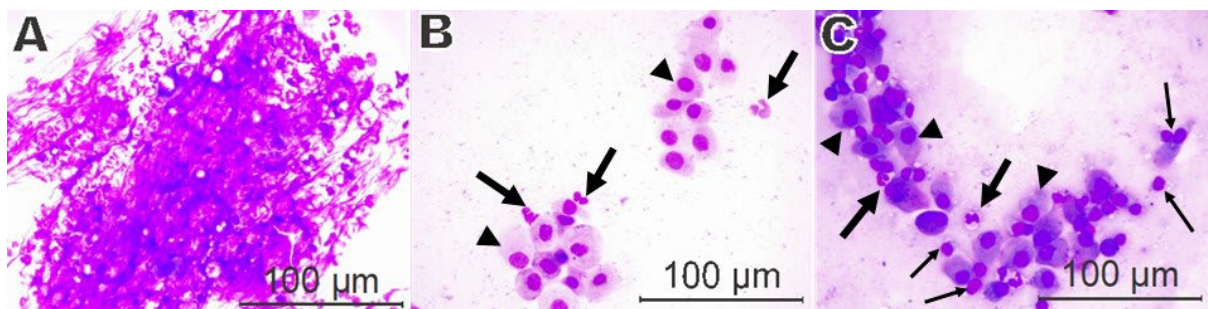


Fig. 3 Fotos das lâminas de citologia esfoliativa em aumento de 400x coloração MGG. Animais tratado com CTM. (A) grande número de polimorfonucleares em meio a muco denso (M0). (B) Grande número células caliciformes (seta) em meio a raros polimorfonucleares (cabeça de seta) (M90). Imagem C grande número de células caliciformes (cabeça de seta) em meio a raros no número de polimorfonucleares (seta) e mononucleares (seta fina) e muco fluído (M180).

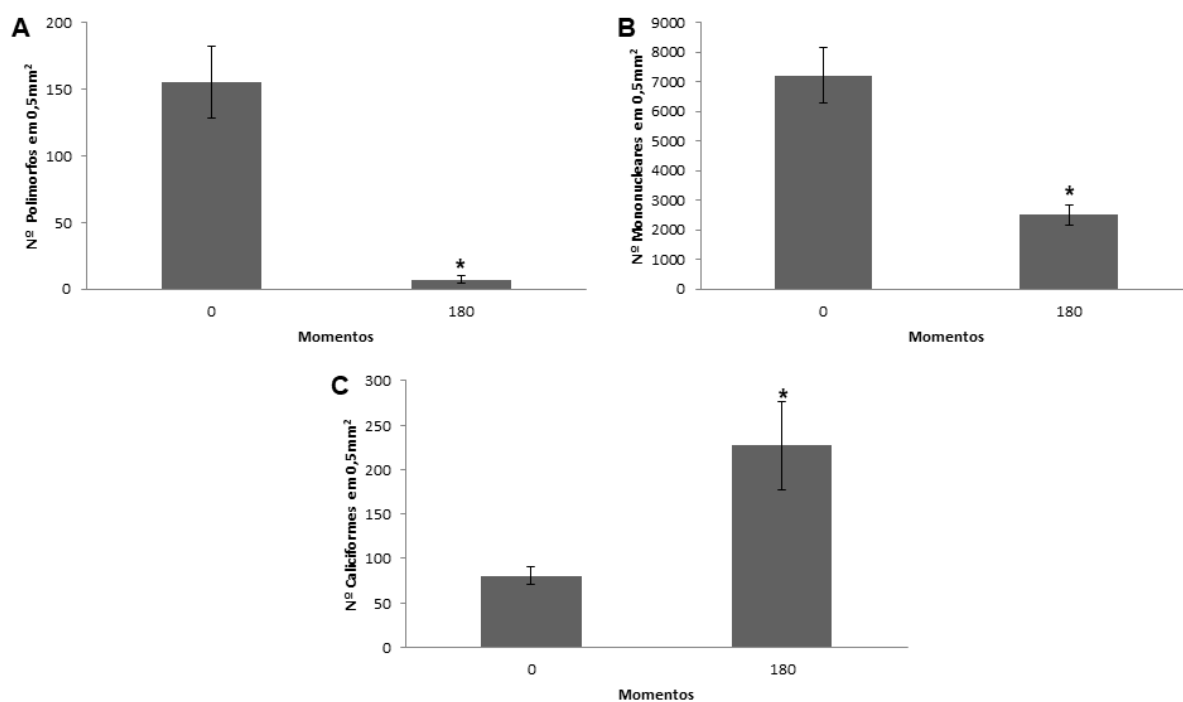


Fig. 4 Média e desvio padrão da contagem de polimorfonucleares (A), mononucleares (B), e células caliciformes (C), da histopatologia conjuntival, nos momentos 0 (M0) e 180 (M180) dias após o tratamento tópico com CTM heterólogas de tecido adiposo canino (1×10^6 CTM/50 μ L).

* $p < 0.05$ (Teste de Tukey) em relação ao M0.

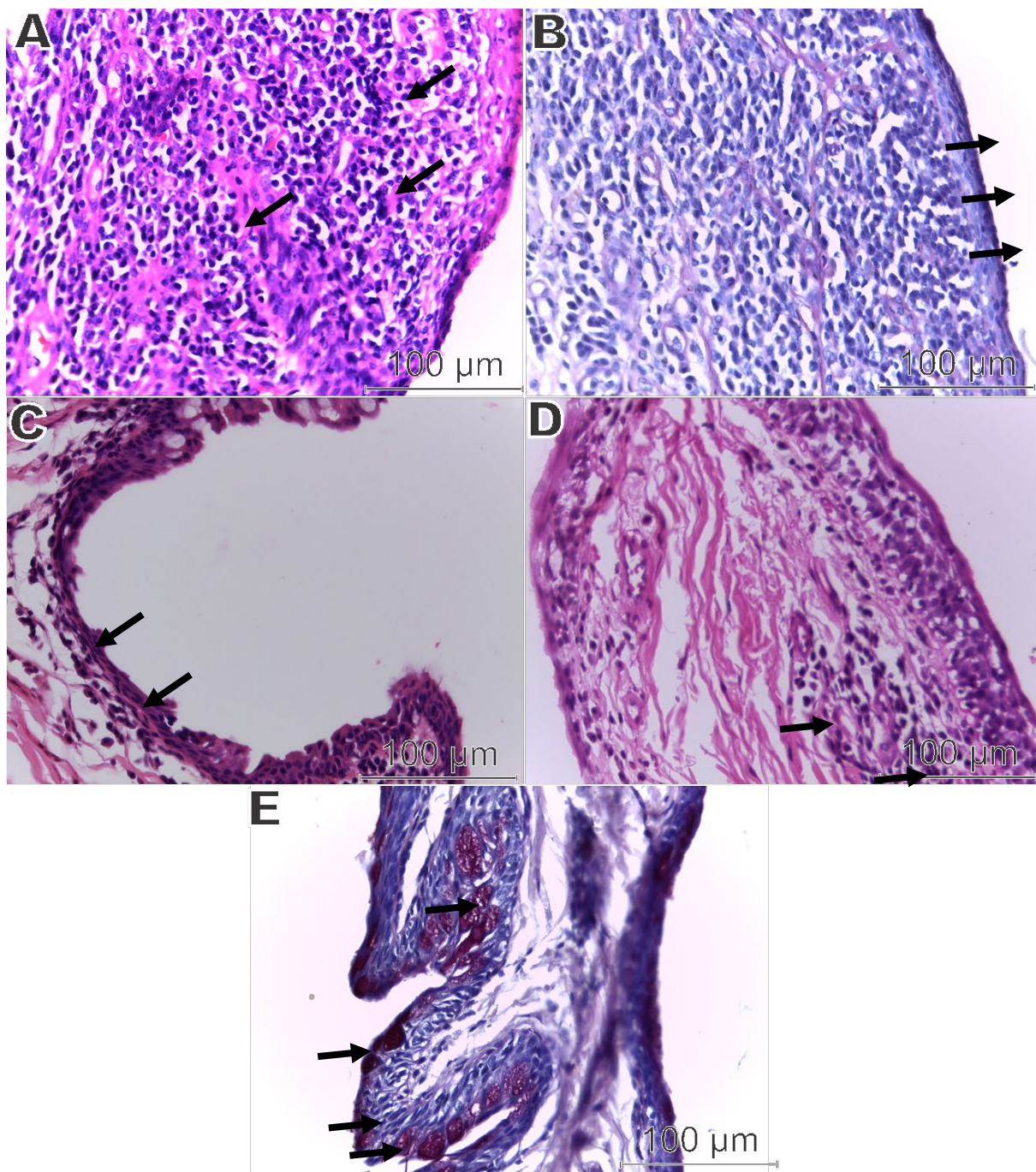


Fig. 5 Fotomicroscopia da conjuntiva em aumento de 400x. Em A, C, D corada com Hematoxilina-Eosina (HE) e B, E em PAS. Imagem A Intenso infiltrado de mononucleares no estroma (seta) no M0. Imagem B ausência de células caliciformes (seta) no M0. Imagem C área de metaplasia escamosa do epitélio (seta) no M0. Imagem D discreto infiltrado de mononucleares no estroma (seta) no M180. Imagem E grande número de células caliciformes (seta) no M180.

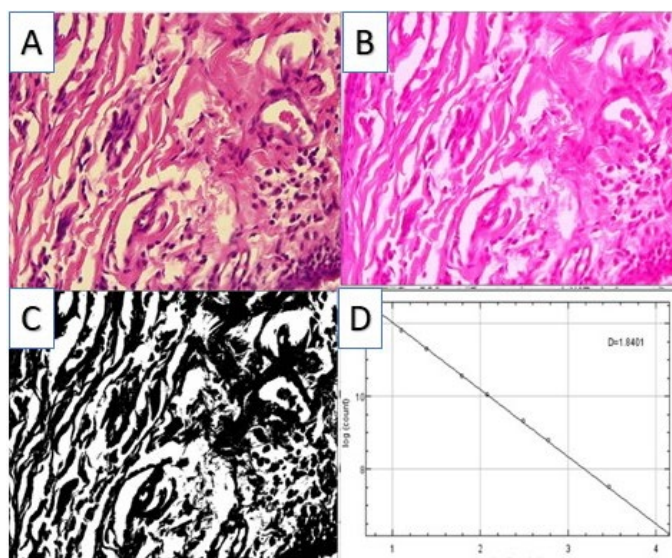


FIG.6. A- Corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo controle (olhos saudáveis) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x. B- Após o ajuste de cor, melhorando o contraste da imagem. C – após a binarização da imagem e D- gráfico de regressão Log, cálculo de dimensão fractal.

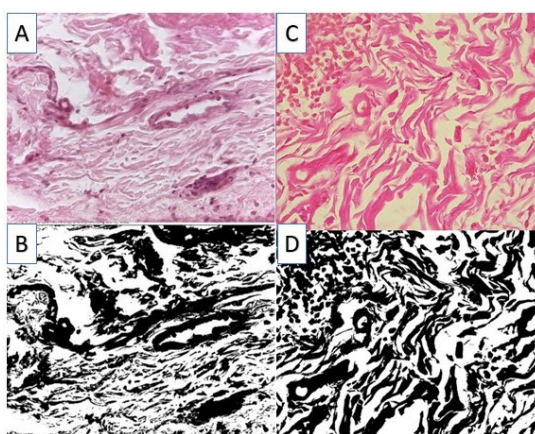


FIG.7. A – Processo de contraste corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo CTM0 (no momento do diagnóstico de CCS) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x. B- processo de binarização corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo CTM0. C – Processo de contraste corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo CTM6 (após 6 meses de tratamento com CTM) corado em HE, imagem capturada na objetiva de 100x e D - processo de binarização corte histológico de conjuntiva palpebral de cão do grupo CTM6.

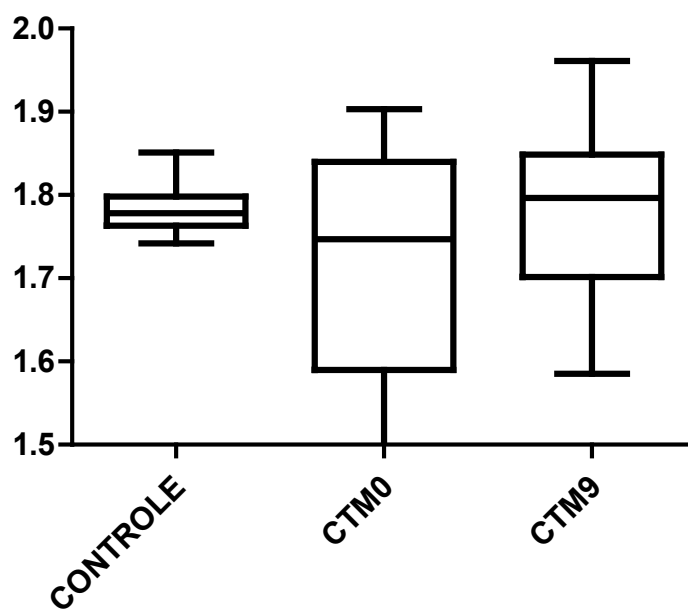


Fig.8. Valor mínimo, máximo, média e desvio padrão dos valores fractais do grupo controle (normalidade), grupo CTM0 (no momento do diagnóstico) e grupo CTM9 (após 6 meses do tratamento com CTM).

ANEXO A – NORMA DA REVISTA CURRENT EYE RESEARCH

Current Eye Research accepts the following types of article: Original Articles, Short Communications, Mini Reviews, Letters to the Editor, Reply to Letter to the Editor.

Open Access

You have the option to publish open access in this journal via our Open Select publishing program. Publishing open access means that your article will be free to access online immediately on publication, increasing the visibility, readership and impact of your research. Articles published Open Select with Taylor & Francis typically receive 32% more citations* and over 6 times as many downloads** compared to those that are not published Open Select.

Your research funder or your institution may require you to publish your article open access. Visit our [Author Services](#) website to find out more about open access policies and how you can comply with these.

You will be asked to pay an article publishing charge (APC) to make your article open access and this cost can often be covered by your institution or funder. Use our [APC finder](#) to view the APC for this journal.

Please visit our [Author Services website](#) or contact openaccess@tandf.co.uk if you would like more information about our Open Select Program.

*Citations received up to Jan 31st 2020 for articles published in 2015-2019 in journals listed in Web of Science®.

**Usage in 2017-2019 for articles published in 2015-2019.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper.

Length of Manuscripts: The maximum word count and illustrations including tables is:

- Original articles - 5000 words, 8 illustrations / tables
- Short communications - 1500 words, 4 illustrations / tables
- Mini reviews - 7000 words, 10 illustrations / tables

Authors who wish to contribute a mini review should first contact one of the editors-in-chief, Stefan Schrader (stefan.schrader@uni-oldenburg.de) for topics concerning the anterior eye, or Alan Stitt (a.stitt@qub.ac.uk) for topics concerning the posterior eye for permission and guidance.

The journal accepts letters (not to exceed 750 words) only if they are concerning articles already published in *Current Eye Research*.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where “a quotation is ‘within’ a quotation”. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word format. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCIDiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. A structured abstract of no more than 300 words is to be provided, divided into the following sections: Purpose/Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Avoid abbreviations, diagrams, and reference to the text in the abstract. Subheadings in italics, each begins on a new line
3. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).
4. Between 3 and 5 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
5. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
6. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
7. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
8. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).

10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
13. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

ANEXO B- NORMA DA REVISTA STEAM CELL DEVELOPMENT

Your submission to *Stem Cells and Development* provides you with robust tools and support to ensure maximum impact and readership for your work. By submitting your manuscript, you'll receive:

- **Rapid, rigorous peer-review** and editorial attention
- **Immediate deposit to PubMed** and other indexing services upon online publication
- **Exposure to thousands of thought-leaders** in your field, maximizing readers, citations, and downloads
- **Fast Track online-ahead-of-print publication**
- **Global availability in over 170 countries**
- **Open Access publication options**

SUBMITTING YOUR MANUSCRIPT

All submitting authors are required to complete their submissions using an ORCID identifier. Please visit the [ORCID website](#) for more information, or to register.

Submitting your manuscript to *Stem Cells and Development* delivers a comprehensive benefits program that ensures high-quality review of your research and maximum impact for your work. *Stem Cells and Development* carries a manuscript processing charge* of \$75 USD upon submission of each new manuscript.

Upon payment, you will be provided a Manuscript Submission Code, and will be prompted to enter this information when uploading your files to our peer-review system. ***Please note:*** Securing a token does not automatically create an account in our peer-review system. If you do not already have an account, you will be asked to create one before you can begin your submission.

Submissions do not need to be completed at once. Submitting authors/agents may begin the submission process, save their work, and return to the site to complete the upload(s) at a later time. There is no limit on the number of times one can save their work and subsequently resume the submission. Doing so will not incur additional charges.

[Click here](#) to submit your paper via our fast and user-friendly electronic submission system.

MANUSCRIPT REVISIONS

Processing charges and submission codes are NOT required for revisions to previously submitted papers. To upload a **revision** of a paper, the submitting author should log in to their **Author Center** at <http://mc.manuscriptcentral.com/scd> click on "***Revised Manuscripts in Draft.***" The paper will appear in this area, and the

submitting author will be able to upload revised files without paying any charges or entering a submission code.

Please be sure to follow the Instructions for Authors below on Manuscript Preparation. Authors whose submissions do not comply with the Instructions for Authors will have their papers un-submitted so that the file(s) may be adjusted accordingly. Directions regarding the necessary corrective actions will be provided in an email to the corresponding author at the time the paper is un-submitted. The submitting author/agent will then be provided the opportunity to re-upload the corrected file(s). If a paper is un-submitted, the paper will reside in the corresponding author's "Author Center" as a draft, and the submitting author/agent will be able to make the necessary adjustments and re-upload the paper without incurring another manuscript processing charge.

**The manuscript processing charge is independent of editorial decision and is non-refundable.*

Changes in authorship are not permitted after the acceptance of a paper.

INSTRUCTIONS FOR AUTHOR

STEM CELLS AND DEVELOPMENT is particularly committed to providing authors comprehensive yet rapid evaluation of original reports describing developments in stem and progenitor cell processing, purging, identification, expansion, biochemistry, molecular biology, and engraftment. Reports describing the results of basic research, technical advances, and clinical studies are within the scope of *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* will publish the following types of contributed papers:

Comprehensive Reviews are appraisals of research and clinical trials in fields of current interest. While these are subject to the same review process as other papers, authors are encouraged to speculate about future therapeutic promise of new procedures and techniques. Unsolicited reviews are welcome. Authors of review papers should consult with the Editor-in-Chief about the content and scope of an envisioned review prior to submission of their manuscript.

Cutting Edge Communications are brief, original reports of significant advances that merit accelerated processing and publication. Authors should submit their papers to the Editor-in-Chief, along with a letter outlining the reasons that the work is thought to fall within this category. If the editor agrees that the manuscript potentially provides valuable new information that clearly merits rapid dissemination, processing will be expedited. Otherwise, the manuscript will be processed as a regular submission.

Original Research Reports are full-length descriptions of original research in all fields of stem cell therapy and progenitor cell biology. The investigation may focus on basic science, clinical outcomes, or applications of cell therapy, processing, and transplantation. Processing of these papers will be expedited, and every effort will be made to provide fast turnaround times and to avoid undue delays in the reviewing process.

Technology Reports briefly and succinctly describe improvements or helpful modifications in procedures used for processing, purging, characterizing, and culturing stem cells and progenitors, and other tissues of interest.

Letters to the Editor: Letters to the Editor(s) are welcomed, but with a 500 word limit and no more than one (1) table OR figure, and with a maximum of four (4) references.

Liebert Instant Online (LION)

To enable the release of new scientific findings as quickly as possible, the Journal has adopted a policy of pre-publishing all manuscripts in unedited format upon acceptance. The papers will have undergone full peer review but will not have been copyedited, typeset, or proofread by the authors. All accepted papers will appear online as a part of Liebert Instant Online (LION).

On acceptance for publication, the system will generate automatically the author list using the information as submitted to Manuscript Central under 'Authors and Institutions,' not as listed in the manuscript file. It is therefore important to submit correctly the names and email addresses of all authors under 'my authors.' This author list is what will be used for Stem Cells and Development Instant Online and its initial listing on PubMed. Errors at this stage will not be altered, but authors will be able to make corrections at the page proofs stage.

Following its appearance on LION, the paper will progress through the normal publishing process, including author correction of galley proofs.

PRESENTATION

Manuscripts submitted to *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* will not be rejected solely on the basis of errors in sentence construction, syntax, and grammar. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* strives to communicate meritorious research from all countries, and reviews will not be compromised due to deficiencies in presentations. However, manuscripts which require substantial editing may, at the authors' discretion, be referred to an editorial service for a nominal fee. Please contact the Editor-in-Chief for details.

Authors are encouraged to supply the names, addresses, and fax numbers of 3–4 individuals who are considered qualified to review the submitted material, as well as the names of individuals whom the authors would prefer not be included in the review process along with the reason for this request. Authors may also request that their manuscripts be directed to specific members of the Editorial Board.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

WORD LIMITS: Papers should be written succinctly, containing sufficient detail to properly communicate the work and its significance.

NOTE:

All manuscripts will be processed through plagiarism detection software. Plagiarized manuscripts will be rejected.

Manuscripts must be double-spaced in an 8 1/2 x 11 format with margins of 2.5 cm on each side, and ample space on top and bottom and prepared in Microsoft Word, PC or Macintosh formats. Please identify the title and authors of the manuscript, its major contribution, suggested reviewers, and other factors as discussed previously.

Please follow these guidelines for submitting figures:

- Do **NOT** embed art files into a Word or PDF document
- Line illustrations should be submitted at 900 dpi
- Halftones and color should be submitted at a minimum of 300 dpi
- Save as either TIFF or EPS files
- Color art must be saved as CYMK - **not RGB**
- Black and White art must be submitted as grayscale – **not RGB**
- PowerPoint or Excel files cannot be uploaded

Please name your artwork files with the submitting authors name e.g. SmithFig1.tif, SmithTable2.tif etc.

You will be given directions on how to correct any files which do not pass.

For submissions containing Western blot images, the original uncropped gels from which the blots were derived must be uploaded as supplemental material under the manuscript category “Original Whole Gel(s) for Western Blots.” These files will be used for peer review purposes only.

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT ART FILES

Converting Word or Excel files: Perhaps the best and easiest way to **convert Word or Excel files** into a format which is suitable for print is to scan them using the below guidelines:

- All files should be scanned at 100% size
- 300 dpi
- Final color mode: cmyk
- Save file as: .tif or .eps

If you need directions on how to **convert a Power Point** slide to acceptable format go to <https://home.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf>

Color Reproduction: The Journal encourages the submission of color figures, but the cost for color printing must be subsidized by the author(s). These charges, which apply to both unsolicited and invited manuscripts, are necessary to keep the subscription price of *Stem Cells and Development*

at its current, reasonable rate, and can only be modified by prior consent of the publisher. Please contact the publisher for current rates.

SEQUENCE OF SECTIONS

Please supply the following: a) the complete title of the paper; b) the full name, full mailing address, full contact information (telephone, fax, and e-mail address), and affiliations of each author. Please include the address(es) either on the title page of your paper or on a separate sheet; c) a brief running title; d) the corresponding author's complete contact information including address and working fax number and/or e-mail address.

Footnotes and abbreviations: List information such as prior conference presentation of the submitted material and a list of non-standard abbreviations (approved abbreviations need not be listed).

Abstract: 300 words or less, without the use of subheadings.

Introduction: Describe the background leading to the study and clearly state the purpose of the study or its major contribution.

Materials and Methods: Provide sufficient information to permit both reproduction of the results by other investigators and appropriate critical evaluation of the procedures used. **For human research**, authors must ensure that studies are performed according to the amended Declaration of Helsinki. Authors should indicate institutional review board approval of the protocol used. Include a statement confirming that all patients gave written informed consent. Where applicable, statement must also be made of approval for human pluripotent stem cell use. Similarly, **all animal research** must conform to the respective national guidelines and authors should indicate institutional review board approval of the protocol used.

Results.

Discussion: The results and discussion sections of short papers may be combined for more effective presentation.

Acknowledgments: State funding sources and other assistance that were necessary for the conduct of the study.

References: Should be cited in the text and listed numerically at the end of the paper in the order of citation, as detailed in instructions below.

Figure legends: These must be double-spaced in a separate word file uploaded after the main document.

Tables: Number these consecutively throughout the text.

Disclosure Statement

Immediately following the Acknowledgments section, include a section entitled "Author Disclosure Statement." In this portion of the paper, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at <http://www.icmje.org/index.html#conflicts> for further guidance.

—

IMPORTANT:

Please upload individual files of all manuscript material — do NOT upload a single PDF file containing all text, figure, and table files of your paper. Once all individual files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and the peer-review process.

—

If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

REFERENCES (PLEASE FOLLOW CAREFULLY)

References may be made to published work and papers in press. Reference citations are not permitted in the abstract of a paper. Authors are responsible for the accuracy of all literature citations. *Work in progress, in preparation, unpublished work, and personal communications should be cited as footnotes to the text.* References

should be listed numerically in the text in the order of appearance as parenthesized consecutive numbers, e.g., [1,2]. Where there are more than two references, the citation should appear as hyphenated numbers, e.g., [1–3]. References should be typed double-spaced in numerical order of citation, **with all authors listed**. Abbreviations of journals should conform to those used in Medline. The following formats must be used:

Journal papers

1. Buckner CD, RB Epstein, RH Rudolph, RA Clift, R Storb and ED Thomas. (1970). Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood* 35:741–750.
2. Shadduck RK, A Warheed, F Boegel, G Pigoli, A Porcellini and V Rizzoli. (1987). The effect of colony stimulating factor-1 in vivo. *Blood Cells* 13:49–63.
3. Wang XS, MC Yoder, SZ Zhou and A Srivastava. (1995). Parvovirus B19 promoter at map unit 6 confers autonomous replication competence and erythroid specificity to adeno-associated virus 2 in primary human hematopoietic pro-genitor cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 92:12416–12420.

Book

1. Gee AP, ed. *Bone Marrow Purging and Processing: A Practical Guide*. (1991). CRC Press, Boca Raton, FL.

Book chapter

1. Hénon P. (1993). Clinical aspects of autologous blood stem cell transplantation. Review of indications. In: *Peripheral Blood Stem Cell Autografts*. E Wunder and P Henon, eds. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 209–240.

PERMISSIONS

Written permission must be obtained from the publisher of the journal or book concerned for the reproduction of figures, tables, etc. from copyrighted materials.

The publication from which the figure or table is taken must be listed in the reference list.

A footnote of a reprinted table, or of the legend of a reprinted figure, should read, “Reprinted with permission from Jones et al.” and list the appropriate reference.

COPYRIGHT

Unless rejected for publication, all submissions become the property of Mary Ann Liebert, Inc., Publishers. By submitting their work for review by *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, all authors and co-authors acknowledge transfer of the copyright

of their submission to Mary Ann Liebert, Inc. Such copyright shall automatically revert to the author(s) if the paper is withdrawn prior to the time when the paper is typeset for publication or if the paper is not accepted for publication. While no part of any publication may be reproduced in any form without written consent of the publisher and credit to the original material, such consent shall not unreasonably be denied. Consent can be obtained by contacting the editor-in-chief.

REPRINTS

Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany page proofs, and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after an issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

PUBLISHER

STEM CELLS AND DEVELOPMENT is published by Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801-5215. Telephone: (914) 740-2100; fax: (914) 740-2101.

The views, opinions, findings, conclusions and recommendations set forth in any Journal article are solely those of the authors of those articles and do not necessarily reflect the views, policy or position of the Journal, its Publisher, its editorial staff or any affiliated Societies and should not be attributed to any of them.