

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**USO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
NA REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAROLINE MEDEIROS GERALDINI

BOTUCATU – SP

JANEIRO/2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
NA REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAROLINE MEDEIROS GERALDINI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Douto.

Orientadora: Cláudia Valéria Seullner
Brandão

BOTUCATU – SP
JANEIRO/2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Geraldini, Caroline Medeiros.

Uso de meio condicionado de células-tronco mesenquimais na reparação tecidual / Caroline Medeiros Geraldini. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão
Capes: 50501003

1. Cão. 2. Ceratoconjuntivite seca. 3. Cicatrização. 4. Rato. 5. Secretoma.

Palavras-chave: Cicatrização; Cão; Rato; Ceratoconjuntivite seca; Secretoma; Fator de crescimento;

Nome do autor: CAROLINE MEDEIROS GERALDINI

TÍTULO: USO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA REPARAÇÃO TECIDUAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Titular Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal. FMVZ – UNESP
Botucatu – SP.

Prof.^a Luciane dos Reis Mesquita

Membro interno

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal. FMVZ - UNESP
Botucatu - SP.

M.V. Daniela Nogueira Cremonini

Membro externo

Pet Vision Clinica Veterinaria. São Paulo – SP.

Prof.^a Natalie Bertelis Merlini

Membro externo

Departamento de Veterinaria e Produção Animal. Universidade Estadual do Norte do
Parana – UENP. Bandeirantes – PR.

Prof. Victor José Vieira Rossetto.

Membro externo

Departamento de Medicina Veterinaria – PUC. Poços de Caldas – MG.

Data da defesa: 23 de janeiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, Fabiana Medeiros e Junior César Geraldini que me incentivaram e permitiram correr atrás do meu sonho de ser veterinária desde o início, e proporcionaram tudo o que eu precisei para estar aqui hoje. À minha irmã Amanda Medeiros Geraldini pelo suporte em todas as decisões da minha vida.

A todos os amigos que fiz no caminho, que iniciaram como colegas de graduação ou residência; mas que com o tempo se tornaram parceiros de profissão e de vida, tornando a experiência mais fácil e mais leve.

À minha orientadora, professora Dr^a. Cláudia Valéria Brandão, que me acompanhou desde a graduação, residência, até a pós graduação; me apoiando e me ajudando a criar e desenvolver meu caminho como médica veterinária e pesquisadora. À professora Dr^a. Fernanda Landim, que também me acompanha desde a graduação e tive o prazer de reencontrar durante a caminhada na pós.

Aos meus colegas de pesquisa e atendimento do setor de Oftalmologia Veterinária que se tornaram muito mais que apenas colegas de trabalho; e levarei ensinamentos técnicos e pessoais de cada um pro resto da minha vida.

À professora Dr^a. Cláudia Helena Pelizzon pelo imenso auxílio nos ensaios de ELISA e a cada experiência compartilhada que foram fundamentais para este estudo. Ao professor Dr. Carlos Padovani, que tive o prazer de conhecer durante esta jornada; obrigada por todas as discussões estatísticas.

Agradeço à empresa OMICS Biotecnologia Animal, que idealizou e possibilitou a existência deste projeto e pela confiança em mim depositada para realização do mesmo. Agradeço ao programa MAI/DAI, estruturado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001), sem os quais o projeto não se sustentaria .

Aos tutores colaborativos com nossa pesquisa, o meu muito obrigada. Agradeço também à cada vida animal, seja canina ou roedora, que contribuiu para a construção de um bem científico maior.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.” Carl G. Jung

GERALDINI, CAROLINE MEDEIROS. USO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA REPARAÇÃO TECIDUAL. Botucatu, 2023. 71p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

RESUMO

O uso tópico de produtos derivados de células tronco mesenquimais (CTM) na reparação tecidual foi descrito como similar ou superior à terapia celular direta, e , possuir vantagens na aplicabilidade clínica e armazenamento. Entretanto, a ação dose-efeito ainda precisa ser estabelecida. No presente estudo foi avaliado o efeito tópico do concentrado proteico obtido proveniente do cultivo de CTM de tecido adiposo visceral canino na reparação de feridas cutâneas de ratos e na superfície ocular em cães com ceratoconjuntivite seca. No primeiro estudo, avaliou-se por histomorfometria a celularidade e fibrose nos diferentes grupos tratados de feridas cirúrgicas em ratos. No segundo, variáveis importantes em cães acometidos pela doença do olho seco, como produção, lacrimal, tempo de ruptura do filme lacrimal, espessura da camada lipídica lacrimal por interferometria, dentre outras. Em relação à avaliação histomorfométrica nas feridas, não obteve-se diferença entre a aplicação tópica do hidrogel-alginato enriquecido ou não com o meio condicionado de CTM (MC-CTM). Na aplicação tópica ocular, apresentaram-se diferenças entre os grupos nas variáveis teste lacrimal de Schirmer (TLS-1), tempo de quebra do filme lacrimal (TRFL) e espessura corneal; e entre os momentos, notou-se diferenças na hiperemia ocular, TLS-1 e TRFL. Os olhos tratados com MC-CTM demonstrou tendência de melhora após o tratamento nestes aspectos da superfície ocular, porem ainda não foi suficiente para se igualar ao GT. O MC-CTM apresenta potencial como tratamento adjuvante na CCS. Considerando os escassos estudos para avaliação da utilização de MC-CTM na reparação tecidual, busca-se contribuir com resultados clínicos e histopatológicos da atividade parácrina da terapia tópica com MC-CTM.

Palavras chave: cicatrização, cão, rato, ceratoconjuntivite seca, secretoma, fator de crescimento.

GERALDINI, CAROLINE MEDEIROS. USO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA REPARAÇÃO TECIDUAL. Botucatu, 2023. 71p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

ABSTRACT

The topical use of products derived from mesenchymal stem cells (MSC) in tissue repair has been described as comparable or superior to direct cell therapy, with advantages in clinical applicability and storage. However, the dose-effect relationship still needs to be established. In this study, we evaluated the topical effect of the protein concentrate obtained from the culture of MSC from canine visceral adipose tissue on the healing of rat skin wounds and on the ocular surface in dogs with dry keratoconjunctivitis. In the first study, cellular density and fibrosis were histomorphometrically assessed in different treated groups of surgical wounds in rats. In the second study, important variables in dogs affected by dry eye disease, such as tear production, lacrimal film break-up time, thickness of the lacrimal lipid layer by interferometry, among others, were evaluated. Regarding histomorphometry evaluation of wounds, no difference was observed between the topical application of alginate hydrogel enriched or not with MSC-conditioned medium (CM-MSC). In topical ocular application, differences were observed between groups in the variables Schirmer's test, tear film breakup time and corneal thickness; and between moments, differences were noted in ocular hyperemia, Schirmer's test and non-contact tear film breakup time. Eyes treated with CM-MSC showed a trend of improvement after treatment in these aspects of the ocular surface but were not yet sufficient to match the control group. CM-MSC shows potential as an adjunct treatment in dry eye disease. Considering the limited studies on the use of CM-MSC in tissue repair, we aim to contribute with clinical and histopathological results of the paracrine activity of topical therapy with CM-MSC.

Keywords: wound healing, dog, rat, dry eye syndrome, secretome, growth factor.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Área em μm^2 da presença de celularidade em feridas de ratos no dia 10 do pós-operatório..... 41

Figura 2. Área em μm^2 da presença total de fibras de colágeno em feridas de ratos no dia 10 do pós-operatório..... 42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Sexo, raça, idade, peso e classificação da CCS das amostras coletadas em cada grupo participante do estudo.. 60

Tabela 2. Variáveis clínicas hiperemia conjuntival, opacidade, vascularização e pigmentação corneais, além de TLS-1 apresentadas em mediana e valores mínimo e máximo, nos diferentes momentos de avaliação em cada grupo tratado. A variável pressão intraocular está apresentada em média e desvio padrão em relação aos momentos avaliados..... 62

Tabela 3. Média e desvio padrão dos resultados de parâmetros avaliados de acordo com os períodos de tratamento. 64

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA: análise de variância
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- cm: centímetros
- nm: nanômetros
- mm: milímetros
- CTMs: células-tronco mesenquimais
- FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
- g: gramas
- kg: quilogramas
- mg/kg: miligramas por quilograma
- mg: miligramas
- GT: grupo tacrolimus (controle positivo)
- GC: grupo controle (sem meio condicionado tópico, controle negativo)
- GM: grupo meio condicionado
- HA: grupo tratado com formulação de hidrogel-alginato
- MC10: grupo tratado com hidrogel-alginato acrescido de meio condicionado de células-tronco mesenquimais a 10%
- MC20: grupo tratado com hidrogel-alginato acrescido de meio condicionado de células-tronco mesenquimais a 20%
- MC5: grupo tratado com hidrogel-alginato acrescido de meio condicionado de células-tronco mesenquimais a 5%
- MC-CTM: meio condicionado de células-tronco mesenquimais
- ml: mililitros
- µL: microlitros
- SRD: sem raça definida
- UNESP: Universidade Estadual Paulista
- mOsm/L: miliosmois por litro
- CCS: ceratoconjuntivite seca
- HS: hialuronato de sódio
- CM: carboximetilcelulose
- TLS-1: teste lacrimal de Schirmer tipo 1
- PIO: pressão intraocular

TRFL: teste de ruptura do filme lacrimal

TRFL-SC: teste de ruptura do filme lacrimal sem contato

SUMARIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I..... | 16 |
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 17 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 2.1 Células tronco mesenquimais (CTMs) e seu secretoma..... | 18 |
| 2.2 Terapia celular na cicatrização de feridas..... | 19 |
| 2.3 Terapia celular na ceratoconjuntivite seca | 20 |
| 2.3.1 Ceratoconjuntivite seca em cães | 20 |
| 2.3.2 Diagnóstico | 21 |
| 2.3.3 Fisiopatologia da CCS..... | 24 |
| 2.3.4 Tratamento da CCS..... | 24 |
| 2.4 Meio condicionado de CTMs e as vantagens da terapia livre de células | 25 |
| 2.5 Biomateriais como excipientes para meio condicionado | 26 |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 28 |
| 4 REFERÊNCIAS..... | 29 |
| CAPÍTULO II..... | 36 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 39 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 2.1 Obtenção do meio condicionado e manipulação do produto tópico..... | 40 |
| 2.2 Animais..... | 40 |
| 2.4 Feridas experimentais | 40 |
| 2.5 Grupos experimentais e tratamentos..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6 Obtenção das amostras e avaliação histopatológica..... | 41 |
| 2.7 Análise estatística | 42 |
| 3 RESULTADOS | 42 |
| 4 DISCUSSÃO | 43 |
| 5 CONCLUSÃO | 44 |
| 6 CONFLITO DE INTERESSE | 44 |
| 7 AGRADECIMENTOS | 45 |
| 8 REFERÊNCIAS | 45 |
| CAPÍTULO III..... | 48 |
| 1 INTRODUÇÃO | 51 |
| 2 MATERIAL E METODOS | 52 |
| 2.1 Preparação do colírio | 52 |
| 2.1 Delineamento experimental..... | 52 |
| 2.1 Avaliação clínica e testes oftalmológicos | 53 |
| 2.3.1 Teste lacrimal de Schirmer tipo 1 (TLS-1) | 54 |
| 2.3.2 Estesiometria..... | 54 |
| 2.3.3 Tonometria corneal de rebote..... | 54 |
| 2.3.4 Meibografia..... | 54 |
| 2.3.5 Interferometria | 55 |
| 2.3.5 Tempo de ruptura do filme lacrimal sem contato (TRFL-SC) | 55 |
| 2.3.6 Meniscometria lacrimal | 55 |
| 2.3.7 Osmometria lacrimal..... | 56 |
| 2.3.8 Tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL)..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 2.3.9 Teste de fluoresceína | 56 |
| 2.3.10 Paquimetria corneal central..... | 56 |
| 2.1 Metodologia estatística..... | 57 |
| RESULTADOS..... | 57 |
| 4 DISCUSSÃO | 63 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 65 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 66 |

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mecanismo de ação mais aceito das células tronco mesenquimais (CTMs), na medicina regenerativa, é que são células secretoras de fatores de crescimento, citocinas e exosomas em resposta a estímulos ambientais, mesmo que não sobrevivam após implante local, seus bioativos secretados continuam executando suas funções (JOSEPH et al., 2020). As CTMs também liberam esses bioativos no meio de cultivo; desta forma, os produtos obtidos do meio condicionado das células tronco mesenquimais (MC-CTMs) desempenham papel importante em processos como inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação tecidual (HUMENIK et al., 2023).

Além disso, o MC-CTMs tem sido utilizado em estudos clínicos por ser de fácil manipulação e obtenção, terapia mais segura, comparada ao implante celular, e apresentar baixa imunogenicidade (GUNAWARDENA et al., 2019). Nesse contexto, em estudos com MC-CTMs tópico em cicatrização de feridas em ratos, saudáveis e diabéticos, e em porquinhos da Índia verificaram melhora cicatricial em feridas padronizadas de até 2cm, além da vantagem da aplicação tópica em relação a injetável (ANSARI, 2013; GAO et al., 2020; JOSEPH et al., 2020; PAYUSHINA et al., 2018; RONG et al., 2019; SABZEVARI et al., 2020; YANG et al., 2020).

Na oftalmologia, o uso do MC-CTMs pode promover tratamento eficaz do olho seco em humanos, suprimindo a inflamação, a apoptose celular, estimulando a secreção lacrimal e promovendo a proliferação celular epitelial da córnea; contudo, até o presente momento não existem estudos clínicos sobre o tratamento com MC-CTMs na doença do olho seco em cães (ZHANG et al., 2023). Deste modo, justifica-se a necessidade de desenvolvimento de estudos clínicos objetivando aperfeiçoar novos meios possíveis de tratamentos com o MC-CTMs em relação a reparação de feridas, assim como a dose e efeito de MC-CTMs e na ceratoconjuntivite seca em cães.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células tronco mesenquimais (CTMs) e seu secretoma

As CTMs são células de origem embrionária mesodermal caracterizadas pela sua extensa capacidade proliferativa e potencial de se diferenciar em várias linhagens mesenquimais, sendo originárias primariamente na medula óssea com função reparadora e imunomoduladora de tecidos (CAPLAN; DENNIS, 2006).

Inicialmente acreditava-se que os efeitos terapêuticos das CTMs após o transplante fossem mediados pela migração destas para os locais de lesão, seguido de integração ao tecido danificado e diferenciação em células especializadas; no entanto, a comprovação da capacidade das CTMs em alterar o microambiente por meio da secreção de fatores de crescimento e citocinas tem sido apontado como o fator que mais contribui para seu potencial terapêutico (PHINNEY et al., 2015).

Assim, foi proposto que as CTMs exercem um papel importante de imunomodulação em diferentes tipos de células tais como neutrófilos, monócitos, basófilos, células T e B, embora tal processo ainda não esteja completamente elucidado; sabe-se que tais efeitos ocorrem pela interação de contato entre células e também pela produção de fatores biologicamente ativos como fatores de crescimento e citocinas modulados pelas células inflamatórias e por células do tecido lesionado (KYURKCHIEV, 2014).

Os diferentes efeitos terapêuticos das CTMs são dependentes do microambiente que se encontram, indicando que essas células necessitam de estímulo para desencadear sua resposta envolvendo complexa rede de comunicação celular (PHINNEY et al., 2015).

Desta forma, para exercerem sua função, as CTMs precisam ser ativadas por citocinas pró-inflamatórias, como o fator de crescimento transformador alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ), produzidas por células do sistema imune inato como macrófagos e neutrófilos (BERNARDO; FIBBE, 2013). Após o estímulo, as CTMs são capazes de autorregular os fatores da cascata da inflamação, incluindo as citocinas pró-inflamatórias: interleucinas- 1 β , fator de necrose tumoral- α , interferon- γ , óxido nítrico sintase, indoleamina, entre outros. Estes efeitos anti-inflamatórios podem ter influências profundas no ambiente tecidual local, modulando o processo de reparação tecidual (BERNARDO; FIBBE, 2013).

Adicionalmente, essas células também secretam fatores de crescimento que

promovem a efetiva revascularização tecidual expressando fatores pro-angiogênicos, como a angiopoetina-1 (Ang-1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos 2 e 7 (FGF-2, FGF-7) e o ativador do plasminogênio tecidual (PA_t) (CAPLAN; DENNIS, 2006).

Além de promover a angiogênese, as CTMs secretam fatores anti- apoptóticos e fatores de crescimento que aumentam a regeneração das células lesadas, além de estimularem a proliferação e diferenciação de células precursoras endógenas em diversos tecidos (CHEN et al., 2008).

2.2 Terapia celular na cicatrização de feridas

A cicatrização de uma ferida é um processo complexo que envolve migração celular, inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular (JOSEPH et al., 2020). Deste modo, a cicatrização é subclassificada em três fases: inflamatória ou de hemostasia, proliferativa e de remodelamento (WANG et al., 2018).

A partir do momento do estabelecimento ferida inicia a fase inflamatória, ou de hemostasia, que perdura de 6 a 12 horas, na qual o objetivo principal é conter o sangramento excessivo e preparar o leito da ferida para receber as células que irão atuar na progressão da lesão (BALSA; CULP, 2015). Na fase inflamatória, também ocorre liberação de quimioatrativos e fatores de crescimento pelas plaquetas, as quais participam do recrutamento de células que possuem papel importante no processo cicatricial (BALSA; CULP, 2015).

Após a primeira etapa, a ferida evolui para a fase de reparação com produção de tecido de granulação formado concomitantemente a outros processos, tais como reepitelização, imunomodulação e neovascularização (RODRIGUES et al., 2019). A fase proliferativa geralmente tem duração de 3 a 12 dias após estabelecimento da lesão e as principais células envolvidas são os fibroblastos, os quais desenvolvem o tecido de granulação e a matriz celular para a contração da ferida e suporte dos novos vasos sanguíneos (BALSA; CULP, 2015; RODRIGUES et al., 2019).

A fase de remodelamento, etapa final da cicatrização, perdura de 7 dias até meses/anos após a lesão e caracteriza-se pelo desenvolvimento de novo epitélio e cicatrização final (BALSA; CULP, 2015; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). O principal evento dessa fase é a deposição e organização de colágeno com regressão da neovascularização, para subsequente substituição do tecido de granulação por

tecido cicatricial (RODRIGUES et al., 2019).

Nesse contexto, o uso de CTMs tem se mostrado vantajoso quanto à velocidade e qualidade de cicatrização, principalmente nas lesões mais complexas (SOMAL et al., 2017). Além disso, sabendo que a principal ação das CTMs acontece devido liberação de seus bioativos, denominado secretoma, o uso do MC-CTMs torna-se uma alternativa viável no tratamento de feridas (JOSEPH et al., 2020).

Desta forma, estudos com MC-CTMs na cicatrização de feridas em modelos animais de laboratório demonstraram melhora cicatricial em feridas padronizadas, sendo a forma de aplicação tópica mais vantajosa em relação a injetável (ANSARI, 2013; GAO et al., 2020; JOSEPH et al., 2020; PAYUSHINA et al., 2018; RONG et al., 2019; SABZEVARI et al., 2020; YANG et al., 2020), porém ainda não existem estudos clínicos considerando o efeito dose-resposta e desenvolvidos em cães.

2.3 Terapia celular na ceratoconjuntivite seca

2.3.1 Ceratoconjuntivite seca em cães

O filme lacrimal pré corneal é responsável por manter a qualidade da superfície ocular levando oxigênio para a córnea avascular, removendo debris celulares, protegendo a córnea de microrganismos e realizando a lubrificação entre as pálpebras e a superfície ocular (ZHOU et al., 2013). Deste modo, a lágrima é composta de uma camada mucoaquosa e outra lipídica, sendo a funcionalidade das duas importante para manter a boa qualidade de visão do cão (GELATT, 2021).

A camada de mucina é secretada pelas células caliciformes da conjuntiva ocular, e se mistura com a constituindo a camada aquosa, que é secretada aproximadamente 70% pela glândula lacrimal principal e 30% pela glândula lacrimal da terceira pálpebra, formando uma camada mucoaquosa que é responsável por levar oxigênio, glicose e água para a superfície corneal e também eliminar metabólitos, detritos e bactérias, tendo por composição 98,2% de água e 1,8% de sólidos (principalmente proteínas) (GELATT, 2021). A camada mais externa é a lipídica, a qual é secretada pelas glândulas de meibômio e responsável por reduzir a evaporação aquosa, proporcionando maior estabilidade ao filme lacrimal (ZHOU et al., 2013).

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou síndrome do olho seco em cães, é a doença que altera uma ou mais partes do filme lacrimal pré corneal e pode ser classificada em dois subtipos: quantitativo ou qualitativo (IWASHITA et al., 2023).

A forma quantitativa é caracterizada pela diminuição da produção aquosa do filme

lacrimal, podendo ocorrer por diferentes origens (imunomediada, metabólica, traumática ou neurogênica), sendo a imunomediada a mais frequente, na qual as glândulas sofrem processos inflamatórios e são substituídas por tecido fibroso, diminuindo assim sua função (DE OLIVEIRA; WILSON, 2019).

Adicionalmente, a forma qualitativa caracteriza-se pela alteração na qualidade da lágrima, quando há diminuição de secreção de mucina ou lipídio, gerando assim instabilidade do filme lacrimal (DODI, 2015). A forma mista, terceiro subtipo, é descrito quando ambas a produção e a qualidade da lágrima estão alteradas (IWASHITA et al., 2023).

2.3.2 Diagnóstico

Vários testes diagnósticos são utilizados no diagnóstico da CCS, sendo os principais descritos abaixo relatados:

2.3.2.1 Teste lacrimal de Schirmer – 1

A CCS quantitativa é principalmente diagnosticada pelo teste lacrimal de Schirmer do tipo 1 (TLS-1), o qual consiste na colocação, sem anestesia tópica, de 0,5cm de uma fita de papel absorvente padronizado no saco conjuntival inferior e afere-se a quantidade de lágrima basal e reflexa que o cão produz em mm/min (NASCIMENTO et al., 2023). Caracteriza-se CCS grave nos valores ≤ 5 mm/min, entre 6 – 10 mm/min como CCS moderada e entre 11 – 14 mm/min considera-se CCS discreta ou subclínica; a produção lacrimal normal é descrita como ≥ 15 mm/min (NASCIMENTO et al., 2023).

2.3.2.2 Meniscometria

O menisco lacrimal é um reservatório no saco conjuntival inferior que acomoda o excesso de lágrimas para a formação da lágrima, durante o lacrimejamento reflexo e em humanos foi relatado que esse reservatório pode conter de 75% a 90% do volume lacrimal aquoso (DOGRU et al., 2006).

Na síndrome do olho seco, o volume do menisco lacrimal é diminuído se comparado ao de pacientes humanos que não apresentam deficiência lacrimal; sendo assim, a meniscometria também é um parâmetro diagnóstico para a variação

quantitativa da doença (MAINSTONE; BRUCE; GOLDING, 1996).

Uma alternativa para a avaliação do menisco lacrimal, sem a limitação da mensuração do volume, é a utilização de aparelhos que realizam padrão de reflexão interferométrica no espaço entre a pálpebra inferior e a córnea para estimar o volume lacrimal; estes valores, na oftalmologia médica, em humanos saudáveis podem variar entre 0,2 e 07 mm e em cães saudáveis estima-se valores em $0,53 \pm 0,11$ mm (DOUGHTY et al., 2002; PERUCCIO et al., 2020).

2.3.2.3 Teste de osmolaridade lacrimal

A osmolaridade da lágrima é caracterizada pela quantidade de solutos dentro do componente aquoso lacrimal em mOsm/L e tem sido amplamente utilizada como ferramenta diagnóstica na doença do olho seco em humanos; contudo em cães ainda não é utilizada como rotina (LAMKIN et al., 2020). A hiperosmolaridade lacrimal tem sido associada a deficiências lacrimais e/ou processos inflamatórios oculares, os quais atuam ressecando os olhos de humanos, coelhos e cães (BRON et al., 2017; LAMKIN et al., 2020).

Foi validada a utilização de um dispositivo descartável (TearLab®) para a mensuração da produção de lágrima baseada na osmolaridade lacrimal coletada diretamente do menisco lacrimal, porém foi relatada dificuldades na utilização devido ao pequeno volume do menisco em cães com CCS (SEBBAG et al., 2017).

2.3.2.4 Tempo de ruptura do filme lacrimal

O tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), ferramenta utilizada para o diagnóstico da CCS qualitativa, avalia a instabilidade evaporativa da lágrima na oftalmologia médica e veterinária (PALMER; RAMOS; RODRIGUEZ GALARZA, 2021).

O teste consiste em avaliar, após a aplicação de corante de fluoresceína, o tempo desde que as pálpebras são mantidas abertas até o aparecimento de uma mancha seca na superfície corneal; em cães saudáveis ocorre no tempo igual ou superior a 20 segundos ao passo que em cães com CCS qualitativa normalmente ≤ 5 segundos (SAITO; KOTANI, 2001).

Atualmente pode-se mensurar a evaporação da lágrima com o tempo de ruptura do filme lacrimal com auxílio do método de disco de Placido, ou seja, utilizando aparelhos que projetam discos na superfície corneal e medem o tempo

para quebra ou distorção das linhas dos discos, como o OSA-VET® (SBM Sistemi, Itália) (SRIDHAR; TRIPATHY, 2023).

2.3.2.5 Meibografia

As glândulas de meibômio são responsáveis pela produção lipídica do filme lacrimal e possuem a função principal de estabilização da parte aquosa da lágrima, impedindo a sua rápida evaporação (KNOP et al., 2011). A disfunção da glândula de meibômio (DGM) é caracterizada por uma alteração crônica das glândulas por obstruções ductais, atrofia do tecido glandular, encurtamento, dilatação e/ou perda total de tecido acinar cuja prevalência em cães ainda é pouco relatada (NELSON et al., 2011).

Na avaliação das glândulas e diagnóstico da DGM, atualmente, pode ser realizada a meibografia sem contato com a pálpebra do paciente, onde será avaliada a morfologia das glândulas de meibômio por iluminação infravermelha da placa tarsal, sendo bem tolerada por humanos e cães (KITAMURA et al., 2019; VIÑAS et al., 2019).

2.3.2.6 Interferometria lacrimal

A camada lipídica do filme lacrimal pode ser estimada por interferometria, a qual avalia a cinética da camada oleosa da lágrima e oferece informações sobre a espessura e fluidez desta no filme lacrimal; as camadas lipídicas mais espessas mostram padrões ondulatórios e as camadas mais finas são mais homogêneas (WISE; SOBEL; ALLEN, 2012). King-Smith et al. (2010) relataram que a composição da camada lipídica pode estar mais relacionada com o rápido tempo de evaporação quando comparado com a sua espessura. Sendo assim, nota-se a significativa relação entre os graus de interferometria associados com a DGM (VIÑAS et al., 2019).

2.3.2.7 OSA-VET®

Devido à necessidade de aparelhos que avaliassem fatores de qualidade da superfície ocular em medicina veterinária, a empresa SBM Sistemi® (Torino, Itália) desenvolveu um dispositivo que permite avaliar o filme lacrimal e o microambiente superficial do olho com testes de: videointerferometria para análise da espessura e

dinâmica da camada lipídica, além do tempo de ruptura do filme lacrimal; mensuração do menisco lacrimal; avaliação da topografia corneal por disco de Placido; e meibografia por luz infravermelha para avaliação das glândulas de meibômio (PERUCCIO et al., 2020).

Todos os testes são realizados sem contato com o paciente, não necessitando de colírios anestésicos ou corantes específicos e o aparelho foi testado em cães, gatos, coelhos e cavalos de forma inicial; porém, sugerem que as avaliações podem ser realizadas em qualquer tipo de paciente cooperativo (PERUCCIO et al., 2020).

2.3.3 Fisiopatologia da CCS

Tanto em cães quanto em humanos, o olho seco por deficiência aquosa é causado geralmente por uma deficiência de atividade das glândulas lacrimais, gerando assim uma diminuição na produção lacrimal (HISEY; GALOR; LEONARD, 2023).

No entanto, existem diversas causas que podem levar a CCS como traumas, doenças neurológicas, doenças metabólicas, toxicidades medicamentosas e excisão do tecido glandular; contudo, a principal causa relatada é o comprometimento das glândulas lacrimais, causado cronicamente pelo ataque do sistema imunológico (LEONARD et al., 2019).

Devido à cronicidade da doença, os cães são levados para atendimento com sinais clínicos mais avançados que os descritos em humanos, tais como hiperemia, irritação ocular, secreção de aspecto mucopurulento e até doenças secundárias corneais como neovascularização e pigmentação (HISEY; GALOR; LEONARD, 2023).

2.3.4 Tratamento da CCS

O tratamento convencional é realizado por aplicação tópica de lágrimas artificiais e imunomoduladores, sendo que em alguns casos se faz necessário o uso de anti-inflamatórios (BITTENCOURT et al., 2016; VILLATORO et al., 2015). Deste modo, a melhora da inflamação acontece devido inibição da atividade da calcineurina e, conseqüentemente, a desfosforilação do fator nuclear da proteína das células T ativada, um fator de transcrição necessário para a expressão de citocinas inflamatórias, que diminui os sinais inflamatórios e exerce sua atividade imunossupressora (VOITENA et al., 2018).

Porém, todos os tratamentos estabelecidos atualmente agem nos sinais clínicos sem tratar diretamente a doença, sendo assim, novas terapias são necessárias para além do tratamento sintomático (MITTAL; PATEL; GALOR, 2021). Como alternativa, existem estudos que utilizaram a aplicação perilacimal de CTMs alogênicas, apresentando resultados igualmente satisfatórios ao tratamento convencional na CCS em cães (BITTENCOURT et al., 2016; VILLATORO et al., 2015).

Estudos também apontaram resultados favoráveis no tratamento do olho seco induzido em ratos com MC-CTMs, melhorando significativamente o tecido epitelial da córnea e reduzindo citocinas pró inflamatórias, tais como TNF- α , proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α) e interleucina 6 (IL-6) (BERMUDEZ et al., 2015; SENDON-LAGO et al., 2019).

Além disso, tem sido demonstrado que o MC-CTMs contém fatores como TIMP-1, TIMP-2, FGF6, FGF7, HGF e receptor de uroquinase (uPAR) os quais são bioativos que causam regeneração epitelial da córnea além de inibirem a apoptose celular (BERMUDEZ et al., 2015; SENDON-LAGO et al., 2019).

2.4 Meio condicionado de CTMs e as vantagens da terapia livre de células

O meio condicionado (MC), ou secretoma, refere-se ao meio em que as CTMs foram cultivadas e estudos tem focado na aplicação clínica do MC devido à presença de fatores solúveis e/ou vesículas extracelulares contendo proteínas, peptídeos e fatores de crescimento em sua composição (CHANG et al., 2013; TIMMERS et al., 2008).

Esses fatores que foram secretados pelas CTMs apresentam propriedades terapêuticas, podendo ser tão eficaz quanto ao próprio transplante das próprias células correspondentes em distintos modelos animais (EIRÓ et al., 2014; VIZOSO et al., 2017; ZHOU et al., 2013).

O uso de terapias livres de células, mas contendo os fatores secretados pelas CTMs em medicina regenerativa, oferece vantagens importantes sobre as terapias baseadas em células-tronco, incluindo considerações de segurança associadas ao transplante de populações de células vivas e proliferativas como compatibilidade imunológica, tumorigenicidade, formação de êmbolos e transmissão de infecções (IONESCU et al., 2012).

O uso de secretoma de CTMs é mais econômico e prático para aplicação

clínica, uma vez que evita procedimentos de coleta de células e sua produção em massa é possível usando linhagens celulares sob condições laboratoriais controladas, fornecendo uma fonte conveniente de fatores bioativos (OSUGI et al., 2012).

O tempo, custo de expansão e manutenção de células-tronco cultivadas são reduzidos, podendo estar imediatamente disponíveis para o tratamento e o produto biológico obtido para aplicações terapêuticas pode ser modificado para os efeitos celulares específicos desejados (VIZOSO et al., 2017).

2.5 Biomateriais como excipientes para meio condicionado

2.5.1 Hidrogel e alginato

O hidrogel é uma substância não adesiva composta grande parte por água, que quando utilizado como curativos em feridas oferece um ambiente úmido e não aderente para o processo de cicatrização (FRANCESKO; PETKOVA; TZANOV, 2019). Alginatos são biopolímeros provenientes de algas marinhas, comumente utilizados em conjunto com hidrogéis na cicatrização de feridas, devido sua biocompatibilidade e propriedades de retenção de líquidos (BRUMBERG et al., 2021).

Ambos excipientes citados acima já foram relatados como cicatrizantes interessantes em feridas de pele e como eficientes carreadores de produtos biológicos, tais como células-tronco e meio condicionado, promovendo liberação prolongada dos fatores de crescimento e citocinas (BRUMBERG et al., 2021; FRANCESKO; PETKOVA; TZANOV, 2019; SABZEVARI et al., 2020; ZHANG; ZHAO, 2020).

2.5.2 Quitosana e quitina

A quitosana é um polissacarídeo linear desacetilado derivado da quitina, frequentemente obtido de artrópodes, geralmente sob a forma de partículas, flocos ou pó, podendo ser projetados em estruturas como géis, membranas, nanofibras, nanopartículas ou esponjas (SMIRNOVA et al., 2019; ZUBILLAGA et al., 2020).

Além disso, suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, capacidade anti-inflamatória, adesão, proteção antibacteriana e neuronal fazem da quitosana um produto promissor para a incorporação de fatores

de crescimento (HAMEED et al., 2022).

Sendo um dos poucos polissacarídeos naturais poli-catiônicos, a quitosana possui várias interações eletrostáticas que podem ser exploradas na fabricação de biomateriais, de acordo com a forma necessária para servir como suporte na regeneração tecidual (GUAN et al., 2020).

Visto isso, resultados experimentais já demonstraram que as nanopartículas de quitosana tiveram impacto positivo em propriedades estruturais, permitindo a liberação contínua de fatores de crescimento para estimular a proliferação de fibroblastos (AZIZIAN; HADJIZADEH; NIKNEJAD, 2018).

2.5.3 Hialuronato de sódio

O hialuronato de sódio (HS) é um glicosaminoglicano linear, não sulfatado, composto por unidades repetidas de ácido D-glucurônico e unidades de N-acetil-D-glucosamina, que vem se destacando desde a década de 90 como bom excipiente ocular (SHIMMURA et al., 1995). Apresenta devido sua permeação intraocular aprimorada, tempo de retenção aquosa mais longo, alta estabilidade fisiológica, biocompatibilidade inerente e biodegradabilidade (CASEY-POWER et al., 2022; SHIMMURA et al., 1995).

Os efeitos benéficos do HS na concentração de 0,15% como melhora da superfície ocular, estabilidade do filme lacrimal e sinais clínicos do olho seco já foram elucidados tanto em humanos quanto em cães, tendo ainda melhora significativa se o colírio de HS for suplementado com outros agentes terapêuticos (YANG et al., 2021).

2.5.4 Heparina e sulfato de heparina

A heparina e o sulfato de heparina são glicosaminoglicanos (GAGs) que consistem em unidades repetidas de ácido hexatônico sulfonado (1,4)-D-glucosamina (MOHAMMADI et al., 2019). A heparina pode ser sintetizada e armazenada nas células, enquanto o sulfato de heparina esta predominantemente presente na matriz extracelular de células e tecidos (GUAN et al., 2020).

A heparina possui capacidade de interação com diversos fatores de crescimento os quais possuem afinidade com seu domínio de ligação; essa afinidade retarda a difusão e degradação enzimática dos fatores de crescimento, potencializando, desse modo, suas funções biológicas (CHOI et al., 2016).

2.5.5 Dextrano

O dextrano é um polissacarídeo de alto peso molecular, que pode ser extraído de diferentes microrganismos (GUAN et al., 2020). Por possuir boa biocompatibilidade, Zhang et al. (2019) obtiveram resultados satisfatórios quando estabeleceram uma junção de dextrano com poli (ácido lático-co- ácido glicólico) em microesferas, para a entrega de fatores de crescimento endotelial vascular para fins terapêuticos de neovascularização.

2.5.6 Celulose e carboximetilcelulose

A celulose é o polímero de fonte renovável mais amplamente disponível na natureza, obtido a partir da parede celular secundária das células vegetais, correspondendo aproximadamente 20% a 30% do peso seco das células (HASNAIN; NAYAK, 2019). A estrutura fundamental das macromoléculas de celulose é o glicano e seus derivados semissintéticos tem ampla aplicação em áreas como cosméticos, farmácia, membranas de diálise e biossensores (AMSDEN, 2015).

No que se refere ao controle de fatores de crescimento, um estudo demonstrou melhora na capacidade de indução de oligodendrócitos utilizando um veículo de hidrogel injetável com HS e metilcelulose, se comparado ao grupo controle (TAM; COOKE; SHOICHET, 2012). Além disso, estudos já demonstraram melhora similar no quadro de olho seco leve a moderado em humanos em grupos experimentais que utilizaram colírio de HS a 0,1% ou carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% (LEE et al., 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do MC-CTM apresenta-se promissor na reparação tecidual, tanto em feridas quanto em superfície ocular, principalmente em ratos. Entretanto, ainda não há estudos de conhecimento dos autores que demonstre essa eficácia em cães. A literatura sugere que limitações no uso de agentes bioativos, como carreamento dos fatores de crescimento, podem ser melhorados com o uso de excipientes eficazes. Ainda não é de conhecimento estudos que sugiram doses proteicas mínimas de MC-CTMs, vias de aplicação ou frequência nos tratamentos. Sendo assim, abre-se espaço para novos estudos que foquem nessas diretrizes para terapias em

pequenos animais.

4 REFERÊNCIAS

- AMSDEN, B. Novel biodegradable polymers for local growth factor delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 318–328, nov. 2015.
- ANSARI, M. M. Therapeutic Potential of Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and its Conditioned Media in Diabetic Rat Wound Healing. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 3, 2013.
- AZIZIAN, S.; HADJIZADEH, A.; NIKNEJAD, H. Chitosan-gelatin porous scaffold incorporated with Chitosan nanoparticles for growth factor delivery in tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 315–322, dez. 2018.
- BALSA, I. M.; CULP, W. T. N. Wound Care. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 45, n. 5, p. 1049–1065, set. 2015.
- BERMUDEZ, M. A. et al. Corneal Epithelial Wound Healing and Bactericidal Effect of Conditioned Medium From Human Uterine Cervical Stem Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 2, p. 983–992, 11 fev. 2015.
- BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 392–402, out. 2013.
- BITTENCOURT, M. K. W. et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca. **Cell Medicine**, v. 8, n. 3, p. 63–77, out. 2016.
- BRON, A. J. et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. **The Ocular Surface**, v. 15, n. 3, p. 438–510, jul. 2017.
- BRUMBERG, V. et al. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. **Biomedicines**, v. 9, n. 9, p. 1235, 16 set. 2021.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 1 ago. 2006.
- CASEY-POWER, S. et al. Hyaluronic Acid: Its Versatile Use in Ocular Drug Delivery with a Specific Focus on Hyaluronic Acid-Based Polyelectrolyte Complexes. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 1479, 15 jul. 2022.

CHANG, C.-P. et al. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. **Clinical Science**, v. 124, n. 3, p. 165–176, 1 fev. 2013.

CHEN, Y. et al. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 5, p. 815–820, jan. 2008.

CHOI, D. H. et al. Growth factors-loaded stents modified with hyaluronic acid and heparin for induction of rapid and tight re-endothelialization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 602–610, maio 2016.

DE OLIVEIRA, R. C.; WILSON, S. E. Practical guidance for the use of cyclosporine ophthalmic solutions in the management of dry eye disease. **Clinical Ophthalmology**, v. Volume 13, p. 1115–1122, jul. 2019.

DODI, P. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, p. 341, out. 2015.

DOGRU, M. et al. Strip Meniscometry: A New and Simple Method of Tear Meniscus Evaluation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 1895, 1 maio 2006.

DOUGHTY, M. J. et al. The tear (lacrima) meniscus height in human eyes: a useful clinical measure or an unusable variable sign? **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 25, n. 2, p. 57–65, jun. 2002.

EIRÓ, N. et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 21, p. 10692–10708, 15 nov. 2014.

FRANCESKO, A.; PETKOVA, P.; TZANOV, T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 41, p. 5782–5797, 31 jan. 2019.

GAO, M. et al. [Effects of hypoxia-pretreated rat adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium on wound healing of rats with full-thickness defects]. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi = Zhonghua Shaoshang Zazhi = Chinese Journal of Burns**, v. 36, n. 9, p. 803–812, 20 set. 2020.

GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 6. ed. 111 River Street, Hoboken, NJ 07030,

USA: John Wiley & Sons, Inc., 2021.

GUAN, N. et al. Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 1438–1451, 1 jan. 2020.

GUNAWARDENA, T. N. A. et al. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 4, p. 569–586, abr. 2019.

HAMEED, A. Z. et al. Chitosan: A Sustainable Material for Multifarious Applications. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2335, 9 jun. 2022.

HASNAIN, M. S.; NAYAK, A. K. **Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications**. London: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2019.

HISEY, E. A.; GALOR, A.; LEONARD, B. C. A comparative review of evaporative dry eye disease and meibomian gland dysfunction in dogs and humans. **Veterinary Ophthalmology**, v. 26, n. S1, p. 16–30, abr. 2023.

HUMENIK, F. et al. Impact of Canine Amniotic Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media on the Wound Healing Process: In Vitro and In Vivo Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8214, 4 maio 2023.

IONESCU, L. et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 303, n. 11, p. L967–L977, 1 dez. 2012.

IWASHITA, H. et al. A review of diagnostic tests for qualitative and quantitative tear film deficiency in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 26, n. S1, p. 5–15, abr. 2023.

JOSEPH, A. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 7–8, p. 5555–5569, jul. 2020.

KING-SMITH, P. E.; HINEL, E. A.; NICHOLS, J. J. Application of a Novel Interferometric Method to Investigate the Relation between Lipid Layer Thickness and Tear Film Thinning. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 5, p. 2418, 1 maio 2010.

KITAMURA, Y. et al. Assessment of meibomian gland morphology by noncontact infrared meibography in Shih Tzu dogs with or without keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary**

Ophthalmology, v. 22, n. 6, p. 744–750, nov. 2019.

KNOP, E. et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of the Meibomian Gland. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 4, p. 1938, 30 mar. 2011.

KYURKCHIEV, D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 552, 2014.

LAMKIN, I. D. et al. Osmolarity of basal and reflex tears of normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 23, n. 4, p. 747–753, jul. 2020.

LEE, J. H. et al. Efficacy of Sodium Hyaluronate and Carboxymethylcellulose in Treating Mild to Moderate Dry Eye Disease. **Cornea**, v. 30, n. 2, p. 175–179, fev. 2011.

LEONARD, B. C. et al. Comprehensive Clinical, Diagnostic, and Advanced Imaging Characterization of the Ocular Surface in Spontaneous Aqueous Deficient Dry Eye Disease in Dogs. **Cornea**, v. 38, n. 12, p. 1568–1575, dez. 2019.

MAINSTONE, J. C.; BRUCE, A. S.; GOLDING, T. R. Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye. **Current Eye Research**, v. 15, n. 6, p. 653–661, jan. 1996.

MITTAL, R.; PATEL, S.; GALOR, A. Alternative therapies for dry eye disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 32, n. 4, p. 348–361, jul. 2021.

MOHAMMADI, S. et al. Fabrication of Nanofibrous PVA/Alginate-Sulfate Substrates for Growth Factor Delivery: Fabrication of Nanofibrous PVA/Alginate- Sulfate Substrates for Growth Factor Delivery. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 2, p. 403–413, fev. 2019.

NASCIMENTO, F. F. et al. Comparison of strip meniscometry and Schirmer tear test results and tear film breakup time between healthy dogs and dogs with dry eye disease. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 86, n. 4, 2023.

NELSON, J. D. et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Definition and Classification Subcommittee. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 4, p. 1930, 30 mar. 2011.

OSUGI, M. et al. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 13–14,

p. 1479–1489, jul. 2012.

PALMER, S.; RAMOS, R. V.; RODRIGUEZ GALARZA, R. M. Clinical comparison of tear film breakup time measurements in normal dogs using three different methods of fluorescein solution administration. **Veterinary Ophthalmology**, v. 24, n. 5, p. 503–508, set. 2021.

PAYUSHINA, O. V. et al. Effect of Mesenchymal Stromal Cells and Conditioned Media on Healing of Skin Wound. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 165, n. 4, p. 572–575, ago. 2018.

PERUCCIO, C. et al. **Clinical Atlas - Ocular Surface Analyser, Veterinary Setting, for the Diagnosis of Dry Eye with O.S.A.-VET**. Claudio Peruccio ed. Italy: [s.n.]. v. 1

PHINNEY, D. G. et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8472, 7 out. 2015.

RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 1 jan. 2019.

RONG, X. et al. Antler stem cell-conditioned medium stimulates regenerative wound healing in rats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 326, dez. 2019.

SABZEVARI, R. et al. SA/G hydrogel containing hCAP-18/LL-37-engineered WJ- MSCs-derived conditioned medium promoted wound healing in rat model of excision injury. **Life Sciences**, v. 261, p. 118381, nov. 2020.

SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 1, p. 7–11, mar. 2001.

SEBBAG, L. et al. Assessment of tear film osmolarity using the TearLabTM osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 4, p. 357–364, jul. 2017.

SENDON-LAGO, J. et al. Corneal regeneration by conditioned medium of human uterine cervical stem cells is mediated by TIMP-1 and TIMP-2. **Experimental Eye Research**, v. 180, p. 110–121, mar. 2019.

SHIMMURA, S. et al. Sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eyes. **British Journal of Ophthalmology**, v. 79, n. 11, p. 1007–1011, 1 nov. 1995.

- SMIRNOVA, N. V. et al. Effect of Chitin Nanofibrils on Biocompatibility and Bioactivity of the Chitosan-Based Composite Film Matrix Intended for Tissue Engineering. **Materials**, v. 12, n. 11, p. 1874, 10 jun. 2019.
- SOMAL, A. et al. Impact of Cryopreservation on Caprine Fetal Adnexa Derived Stem Cells and Its Evaluation for Growth Kinetics, Phenotypic Characterization, and Wound Healing Potential in Xenogenic Rat Model: IMPACT OF CRYOPRESERVATION ON FETAL ADNEXA DERIVED MSCs. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 8, p. 2186–2200, ago. 2017.
- SRIDHAR, U.; TRIPATHY, K. Corneal Topography. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- TAM, R. Y.; COOKE, M. J.; SHOICHET, M. S. A covalently modified hydrogel blend of hyaluronan–methyl cellulose with peptides and growth factors influences neural stem/progenitor cell fate. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 37, p. 19402, 2012.
- TIMMERS, L. et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. **Stem Cell Research**, v. 1, n. 2, p. 129–137, jun. 2008.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, out. 2009.
- VILLATORO, A. J. et al. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- VIÑAS, M. et al. Meibomian gland dysfunction (MGD), as diagnosed by non-contact infrared Meibography, in dogs with ocular surface disorders (OSD): a retrospective study. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 443, dez. 2019.
- VIZOSO, F. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 25 ago. 2017.
- VOITENA, J. N. et al. Eficácia dos colírios ciclosporina e tacrolimo no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 699–703, jun. 2018.
- WANG, P.-H. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n.

2, p. 94–101, fev. 2018.

WINIARCZYK, M. et al. Dog Tear Film Proteome In-Depth Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144242, 23 dez. 2015.

WISE, R. J.; SOBEL, R. K.; ALLEN, R. C. Meibography: A review of techniques and technologies. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 26, n. 4, p. 349–356, out. 2012.

YANG, J. et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 5911–5926, ago. 2020.

YANG, Y.-J. et al. A Meta-Analysis of the Efficacy of Hyaluronic Acid Eye Drops for the Treatment of Dry Eye Syndrome. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 2383, 1 mar. 2021.

ZHANG, C. et al. Advances in the applications of mesenchymal stem cell-conditioned medium in ocular diseases. **Experimental Eye Research**, v. 233, p. 109560, ago. 2023.

ZHANG, M.; ZHAO, X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1414–1428, nov. 2020.

ZHANG, Z. D. et al. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor using a dextran/poly(lactic-co-glycolic acid)-combined microsphere system for therapeutic neovascularization. **Heart and Vessels**, v. 34, n. 1, p. 167–176, jan. 2019.

ZHOU, B.-R. et al. The Effect of Conditioned Media of Adipose-Derived Stem Cells on Wound Healing after Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

ZUBILLAGA, V. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Chondrospheroids Cultured in Hypoxia and a 3D Porous Chitosan/Chitin Nanocrystal Scaffold as a Platform for Cartilage Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1004, 3 fev. 2020.

CAPÍTULO II

Trabalho a ser enviado para a revista "Cytotherapy", seguindo as seguintes normas:
<https://www.elsevier.com/journals/cytotherapy/1465-3249/guide-for-authors>.

**Avaliação histomorfométrica da celularidade e colágeno em feridas de
ratos tratados com meio condicionado de células-tronco
mesenquimais**

Caroline Medeiros GERALDINI, Cláudia Valéria Seullner BRANDÃO

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu, São
Paulo 18616-681, Brasil

Corresponding author: Cláudia Valéria Seullner Brandão Email:
valeria.brandao@unesp.br

HISTOMORPHOMETRICAL ASSESSMENT OF CELLULARITY AND COLLAGEN IN WOUNDS OF RATS TREATED WITH CONDITIONED MEDIUM FROM MESENCHYMAL STEM CELLS

ABSTRACT

Considering important mesenchymal stem cell's (MSC) paracrine activity, studies have evaluated conditioned medium (MSC-CM) obtained from cell culture as topical treatment in wound healing. However, the minimum protein dose required to enhance wound healing has not yet been defined, nor the frequency of use. The present study evaluated histopathological performance for cellularity and collagen fibers of MSC-CM derived from adipose canine cells at three different concentrations of 35 adult's rats experimental wounds measuring 3 cm in diameter. The hypothesis that it would enhance wound healing in dose-response manner. Conversely, wounds that received daily treatment with sodium alginate- based hydrogel (AH) formulation alone or enriched with 5, 10 and 20% MSC-CM and non-treated wounds demonstrated similar performance for collagen and cellularity. To the knowledge of the authors, this is the first *in vivo* experiment with low dose of MSC-CM in wound healing. Under the conditions of the present study, 5, 10 and 20% MSC-CM concentration were similar considering cellularity and collagen in wound healing in rats.

Keywords: secretome, growth factor, fibrosis, histopathological, hydrogel- alginate.

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um dos processos mais desafiadores e complexos, a qual se caracteriza por três fases distintas: a inflamatória ou de hemostasia, a de proliferação e a fase de remodelamento [1,2]. Cada uma dessas envolve marcadores biológicos específicos e sinalizadores celulares que desempenham ações cruciais na reparação tecidual [1]. No entanto, vários fatores, como doenças metabólicas pré existentes, infecções, estado nutricional desfavorável e uso de medicamentos, podem interferir ou atrasar o progresso da cicatrização [3].

Existem evidências dos efeitos terapêuticos da terapia celular, que objetiva regenerar e restaurar as funções teciduais, e as células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de tecido adiposo são eficazes em melhorar a cicatrização em feridas [4]. Entretanto, sabe-se que as células destinadas ao local de ação não sobrevivem por muito tempo, e seu principal benefício terapêutico ocorre pelos importantes fatores bioativos produzidos e liberados [5].

As CTM são capazes de produzir concentrado proteico, em seu meio de cultura, rico em fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas com potencial de enriquecer o microambiente de uma lesão [6]. Isto posto, a utilização do meio condicionado proveniente das CTM (MC-CTM) propõe um método alternativo ao uso de terapia celular convencional, apresentando vantagem na facilidade de transporte e aplicação, visto ser um produto livre de células e, ao contrário da terapia celular convencional, não associado à carcinogênese [7–9].

Estudos prévios já demonstraram que a utilização tópica de MC-CTM efetivamente melhorou a cicatrização de feridas em roedores [6,10–13,21]. Entretanto, não há descrição metodológica da concentração proteica mínima necessária para efetiva atividade biológica, a qual permanece desconhecida. Cicatrizes hipertróficas são formadas devido a um processo aberrante da cicatrização, apresentando prolongamento das fases de proliferação e remodelação, levando a produção excessiva de colágeno [14]. Alguns estudos descreveram redução na hipertrofia cicatricial em grupos tratados com CTM comparado ao controle [15–18]. No entanto, ainda existe carência de estudos clínicos realizados comparando essas variáveis nos tratamentos com MC-CTM e HA.

O presente estudo tem por objetivo avaliar por histomorfometria a celularidade e formação de colágeno após terapia tópica diária com MC-CTM em três concentrações distintas (5, 10 e 20%) em veículo de hidrogel e alginato (HA), de forma comparada ao tratamento padrão (HA puro) e controle em feridas experimentais

de ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do meio condicionado e manipulação do produto tópico

O produto tópico utilizado neste estudo tem como princípio ativo o MC-CTM obtido por meio de cultura celular sob privação de nutrientes de tecido adiposo canino, proveniente de gordura visceral periovariana de cadelas (depósito de patente código BR 10 2022 016233-6). Para validação das substâncias presentes no concentrado proteico, foram identificados por meio de espectrometria de massa o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP).

O MC-CTM foi acrescido em hidrogel com alginato de sódio a 2% e ácido ascórbico a 0,1% nas proporções de 5%, 10% e 20%, denominados MC5, MC10 e MC20. Sendo 2 mg/ml a concentração proteica total do MC-CTM puro, os produtos finais contêm, respectivamente, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml e 400 μ g/ml de concentrado proteico.

2.2 Animais

Trinta e cinco ratos da espécie *Rattus norvegicus* variedade *albinus*, machos, com 45 dias, sadios, pesando em média 200 g, foram obtidos do Biotério Central da UNESP Botucatu e mantidos em gaiolas individuais com alimento e água *ad libitum* até completa ambientação. O projeto obteve aprovação do comitê de ética local (protocolo CEUA 0083/2022).

2.4 Feridas experimentais

Os animais foram submetidos à analgesia com morfina (2 mg/kg), e anestesia dissociativa com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), todos por via intramuscular. A seguir, os animais foram submetidos à tricotomia, antissepsia com clorexidine degermante 2% e clorexidine alcoólico a 0,5%, e realizadas feridas padronizadas com *punch* cirúrgico circular de 3 cm de diâmetro na região interescapular.

2.5 Grupos experimentais e tratamentos

Os cinco grupos foram constituídos aleatoriamente por sete ratos cada. Todos os animais receberam limpeza diária da ferida com solução fisiológica 0,9% e aplicação tópica de fina camada de tratamento de acordo com seu grupo, de forma asséptica. Os grupos experimentais MC5, MC10 e MC20 receberam MC-CTM nas concentrações de 5, 10 e 20% em veículo de hidrogel e alginato, respectivamente. O grupo HA foi tratado apenas com hidrogel com alginato de sódio. O grupo controle (GC) foi submetido apenas à limpeza diária com solução fisiológica 0,9%. Todos os tratamentos, com exceção do GC, foram realizados em modalidade cega ao tratador e avaliador. Os produtos foram armazenados sob refrigeração (1-4 °C) e utilizados em até 6 meses desde a data de fabricação.

2.6 Obtenção das amostras e avaliação histopatológica

No décimo dia de tratamento, os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg), e analgesia com morfina (3 mg/kg/IM). Após remoção da crosta, quando presente, a área residual da ferida de cada rato foi colhida cirurgicamente. Ato contínuo, o animal foi submetido à eutanásia via aprofundamento do plano anestésico com máscara de isoflurano e injeção intracardíaca de KCl na dose de 150 mg/kg.

As amostras foram seccionadas de forma longitudinal em sua porção média juntamente com a transição para pele saudável, fixadas em formaldeído a 10% tamponado durante 72 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70%. Após procedimento padrão de técnica histológica, foram submetidas à inclusão em parafina. Seções com espessura de 4µm foram cortadas, montadas em lâminas histológicas, desparafinizadas e processadas para os diferentes métodos de coloração.

Para análise morfológica da celularidade, as lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE). Além disso, foi realizada coloração tricrômico de Masson para avaliação da fibrose. Todas as amostras foram analisadas em 5 campos aleatórios em cada lâmina no microscópio Olympus BX 57[®] associado à Câmera Olympus DP73[®] no aumento de 40x e associado ao software AVSoft BioView 5 Spectra Module[®]. Os resultados foram expressos em área (µm²) de presença das estruturas selecionadas para análise, sendo celularidade ou fibrose, sempre pelo mesmo avaliador.

2.7 Análise estatística

Os resultados das áreas avaliadas foram submetidos à técnica de análise de variância (ANOVA) paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de 5% de significância foi adotado em todas as análises.

3 RESULTADOS

Em relação a celularidade total das amostras analisadas, apenas o grupo tratado com HA apresentou maior celularidade em relação ao GC ($p > 0,05$), porém foi similar aos demais grupos tratados com meio condicionado.

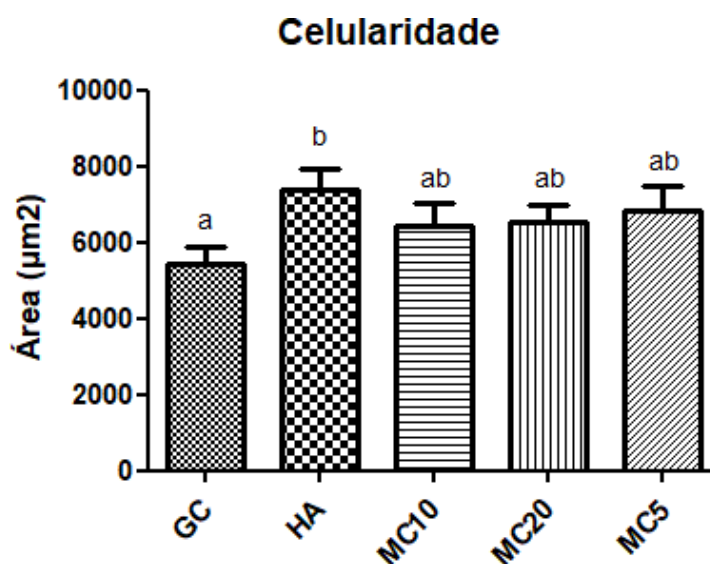


Figura 1. Área em μm^2 da presença de celularidade em feridas de ratos no D10.

Legenda: HA- tratamento tópico com hidrogel-alginato. MC5, MC10 e MC20 - tratamento com MC-CTM a 5%, 10% e 20%, acrescido em HA, respectivamente. Sobrescritos - letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Na avaliação morfométrica da presença total de fibras de colágeno, os grupos tratados com HA e MC10 apresentaram maior número de fibras por área da lâmina em comparação ao GC e MC5; entretanto, o MC20 não diferiu dos demais grupos analisados.

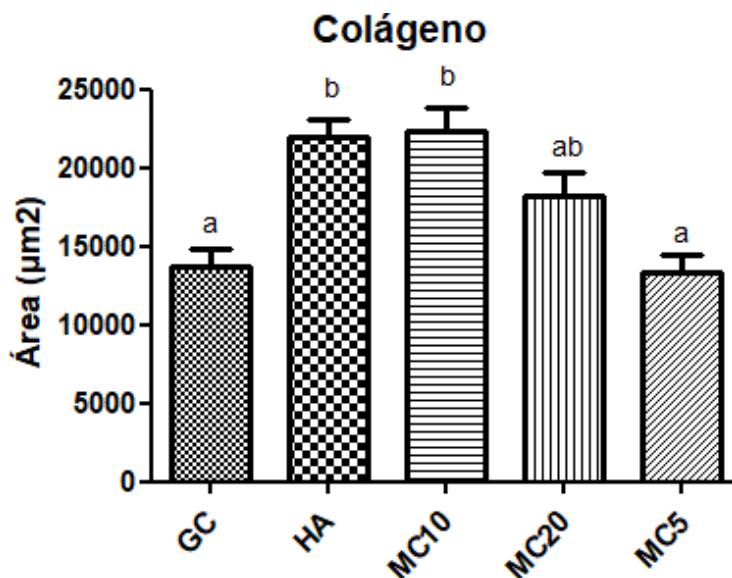


Figura 2. Área em μm^2 da presença total de fibras de colágeno em feridas de ratos no dia 10 do pós-operatório.

Legenda: HA- tratamento tópico com hidrogel-alginato. MC5, MC10 e MC20 - tratamento com MC-CTM a 5%, 10% e 20%, acrescido em HA, respectivamente. Sobrescritos - letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$)

Associando a morfometria da maior área, o grupo tratado apenas com HA foi superior tanto na celularidade quanto em fibras colágenas comparado ao GC, porém não diferiu se comparado conjuntamente com MC10 e MC20.

4 DISCUSSÃO

A análise histomorfométrica de feridas foi avaliada neste estudo utilizando diferentes concentrações do MC em veículo de hidrogel-alginato, durante a fase de reparação proliferativa. No presente estudo, assim como descrito por Sabzevari *et al.* (2020), com metodologia comparativa similar da ação do HA isolado e do enriquecido com MC a 50% na cicatrização de feridas em ratos, os grupos tratados não apresentaram diferenças entre si em relação a presença de celularidade no momento avaliado (D10), porém apresentaram uma maior concentração celular se comparados ao GC.

Análogo à Liang *et al.* (2021) e Xu *et al.* (2023), que avaliaram a cicatrização de feridas comparando origens diferentes de MC, os grupos tratados com adição do secretoma apresentou menor tempo de cicatrização total da ferida, além do aumento da celularidade nas amostras tratadas em relação ao grupo controle.

Sendo assim, em relação a presença de colágeno nas amostras deste estudo

em que os grupos tratados com HA e MC10 apresentaram maior quantidade de fibras de colágeno se comparados ao GC e MC5 e não diferiram do MC20. Por sua vez, Liang *et al.* (2021) não observaram diferença significativa entre os grupos tratados com MC de diferentes origens celulares, porém os grupos tratados apresentaram maior concentração de colágeno em D9 se comparados ao grupo controle, portanto próximo ao momento de avaliação selecionado neste estudo.

A formação de cicatrizes hipertróficas é fortemente influenciada por eventos pró-fibróticos e pela ativação de fibroblastos, e esses processos essenciais podem ser quantificados por meio da análise de deposição de colágeno pela coloração tricrômica de Masson [20]. Sugere-se que feridas tratadas com MC previnam a formação de cicatriz hipertrófica, pois Hu *et al.* (2019) observaram que a ativação de genes pró-fibróticos em feridas tratadas com MC-CTM em coelhos foi menor do que ao grupo tratado apenas com DMEM (grupo controle); no entanto, uma limitação no nosso estudo foi a ausência da realização dessa análise molecular.

A principal diferença entre a cicatriz normal e a hipertrófica é o excesso de deposição de matriz extracelular pelos fibroblastos no processo de reparação, ou seja, a qualidade do rearranjo celular é tão importante quanto a quantidade celular presente no processo cicatricial, como por exemplo, o remodelamento de colágeno tipo III em tipo I [21]. Visto isso, a avaliação histopatológica qualitativa também pode se fazer necessária em estudos clínicos cicatriciais. A realização da avaliação qualitativa celular, associada à técnica de picrossírius, poderia fortalecer o entendimento dos eventos reparadores que ocorrem durante o tratamento com MC em diferentes concentrações e HA [22].

5 CONCLUSÃO

A celularidade total por histomorfometria foi similar nas feridas tratadas com hidrogel-alginato puro ou enriquecido com MC-CTMs nas diferentes concentrações estudadas (5, 10 e 20%).

O tratamento padrão com HA puro considerando a presença total de colágeno foi similar aos acrescidos com MC10 e MC20, e superiores ao GC e MC5, sugerindo maior efetividade em concentrações maiores de meio condicionado.

6 CONFLITO DE INTERESSE

A empresa OMICS Biotecnologia Animal por meio do Projeto CNPq (MAI/DAI)

forneceu todos os produtos tópicos utilizados durante o experimento (processo nº 140812/2021-0).

7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MAI/DAI) (processo nº 140812/2021-0), em conjunto com a empresa OMICS Biotecnologia Animal, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

8 REFERÊNCIAS

- [1] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* 2019;99:665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>.
- [2] Diegelmann R F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004;9:283. <https://doi.org/10.2741/1184>.
- [3] Balsa IM, Culp WTN. Wound Care. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2015;45:1049–65. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009>.
- [4] Okano H, Sipp D. New trends in cellular therapy. *Development* 2020;147:dev192567. <https://doi.org/10.1242/dev.192567>.
- [5] Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *IJMS* 2017;18:1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>.
- [6] Joseph A, Baiju I, Bhat IA, Pandey S, Bharti M, Verma M, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. *J Cell Physiol* 2020;235:5555–69. <https://doi.org/10.1002/jcp.29486>.
- [7] Im G-B, Kim YH, Kim Y-J, Kim S-W, Jung E, Jeong G-J, et al. Enhancing the Wound Healing Effect of Conditioned Medium Collected from Mesenchymal Stem Cells with High Passage Number Using Bioreducible Nanoparticles. *IJMS*

2019;20:4835. <https://doi.org/10.3390/ijms20194835>.

[8] Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* 2019;8:467. <https://doi.org/10.3390/cells8050467>.

[9] Ansari MM. Therapeutic Potential of Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and its Conditioned Media in Diabetic Rat Wound Healing. *J Stem Cell Res Ther* 2013;3. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000141>.

[10] Rong X, Chu W, Zhang H, Wang Y, Qi X, Zhang G, et al. Antler stem cell-conditioned medium stimulates regenerative wound healing in rats. *Stem Cell Res Ther* 2019;10:326. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1457-9>.

[11] Payushina OV, Butorina NN, Sheveleva ON, Domaratskaya EI. Effect of Mesenchymal Stromal Cells and Conditioned Media on Healing of Skin Wound. *Bull Exp Biol Med* 2018;165:572–5. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4215-6>.

[12] Gao M, Zhang J, Wang JZ, Liu Y, Zhang X, Shi Y. [Effects of hypoxia-pretreated rat adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium on wound healing of rats with full-thickness defects]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2020;36:803–12. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501120-20200508-00258>.

[13] Yang J, Chen Z, Pan D, Li H, Shen J. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. *IJN* 2020;Volume 15:5911–26. <https://doi.org/10.2147/IJN.S249129>.

[14] Sabzevari R, Roushandeh AM, Mehdipour A, Alini M, Roudkenar MH. SA/G hydrogel containing hCAP-18/LL-37-engineered WJ- MSCs-derived conditioned medium promoted wound healing in rat model of excision injury. *Life Sciences* 2020;261:118381. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118381>.

[15] Lingzhi Z, Meirong L, Xiaobing F. Biological approaches for hypertrophic scars. *Int Wound J* 2020;17:405–18. <https://doi.org/10.1111/iwj.13286>.

[16] Yates CC, Rodrigues M, Nuschke A, Johnson ZI, Whaley D, Stolz D, et al.

Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:193. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0644-9>.

[17] Zhang C, Xiao J, Fa L, Jiang F, Jiang H, Zhou L, et al. Advances in the applications of mesenchymal stem cell-conditioned medium in ocular diseases. *Experimental Eye Research* 2023;233:109560. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109560>.

[18] Huang S, Wu Y, Gao D, Fu X. Paracrine action of mesenchymal stromal cells delivered by microspheres contributes to cutaneous wound healing and prevents scar formation in mice. *Cytherapy* 2015;17:922–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.690>.

[19] Liu Y-L, Liu W-H, Sun J, Hou T-J, Liu Y-M, Liu H-R, et al. Mesenchymal stem cell-mediated suppression of hypertrophic scarring is p53 dependent in a rabbit ear model. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:136. <https://doi.org/10.1186/s13287-014-0136-5>.

[20] Hu C-H, Tseng Y-W, Chiou C-Y, Lan K-C, Chou C-H, Tai C-S, et al. Bone marrow concentrate-induced mesenchymal stem cell conditioned medium facilitates wound healing and prevents hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *Stem Cell Res Ther* 2019;10:275. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1383-x>.

[21] Zhang J, Li Y, Bai X, Li Y, Shi J, Hu D. Recent advances in hypertrophic scar. *Histology and Histopathology* 2018;27–39. <https://doi.org/10.14670/HH-11-908>.

[22] Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–55. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>.

[23] Liang X, Lin F, Ding Y, Zhang Y, Li M, Zhou X, et al. Conditioned medium from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing through enhanced angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2021;12:295. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02366-x>.

[24] Xu Y-F, Wu Y-X, Wang H-M, Gao C-H, Xu Y-Y, Yan Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates diabetic foot ulcers in rats.

Clinics 2023;78:100181. <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2023.100181>.

CAPÍTULO III

Trabalho a ser enviado para a revista "Clinical and Experimental Ophthalmology", seguindo as seguintes normas:
<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14429071/homepage/forauthors.html>.
Fator de impacto: 4.

**Uso de meio condicionado de células tronco mesenquimais na
ceratoconjuntivite seca de cães**

Caroline Medeiros GERALDINI, Cláudia Valéria Seullner BRANDÃO

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu, São Paulo 18616-681, Brasil

Corresponding author: Cláudia Valéria Seullner Brandão Email:
valeria.brandao@unesp.br

USE OF CONDITIONED MEDIUM FROM MESENCHYMAL STEM CELLS IN KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA IN DOGS

ABSTRACT

The conditioned medium derived from mesenchymal stem cells (MSCs), a protein rich medium in growth factors, offers an innovative approach to keratoconjunctivitis sicca (KCS), not related in dogs. The present study aims to evaluate and compare ocular therapy using eye drops of MSC-CM with eye drops of tacrolimus 0,03% in 27 eyes of dogs diagnosed naturally with KCS, considering clinical, corneal Cochet- Bonnet esthesiometry, tear film break-up time, meibography, lacrimal film interferometry, non-contact corneal topography, lacrimal meniscometry using OSA-VET® technology and lacrimal osmometry using IPen® technology. In ocular topical application, differences were observed between groups in the variables lacrimal Schirmer's test, tear film breakup time and corneal thickness; and between moments, differences were noted in hyperemia, lacrimal Schirmer's test and non-contact tear film breakup time parameters. Despite the conditioned medium-group (CMG) showing a trend of improvement after treatment in these aspects of the ocular surface, it was still insufficient to match the tacrolimus-group, indicating potential use of conditioned medium as an adjunctive treatment in KCS in dogs. Given the limited studies on conditioned medium derived from MSCs use in KCS in dogs, we aim to contribute with clinical results and explore this new therapeutic alternative.

Keywords: secretome, dry eye, growth factor, veterinary medicine, cellular therapy

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou Síndrome do Olho Seco, é uma doença multifatorial caracterizada pela instabilidade e hiper osmolaridade lacrimal causando sinais como inflamação, lesão na superfície ocular e alterações neurosensoriais¹. O filme lacrimal é composto classicamente por duas camadas: a camada mucoaquosa, produzida pelas células caliciformes e pelas glândulas lacrimais, responsável pela aderência do filme na córnea e por carrear oxigênio, glicose e água para a superfície corneal; e a camada lipídica mais externa produzida pelas glândulas de meibômio e responsável por retardar a evaporação da parte aquosa e promover maior estabilidade ao filme lacrimal².

A CCS pode ser classificada em dois subtipos: evaporativa ou por deficiência aquosa³. Deste modo, a evaporativa é caracterizada pela instabilidade do filme lacrimal devido alterações na camada lipídica da lágrima e a CCS por deficiência aquosa é caracterizada pela falta de produção/volume da camada aquosa da lágrima⁴. O tratamento padrão das CCS inclui administração tópica de lágrimas artificiais, anti-inflamatórios e imunomoduladores, porém novas terapias são necessárias para cessar a etiologia e não apenas os sinais clínicos⁴.

Nos cães, a glândula lacrimal principal e a da terceira pálpebra são responsáveis por 70% e 30%, respectivamente, da produção da porção aquosa da lágrima². Sendo assim, dois trabalhos utilizaram aplicação perilacrimal de células tronco mesenquimais (CTM) alogênicas apresentando resultados igualmente satisfatórios ao tratamento convencional da CCS em cães^{5,6}.

As CTM são capazes de produzir um concentrado proteico, em seu meio de cultura, rico em fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas com potencial de enriquecer o microambiente de uma lesão⁷. Sabendo-se isso, a utilização do meio condicionado proveniente das CTM (MC-CTM) propõe um método alternativo a terapia celular convencional, com vantagem no transporte e facilidade aplicação, além de não ser associado à carcinogênese⁸⁻¹⁰.

Estudos também apontaram resultados favoráveis na qualidade da superfície ocular em ratos tratados com MC-CTM, demonstrando melhora significativa no tecido epitelial da córnea e reduzindo citocinas pro inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α) e interleucina 6 (IL-6)^{11,12}. Além disso, demonstraram que o MC-CTM contém fatores como TIMP-1, TIMP-2, FGF6, FGF7, HGF e receptor de uroquinase (uPAR), bioativos que promovem regeneração

epitelial da córnea e inibem a apoptose celular ^{11,12}. A instilação tópica ocular de MC-CTM efetivamente melhorou a superfície ocular em roedores ¹³.

Este estudo inovador com o uso de MC-CTM tem por objetivo avaliar o desempenho clínico e histopatológico de terapia tópica ocular do imunomodulador tacrolimus 0,03% associado ao hialuronato de sódio a 0,15% (HS), e colírio de HS e carboximetilcelulose 0,3% (CMC) enriquecido ou não com MC-CTM, de forma comparativa em grupos de tratamento. A hipótese é que o MC-CTM promoverá qualidade melhor ou similar ao uso de imunomodulador na superfície ocular em cães com ceratoconjuntivite seca.

2 MATERIAL E METODOS

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Declaração ARVO para o Uso de Animais para Pesquisa Oftálmica Animal e da Visão e com o Comitê de Uso de Animais (CEUA nº 0219/2022) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2.1 Preparação do colírio

O colírio tópico utilizado teve como princípio ativo concentrado proteico obtido por meio de cultura celular padrão, de tecido adiposo canino oriundo de gordura visceral periovariana de cadelas híginas doadoras, sob privação de nutrientes. O material foi confeccionado pela empresa Omics Biotecnologia Animal Ltda. Neste Foram identificados por meio de espectrometria de massa o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFPB) no MC-CTM obtido.

O MC-CTM dessa cultura foi isolado e posteriormente, sob condições de assepsia e antissepsia, incorporado o ativo biológico de MC-CTM a 2mg/ml ao colírio de hialuronato de sódio a 0,3% e carboximetilcelulose a 0,6%, na proporção de 1:1, sendo assim, a concentração final do colírio teste foi de 1mg/ml de proteínas, hialuronato de sódio a 0,15% e carboximetilcelulose 0,3%.

2.1 Delineamento experimental

O estudo foi prospectivo, cego e randomizado. Foram avaliados 27 olhos, de cães machos e fêmeas, sem predileção por raça, atendidos no Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu diagnosticados por pelo menos seis meses com ceratoconjuntivite seca (CCS). Como critérios de inclusão foram considerados cães com CCS quantitativa, ou seja, com teste lacrimal de Schirmer (TLS) inferior 15mm/min e período de *washout* da aplicação de atropina tópica e imunomoduladores superior há dois meses. Os critérios de exclusão foram cães com doenças infectocontagiosas e os submetidos a excisão cirúrgica da glândula da terceira pálpebra.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais. No Grupo Tacrolimus (GT), os olhos (n=9) receberam o tratamento nacional preconizado para ceratoconjuntivite seca (tacrolimus 0,03% e hialuronato de sódio 0,15%), no Grupo Meio Condicionado (GM, n=9) os olhos receberam colírio com 50% de concentrado de proteínas + 50% de hialuronato de sódio 0,3% e carboximetilcelulose 0,6% e Grupo Controle (GC, n=9) os olhos receberam apenas hialuronato de sódio 0,3% e carboximetilcelulose 0,6%, produzidos pela Omics Biotecnologia Animal Ltda.

A administração dos produtos nos diferentes grupos experimentais foi feita pela instilação de uma gota do colírio nos olhos acometidos, a cada 12 horas¹⁴, até o período final de avaliação aos 60 dias. Como recomendação aos tutores, foi indicada a manutenção dos colírios sob refrigeração a 4°C (geladeira), bem como o uso de colar elizabetano durante todo o tempo das avaliações.

Caso necessário após exame oftalmológico, foi receitado tratamento antimicrobiano nos diferentes grupos experimentais durante um período de dez dias. Todos os animais foram avaliados antes do início do tratamento (D0) e aos 15 (D15), 30 (D30) e 60 (D60) dias após o tratamento, pelo mesmo avaliador, com experiência oftalmológica, às cegas.

2.1 Avaliação clínica e testes oftalmológicos

As variáveis clinico-oftalmológicas analisadas foram: hiperemia conjuntival, vascularização, opacidade e pigmentação corneal. Essas variáveis clinico-oftalmológicas foram classificadas em uma escala de 0 a 3, sendo 0 – ausente, 1 – discreto, 2 – moderado e 3 – grave¹⁵. Os testes oftalmológicos foram realizados na seguinte ordem:

2.3.1 Teste lacrimal de Schirmer tipo 1 (TLS-1)

O teste foi realizado com as tiras padronizadas de papel absorvente de 0,5cm (Opthalmos®) e consistiu na sua colocação no saco conjuntival inferior e imediata aferição da quantidade de lágrima basal e reflexa que o cão produz em mm/min ¹⁶. No D0 e D60, os olhos de cada grupo foram classificados segundo o TLS, em CCS discreta (14-11mm/min), moderada (10-6mm/min) e CCS grave (≤ 5 mm/min) ².

2.3.2 Estesiometria

Foi realizada com estesiômetro Cochet-Bonnet (Luneau Ophtalmologie, França) para determinar a sensibilidade da córnea. O teste foi realizado com o toque de um microfilamento estendido (6 cm) e gradualmente encurtado até que o paciente exiba o reflexo de piscar em até 5 estímulos e o resultado foi apresentado em valores de pressão em g/mm² usando a tabela de conversão do próprio aparelho.

2.3.3 Tonometria corneal de rebote

Foi utilizado o tonômetro Tonovet Plus® (iCare), no modo cão, que possui duas molas que impulsionam uma sonda magnetizada até a córnea e detectam a desaceleração da sonda produzida pelo contato do olho, relacionando assim essa velocidade de desaceleração com a pressão intraocular (PIO) ¹⁷. O valor final da PIO foi considerado a média da mensuração de seis medidas consecutivas.

As avaliações a seguir (2.3.4 a 2.3.8) foram realizadas com o auxílio da tecnologia OSA-VET® apenas nos GM e GC:

2.3.4 Meibografia

Para a avaliação das glândulas de meibômio foi realizada a meibografia sem contato com a pálpebra do paciente, onde foi avaliada a morfologia das glândulas de meibômio por iluminação infravermelha da placa tarsal ^{18,19}. A mensuração é realizada medindo a porcentagem de área ausente de glândulas de meibômio na pálpebra analisada.

2.3.5 Interferometria

A camada lipídica do filme lacrimal foi estimada por interferometria, avaliado assim, a cinética da camada oleosa da lágrima. Essa avaliação oferece informações sobre a espessura e fluidez da camada no filme lacrimal onde camadas lipídicas mais espessas mostram padrões de ondas e camadas mais finas são mais homogêneas²⁰. As imagens da interferometria foram avaliadas em 7 graus de classificação da espessura da camada lipídica: grau 0 (nenhuma camada lipídica visível), grau 1 (camada acinzentada, muito transparente, pouco reflexiva e com padrão tricotado, sendo a espessura dessa camada de aproximadamente 15-20 nm), grau 2 (camada cinza, mais densa, padrão bem tricotado, sendo a espessura dessa camada de aproximadamente 20-30 nm), grau 3 (camada reflexiva com ondas verticais e horizontais, com espessura de aproximadamente 30 – 40 nm), grau 4 (camada branco-azulada com ondas predominantemente horizontais, apresentando espessura de aproximadamente 40-60 nm), grau 5 (camada com colorações amarelo, marrom, azul e roxo com fundo cinza transparente, espessura de aproximadamente 60-80 nm), grau 6 (camada com cores mais intensas e com ondas predominantemente horizontais, espessura de aproximadamente 80-100 nm) e grau 7 (camada com espessura >100 nm)^{21,23}.

Além da espessura, é avaliado também a dinâmica da camada lipídica, pela seguinte escala: grau 1 (15-20nm), grau 2 (30-40 nm), grau 3 (50-60 nm), grau 4 (70-80 nm), grau 5 (90-100 nm) e grau 6 (>100 nm)²³.

2.3.5 Tempo de ruptura do filme lacrimal sem contato (TRFL-SC)

Foi mensurada a evaporação da lágrima pelo tempo de ruptura do filme lacrimal com auxílio do método de disco de Plácido, que projeta discos na superfície corneal e com os olhos inicialmente fechados, mensura o tempo em segundos, para quebra ou distorção das linhas dos discos após abertura das pálpebras²².

2.3.6 Meniscometria lacrimal

O menisco lacrimal, mensurado em milímetros, referiu-se ao acúmulo de fluido entre a pálpebra inferior e a córnea que pode ser avaliado por um padrão de reflexão interferométrica após o ato de piscar, para evitar interferências pela evaporação da lágrima²³.

2.3.7 Osmometria lacrimal

Após 30 minutos do TLS-1, foi avaliada a concentração de solutos na composição aquosa da lágrima em mOsm/L pelo IPen® (I-MED Pharma, Dollard-des-Ormeaux, Canada) tocando o dispositivo no menisco lacrimal próximo ao canto lateral do olho¹⁷. Esse dispositivo realizou a contabilização por meio de impedância elétrica com tiras de uso único, caso o aparelho apresente erro na leitura, uma nova tira tem que ser utilizada ¹⁷.

2.3.8 Tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL)

Foi avaliado, após a aplicação de corante de fluoresceína, o tempo desde que as pálpebras são mantidas abertas até o aparecimento de uma mancha seca na superfície corneal que em cães normais ocorre em ≥ 20 segundos e em cães com CCS qualitativa normalmente ≤ 5 segundos ²⁴.

2.3.9 Teste de fluoresceína

A integridade do epitélio corneal foi avaliada pela instilação de uma gota de colírio de fluoresceína (Fludiat®) e após retirada do excesso com solução fisiológica a 0,9% foi avaliado, com auxílio de uma lâmpada de cobalto com magnificação de 10x, presença ou ausência de pontos fluorescentes na córnea. Caso presente, foi indicativo de lesão no epitélio e caso ausente, o epitélio corneal se apresentava íntegro.

2.3.10 Paquimetria corneal central

A espessura corneal foi avaliada com o auxílio do paquímetro portátil SP-100 (Tomey, Japão) após instilação de colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 5mg/ml (Anestalcon®). Foram realizados toques na córnea para mensuração de oito pontos centrais e posteriormente foi realizado a média e desvio padrão dos valores obtidos.

2.1 Metodologia estatística

O estudo das variáveis clínico-oftalmológicas foi realizado por meio da técnica de análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, com a opção paramétrica quando houve aderência dos dados à distribuição normal de probabilidades e, na ausência da aderência a opção não-paramétrica. Em ambas situações houve a complementação com o teste de comparações múltiplas; no caso paramétrico o teste de Bonferroni e, no caso não paramétrico, o teste de Dunn. Em todas as análises os resultados foram apresentados considerando o nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS

Após 60 dias de tratamento, dos 27 olhos avaliados, nenhum efeito adverso macroscópico na superfície ocular foi observado com os tratamentos tópicos empregados. Os resultados referentes à idade, sexo, raça e peso de cada grupo, bem como a classificação de gravidade da CCS avaliada pelo TLS-1 em subgrupos estão representados na Tabela 1.

Não houve diferença na idade média dos animais, em anos, nos diferentes grupos, sendo estas $7,4 \pm 3,0$ no GT, $9,9 \pm 2,7$ no GM e $7,8 \pm 1,5$ no GC ($p > 0,05$). Em relação ao sexo dos animais, o número de fêmeas no GT ($n=5/9$) e GM ($n=4/9$) foram similares, e estes inferiores ao GC ($n= 7/9$).

Tabela 1: Sexo, raça, idade, peso e classificação da CCS das amostras coletadas em cada grupo.

| Grupo | Identificação | Sexo | Raça | Idade (anos) | Peso (kg) | Classificação CCS* |
|-----------|---------------|-------|-------------|--------------|-----------|--------------------|
| GT | 1-T | Fêmea | Pug | 8 | 9,8 | Discreta |
| | 2-T | Fêmea | Pug | 8 | 9,8 | Moderada |
| | 3-T | Fêmea | Shih-Tzu | 5 | 8,6 | Grave |
| | 4-T | Macho | Shih-Tzu | 4 | 7,8 | Moderada |
| | 5-T | Macho | Shih-Tzu | 4 | 7,8 | Discreta |
| | 6-T | Macho | SRD | 12 | 5,6 | Discreta |
| | 7-T | Macho | SRD | 12 | 5,6 | Discreta |
| | 8-T | Fêmea | Shih-Tzu | 7 | 6,2 | Moderada |
| | 9-T | Fêmea | Shih-Tzu | 7 | 6,2 | Moderada |
| GM | 1-M | Macho | Shih-Tzu | 4 | 8,3 | Grave |
| | 2-M | Macho | Shih-Tzu | 4 | 8,3 | Grave |
| | 3-M | Fêmea | SRD | 13 | 6,9 | Grave |
| | 4-M | Fêmea | SRD | 13 | 6,9 | Grave |
| | 5-M | Macho | Blue Heeler | 9 | 32,1 | Grave |
| | 6-M | Macho | Pequinês | 13 | 8,1 | Grave |
| | 7-M | Macho | Pequinês | 13 | 8,1 | Discreta |
| | 8-M | Fêmea | SRD | 10 | 13,4 | Grave |
| | 9-M | Fêmea | SRD | 10 | 13,4 | Grave |
| GC | 1-C | Fêmea | Shih-Tzu | 8 | 7,4 | Moderada |
| | 2-C | Fêmea | SRD | 10 | 27,3 | Discreta |
| | 3-C | Fêmea | SRD | 10 | 27,3 | Moderada |
| | 4-C | Fêmea | SRD | 6 | 5,8 | Moderada |
| | 5-C | Fêmea | SRD | 6 | 5,8 | Grave |
| | 6-C | Macho | Shih-Tzu | 7 | 7,4 | Moderada |
| | 7-C | Macho | Shih-Tzu | 7 | 7,4 | Moderada |
| | 8-C | Fêmea | Shih-Tzu | 8 | 7,1 | Moderada |
| | 9-C | Fêmea | Shih-Tzu | 8 | 7,1 | Moderada |

Legenda: SRD = Sem Raça Definida; * CCS discreta (14-11mm/min), moderada (10- 6mm/min) e CCS grave (<=5mm/min). GT - grupo tacrolimus; GM e GC – grupos tratados com e sem MC, respectivamente.

A evolução das variáveis clínicas estudadas está descrita na Tabela 2; houve redução significativa apenas quanto à hiperemia conjuntival após 60 dias de tratamento em todos os grupos avaliados, enquanto as outras variáveis se mantiveram estáveis durante os momentos. Entretanto, na comparação entre grupos, o GM apresentou piora na hiperemia em relação aos demais grupos a partir do D15. Em relação à pigmentação corneal, houve piora no GM em relação aos demais grupos apenas nos momentos D15 e D30.

A produção lacrimal avaliada pelo TLS-1 está apresentada na Tabela 2; verificou-se média inicial superior do GT e similar no momento inicial entre GC e GM, apesar da média numérica ser inferior no GM, este comportamento permaneceu na comparação entre grupo até o M60. Considerando a evolução temporal do tratamento, no GT verificou-se aumento e manutenção da produção lacrimal a partir de D15 até o D60, similar ao GM, e diferente do GC que praticamente manteve a produção lacrimal. Mesmo considerando ausência da diferença estatística entre os grupos GM e GC no D60, se comparado ao DO, GM duplicou o valor da média de produção lacrimal.

Em relação a PIO, os grupos GT e GC apresentaram uma diminuição no valor após os 60 dias de tratamento, porém não diferindo entre si, exceto no D60, quando a PIO no GC foi menor. Entretanto, o GM iniciou com valor médio inferior os demais grupos (15,44 mmHg) e ao final do D60, apresentou um aumento no valor da PIO, diferindo do valor final de GC e assemelhando-se ao GT.

Tabela 2: Variáveis clínicas hiperemia conjuntival, opacidade, vascularização e pigmentação corneais, além de TLS-1 apresentadas em mediana e valores mínimo e máximo, nos diferentes momentos de avaliação em cada grupo tratado. A variável pressão intraocular está apresentada em média e desvio padrão em relação aos momentos avaliados.

| Momentos de avaliação | | | | | | |
|------------------------------|-------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------|
| Variáveis | Grupo | D0 | D15 | D30 | D60 | p-valor |
| Hiperemia conjuntival | GT | 2 (0;3) ^a B | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;1) ^a A | 0 (0;1) ^a A | p<0,05 |
| | GC | 2 (0;2) ^a B | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;1) ^a A | 0 (0;1) ^a A | p<0,05 |
| | GM | 2 (2;3) ^a B | 2 (1;3) ^b B | 2 (1;3) ^b B | 1 (0;3) ^b A | p<0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | |
| Opacidade corneal | GT | 2 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | p>0,05 |
| | GC | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;2) ^a A | p>0,05 |
| | GM | 2 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | |
| Vascularização corneal | GT | 2 (1;3) ^a A | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | p>0,05 |
| | GC | 2 (0;2) ^a A | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;2) ^a A | 1 (0;1) ^a A | p>0,05 |
| | GM | 2 (1;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | 1 (0;3) ^a A | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | |
| Pigmentação corneal | GT | 1 (1;3) ^a A | 1 (0;3) ^b A | 1 (0;3) ^b A | 2 (1;3) ^a A | p>0,05 |
| | GC | 0 (0;3) ^a A | 0 (0;2) ^a A | 0 (0;2) ^a A | 1 (0;3) ^a A | p>0,05 |
| | GM | 1 (0;3) ^a A | 2 (0;3) ^b A | 2 (0;3) ^b A | 2 (0;3) ^a A | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | |
| TLS – 1 (mm/min) | GT | 8 (5;13) ^b A | 13 (8;20) ^b B | 15 (8;20) ^b B | 15 (8;20) ^b B | p<0,05 |
| | GC | 8 (2;13) ^a B | 5 (3;8) ^a A | 7 (2;11) ^a AB | 6 (3;11) ^a AB | p<0,05 |
| | GM | 2 (0;14) ^a A | 6 (1;18) ^a B | 5 (2;18) ^a B | 4 (0;15) ^a B | p<0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | |
| Pressão intraocular (mmHg) * | GT | 19,33 (3,35) ^b B | 17,78 (2,68) ^a AB | 17,89 (2,76) ^a AB | 17,67 (1,50) ^b A | p<0,05 |
| | GC | 19,78 (4,21) ^b B | 16,00 (3,28) ^a AB | 16,33 (4,85) ^a AB | 13,11 (2,42) ^a A | p<0,05 |
| | GM | 15,44 (3,43) ^a A | 15,00 (2,40) ^a A | 15,33 (2,24) ^a A | 18,00 (2,92) ^b B | p<0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | |

Escores: 0 – ausência; 1 – presença discreta; 2 – moderada; 3 – intensa. (–) indica ausência de sinal clínico observado 0(0;0). GT - grupo tacrolimus; GM e GC – grupos tratados com ou sem MC, respectivamente. Duas medianas (médias) seguidas de uma mesma letra minúscula não difere entre si (p>0,05) quanto aos respectivos grupos fixado o momento de avaliação. Duas medianas (médias) seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula não diferem entre si (p>0,05) quanto aos respectivos momentos de avaliação dentro do grupo. *: média (desvio-padrão).

A espessura média da córnea (Tabela 3) não diferiu entre momentos e nem entre grupos no D0 ($p>0,05$), no entanto no D60, o GT apresentou-se inferior. Quanto a qualidade do filme lacrimal, considerando as variáveis, TRFL-SC, osmolaridade e interferometria, também não houve diferença estatística entre os grupos e nem entre os momentos, mesmo havendo uma diminuição numérica da osmolaridade lacrimal nos grupos GT e GM após os 60 dias de tratamento. Em relação à estesiometria (Tabela 3), o GT apresentou menor sensibilidade da córnea em relação ao GC no D0; verificou-se aumento numérico da sensibilidade da córnea em todos os grupos avaliados ao final das avaliações, embora significativo apenas no GT.

As avaliações da superfície ocular pelo aparelho OSA-VET[®] realizadas apenas no GM e GC, como área de perda de glândulas de meibômio, meniscometria lacrimal, TRFL-SC e interferometria da camada lipídica da lágrima estão apresentadas na Tabela 3. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, e nem entre os momentos, em relação às variáveis de perda de área glandular palpebral (meibomiografia) e interferometria. Em relação a altura do menisco lacrimal, notou-se no D0 um menisco significativamente inferior no GM, e este apresentou aumento com a evolução do tratamento no GM (de $0,24 \pm 0,12$ mm para $0,39 \pm 0,20$ mm), porém não sendo suficiente para gerar diferença estatística; diferente do GC que reduziu de forma significativa em relação ao momento inicial.

Na análise do TRFL, os valores também não diferiram após os tratamentos em todos os grupos, mantendo-se menor que 5 segundos. Observou-se que no D0 diferença significativa entre o GT e GM, com valores inferiores no GM, e intermediários no GC, tal comportamento manteve-se até o final do estudo. Já em relação ao TRFL-SC, o GC apresentou um aumento no tempo de estabilidade do filme lacrimal ao final das avaliações, enquanto GM manteve-se estável.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos resultados de parâmetros avaliados de acordo com os períodos de tratamento.

| Momentos de avaliação | | | | |
|---|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------|
| Parâmetros | Grupo | D0 | D60 | p-valor |
| Estesiometria (g/mm²) | GT | 3,50 (0,75) ^a | 5,17 (1,03) ^a | p<0,05 |
| | GC | 5,22 (0,62) ^b | 5,72 (0,44) ^a | p>0,05 |
| | GM | 3,72 (2,08) ^{ab} | 4,17 (2,17) ^a | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p<0,05 | p>0,05 | |
| TRFL (segundos) | GT | 4,59 (3,26) ^b | 3,91 (1,13) ^b | p>0,05 |
| | GC | 3,55 (2,22) ^{ab} | 2,61 (1,64) ^{ab} | p>0,05 |
| | GM | 1,41 (0,88) ^a | 1,89 (1,59) ^a | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p<0,05 | p<0,05 | |
| Osmolaridade lacrimal (mOsm/L) | GT | 307,22 (10,67) ^a | 286,67 (21,59) ^a | p>0,05 |
| | GC | 294,11 (15,46) ^a | 297,44 (12,10) ^a | p>0,05 |
| | GM | 302,56 (14,86) ^a | 288,89 (14,16) ^a | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p>0,05 | |
| Paquimetria corneal (µm) | GT | 752,00 (240,20) ^a | 644,56 (37,21) ^a | p>0,05 |
| | GC | 871,89 (179,92) ^a | 823,33 (161,45) ^b | p>0,05 |
| | GM | 928,22 (121,03) ^a | 894,67 (106,68) ^b | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p<0,05 | |
| TRFL-SC (segundos) | GC | 1,37 (1,17) | 2,10 (1,13) | p<0,05 |
| | GM | 1,29 (0,85) | 1,38 (0,99) | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p>0,05 | |
| Meniscometria (mm) | GC | 0,50 (0,18) | 0,32 (0,05) | p<0,05 |
| | GM | 0,24 (0,12) | 0,39 (0,20) | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p<0,05 | p>0,05 | |
| Meibografia (%) | GC | 8,78 (2,86) | 10,22 (1,92) | p>0,05 |
| | GM | 10,11 (3,86) | 10,33 (4,87) | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p>0,05 | |
| Interferometria (escore) * | GC | 1 (1;4) | 1 (1;2) | p>0,05 |
| | GM | 1 (1;2) | 1 (1;1) | p>0,05 |
| <i>p-valor</i> | | p>0,05 | p>0,05 | |

Legenda: duas médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula não diferem entre si (p>0,05) quanto aos respectivos grupos fixados no momento. * mediana (valor mínimo; valor máximo). GT - grupo tacrolimus; GM e GC - grupos tratados com ou sem M, respectivamente. .

4 DISCUSSÃO

O tratamento do olho seco em cães, naturalmente acometidos pela doença, foi descrito utilizando-se colírio de meio condicionado de forma inovadora, com enfoque na avaliação oftalmológica da superfície anterior. A hipótese de melhora similar com o uso de MC-CTM foi parcialmente aceita como terapia adjuvante. A descrição da tendência à predisposição racial, sexual e etária para o desenvolvimento da CCS em cães foi relatada^{25,26}, e segundo Nascimento et al. (2023)¹⁷ o acometimento em cães adultos com a média acima de 7 anos é o mais prevalente, corroborando aos resultados encontrados.

Em humanos, sabe-se mulheres possuem maior predileção de desenvolver a síndrome do olho seco, provavelmente relacionado aos efeitos de hormônios sexuais, i.e estrógeno³⁰. Em relação ao sexo dos animais, observou-se que de forma geral 59,3% dos participantes foram fêmeas, corroborando a Sansom e Barnett (1985), diferentemente de outros que não descrevem predileção sexual na CCS em cães²⁷⁻²⁹. Algumas raças são reconhecidas mundialmente como predispostas ao desenvolvimento da CCS, como Bulldog Inglês, Lhasa-Apso, Shih-Tzu, Pequinês, Poodle, Pug, West Highland White Terrier e Cocker Spaniel¹⁷, fortalecendo o observado neste estudo em que 44,4% são da raça Shih-Tzu, 7,4% da raça Pug e 7,4% Pequinês, totalizando 59,2%. Os SRD são comuns nacionalmente, o que explica a sua alta prevalência (37%).

Em se tratando de melhora na inflamação da superfície ocular, observou-se diminuição nos escores de hiperemia conjuntival e vascularização corneal numérica ao final das avaliações em todos os grupos, corroborando com o único estudo disponível que avaliou a melhora da qualidade da superfície ocular pela instilação de MC-CTM em ratos; e também foi observado melhora da inflamação pelo reestabelecimento da função da barreira corneal¹. Apesar da melhora no GM ser de forma mais lenta, acredita-se que tal fato pode ser explicado pela média de casos mais graves constituindo esse grupo.

O TLS-1, método principal para diagnóstico e comparação de eficácia de tratamento da CCS quantitativa em cães e em humanos, no GT notou-se aumento superior a 5 mm/min de D0 a D60, corroborando com o observado por Berdoulay et al. (2005). Embora o GM não obteve aumento total similar ao GT próximo aos valores de referência para a espécie, foi observada melhora de duas vezes em relação ao valor inicial até o momento final, demonstrando mais uma vez o maior desafio do tratamento para esse grupo.

A limitação deste estudo foi falta de padronização inicial em relação ao grau de severidade da CCS, especialmente para o GM, e está devido-se ao emprego cego do delineamento, entretanto ainda pode-se observar uma resposta favorável do GM, talvez olhos acometidos mais leve e que tivessem menos lesão glandular crônica, poderiam ter respondido com valores mais eficazes. A metodologia utilizada com animais acometidos naturalmente dificulta a padronização total dos grupos, no entanto reflete diretamente o atendimento rotineiro nos ambulatórios de oftalmologia veterinária. Outro ponto, que deve ser estimulado e desenvolvido em estudos futuros é a avaliação do GT com os exames do OSA-VET[®], entretanto devido a desafios técnicos no envio do equipamento, tal análise não foi possível.

Em seres humanos, a avaliação da osmolaridade lacrimal é considerada um dos principais métodos de diagnóstico de CCS, porém em medicina veterinária ainda há falta de padronização e divergência nos valores descritos³¹. Brito et al. (2022)³⁸ observaram uma faixa de 333 a 369 mOsm/L em cães com CCS por método de aferição similar (IPen[®] Vet) ao do presente estudo, superior ao encontrado nos grupos em D0 de 294,11 a 307,22 mOsm/L. No entanto, corroborou aos achados em estudos que observaram diminuição da osmolaridade lacrimal após tratamento da CCS, provavelmente devido diminuição de proteínas inflamatórias na superfície ocular^{32,33}.

O TRFL é um dos parâmetros mais utilizados para avaliação da estabilidade do filme lacrimal e assim como encontrado por Hisey et al. (2023), tanto o TRFL quanto o TRFL-SC em cães com CCS nesse estudo foi inferior a cinco segundos. Os três tratamentos avaliados não apresentaram aumento do TRFL em D60, sugerindo baixa estabilidade na qualidade do filme lacrimal. Outro ponto importante, em humanos, são que os valores normais de meniscometria estão numa faixa de 0,2 a 0,7 mm, sugerindo que valores abaixo de 0,2 mm podem estar relacionados a CCS³⁴. Em cães, sugere-se valores normais de meniscometria entre $0,5 \pm 0,1$ mm²³. Ainda não existem valores de referência para cães portadores de CCS utilizando o OSA-VET[®], porém os resultados corroboram com o sugerido em humanos que valores abaixo dos normais poderiam ser relacionados a CCS. Notou-se aumento do menisco lacrimal após o tratamento em GM, no entanto ainda não atingindo valores dentro da normalidade; no GC, a altura do menisco reduziu de 0,5 para 0,3 mm, sugerindo menor eficiência nesse quesito para o tratamento controle.

Mesmo que em D0 ambos os grupos tratados já apresentassem perda leve (0 - 25%) de glândulas de meibômio, notou-se estabilização nas porcentagens de perda observadas tanto em GM quanto em GC corroborando com o observado por Sheppard et al. (2023), que relataram melhora nas disfunções de glândula de

meibômio com uso de imunomoduladores (ciclosporina A), porém até o momento não foram encontrados trabalhos que utilizassem o concentrado proteico de células tronco mesenquimais focando nesta avaliação. Por outro lado, existem discrepâncias na interpretação dos graus interferométricos do filme lacrimal na literatura, por exemplo, Jeong et al. (2023)³⁶ sugeriram que escores interferométricos mais baixos estariam relacionados a uma camada lipídica anormal do filme lacrimal em cães, contradizendo o exposto por Yokoi et al. (1996)³⁷ que descreveram que escores interferométricos mais altos estariam relacionados a uma camada lipídica mais fina em humanos. Em ambos os grupos tratados nesse estudo, os escores interferométricos foram extremamente baixos (< 15 nm) tanto em D0 quanto em D60, confirmando o observado por Hisey et al. (2023)³ em cães com CCS. Esses achados sugerem que se faz necessária mais consistência na classificação e interpretação da espessura da camada lipídica do filme lacrimal entre estudos e entre espécies.

Apesar de existir apenas um estudo¹³ com indução experimental e avaliação visando a melhora da superfície ocular pela instilação tópica de MC-CTM em ratos, até o presente momento não há ensaios clínicos voltados para seu uso em cães naturalmente acometidos. No estudo citado com a utilização de MC-CTM em ratos com CCS induzida, o produto utilizado foi em sua completa concentração, ou seja, 100% de secretoma instilado, sugerindo que altas concentrações podem promover melhor desempenho clínico e que a concentração de 50% no produto em questão, pode ter sido insuficiente para melhores resultados. No entanto, visando ser um produto comercial, apenas o concentrado proteico isolado seria instável para armazenamento a longo prazo. Isto posto, estimula-se o desenvolvimento de outros produtos para transpor tais desafios.

5 CONCLUSÃO

A utilização adjuvante de MC-CTM para a reparação da superfície ocular em cães com ceratoconjuntivite seca constitui inovadora e promissora abordagem terapêutica, sem ocorrência de efeito adverso tópico.

O tratamento com tacrolimus (GT) aumentou (1,87 vezes) significativamente a produção lacrimal atingindo os valores de referência mínimos em cães durante 60 dias. Nos olhos tratados com meio condicionado (MC-CTM), os valores duplicaram de volume e a osmolaridade reduziu, embora não reflitam diferença significativa e não atingiram valores mínimos. Adicionalmente, o MC-CTM promoveu melhora significativa na meniscometria.

6 CONFLITO DE INTERESSE

A empresa Omics Biotecnologia Animal Ltda., integrando o Projeto Mai Dai, forneceu todos os colírios utilizados durante o experimento.

7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo nº 140812/2021-0) junto a empresa Omics Biotecnologia Animal, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001)

8 REFERÊNCIAS

- 1 Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The Ocular Surface*. 2017 Jul;15(3):276–83.
- 2 Gelatt KN. *Veterinary Ophthalmology*. 6th ed. 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2021.
- 3 Hisey EA, Galor A, Leonard BC. A comparative review of evaporative dry eye disease and meibomian gland dysfunction in dogs and humans. *Veterinary Ophthalmology*. 2023 Apr;26(S1):16–30.
- 4 Mittal R, Patel S, Galor A. Alternative therapies for dry eye disease. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2021 Jul;32(4):348–61.
- 5 Bittencourt MKW, Barros MA, Martins JFP, Vasconcellos JPC, Morais BP, Pompeia C, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Med*. 2016 Oct;8(3):63–77.
- 6 Villatoro AJ, Fernández V, Claros S, Rico-Llanos GA, Becerra J, Andrades JA. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *BioMed Research International*. 2015;2015:1–10.
- 7 Joseph A, Baiju I, Bhat IA, Pandey S, Bharti M, Verma M, et al.

- Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. *J Cell Physiol.* 2020 Jul;235(7–8):5555–69.
- 8 Im GB, Kim YH, Kim YJ, Kim SW, Jung E, Jeong GJ, et al. Enhancing the Wound Healing Effect of Conditioned Medium Collected from Mesenchymal Stem Cells with High Passage Number Using Bioreducible Nanoparticles. *IJMS.* 2019 Sep 28;20(19):4835.
 - 9 Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells.* 2019 May 16;8(5):467.
 - 10 Ansari MM. Therapeutic Potential of Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and its Conditioned Media in Diabetic Rat Wound Healing. *J Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jul 23];3(3). Available from: <https://www.omicsonline.org/therapeutic-potential-of-canine-bone-marrow-derived-mesenchymal-stem-cells-and-its-conditioned-media-in-diabetic-rat-wound-healing-2157-7633.1000141.php?aid=15946>
 - 11 Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Trevino M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal Epithelial Wound Healing and Bactericidal Effect of Conditioned Medium From Human Uterine Cervical Stem Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2015 Feb 11;56(2):983–92.
 - 12 Sendon-Lago J, Seoane S, Martinez-Ordoñez A, Eiro N, Saa J, Vizoso FJ, et al. Corneal regeneration by conditioned medium of human uterine cervical stem cells is mediated by TIMP-1 and TIMP-2. *Experimental Eye Research.* 2019 Mar;180:110–21.
 - 13 Imaizumi T, Hayashi R, Kudo Y, Li X, Yamaguchi K, Shibata S, et al. Ocular instillation of conditioned medium from mesenchymal stem cells is effective for dry eye syndrome by improving corneal barrier function. *Sci Rep.* 2023 Aug 11;13(1):13100.
 - 14 Voitena JN, Cunha O, Fukushima FB, Carvalho GF, Ramos LCS, Henriques VC, et al. Eficácia dos colírios ciclosporina e tacrolimo no

- tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2018 Jun;70(3):699– 703.
- 15 Merlini NB, Fonzar JF, Perches CS, Sereno MG, Souza VL, Estanislau CA, et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2014 Dec;66(6):1742–50.
- 16 Nascimento FF, Passareli JVGC, Zulim LFDC, Silva DA, Giuffrida R, Estanho GJG, et al. Comparison of strip meniscometry and Schirmer tear test results and tear film breakup time between healthy dogs and dogs with dry eye disease. *ABO [Internet].* 2023 [cited 2023 Aug 1];86(4). Available from: <http://aboonline.org.br/details/6326/en-US/comparison-of-strip-meniscometry-and-schirmer-tear-test-results-and-tear-film-breakup-time-between-healthy-dogs-and-dogs-with-dry-eye-disease>
- 17 Kontiola AI. A new induction-based impact method for measuring intraocular pressure. *Acta Ophthalmologica Scandinavica.* 2000 Apr;78(2):142–5.
- 18 Kitamura Y, Maehara S, Nakade T, Miwa Y, Arita R, Iwashita H, et al. Assessment of meibomian gland morphology by noncontact infrared meibography in Shih Tzu dogs with or without keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol.* 2019 Nov;22(6):744–50.
- 19 Viñas M, Maggio F, D’Anna N, Rabozzi R, Peruccio C. Meibomian gland dysfunction (MGD), as diagnosed by non-contact infrared Meibography, in dogs with ocular surface disorders (OSD): a retrospective study. *BMC Vet Res.* 2019 Dec;15(1):443.
- 20 Wise RJ, Sobel RK, Allen RC. Meibography: A review of techniques and technologies. *Saudi Journal of Ophthalmology.* 2012 Oct;26(4):349–56.
- 21 Kim Y, Kang S, Kim S, Shim J, Go S, Seo K. Reference values for selected dry eye tests in normal Beagle dogs: a pilot study. *J Vet Sci.* 2022 Jan;23(1):e10.
- 22 Sridhar U, Tripathy K. Corneal Topography. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Aug 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585055/>

- 23 Peruccio C, Caruso K, Reynolds B, Smith J, Whittaker C, Allgoewer I, et al. Clinical Atlas - Ocular Surface Analyser, Veterinary Setting, for the Diagnosis of Dry Eye with O.S.A.-VET. Claudio Peruccio. Italy; 2020. 114 p. (1; vol. 1).
- 24 Saito A, Kotani T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Veterinary Ophthalmology*. 2001 Mar;4(1):7–11.
- 25 Hartley C, Williams DL, Adams VJ. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Vet Ophthalmol*. 2006 Jan;9(1):53–7.
- 26 Sharma A, Hindman HB. Aging: A Predisposition to Dry Eyes. *Journal of Ophthalmology*. 2014;2014:1–8.
- 27 Aguirre GD, Rubin LF, Harvey CE. Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1971 May 1;158(9):1566–79.
- 28 Kaswan RL, Martin CL, Dawe DL. Keratoconjunctivitis sicca: immunological evaluation of 62 canine cases. *Am J Vet Res*. 1985 Feb;46(2):376–83.
- 29 Kern TJ, Erb HN. Facial neuropathy in dogs and cats: 95 cases (1975-1985). *J Am Vet Med Assoc*. 1987 Dec 15;191(12):1604–9.
- 30 Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, Clayton JA, Ding J, Golebiowski B, et al. TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report. *The Ocular Surface*. 2017 Jul;15(3):284–333.
- 31 Khanal S, Tomlinson A, McFadyen A, Diaper C, Ramaesh K. Dry Eye Diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Apr 1;49(4):1407.
- 32 Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, Benítez Del Castillo JM, Geffen D, Tauber J, et al. Tear Osmolarity in the Diagnosis and Management of Dry Eye Disease. *American Journal of Ophthalmology*. 2011 May;151(5):792-798.e1.
- 33 Warcoin E, Clouzeau C, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. Hyperosmolarité: effets intracellulaires et implication dans la sécheresse oculaire. *Journal Français d'Ophtalmologie*. 2016

Sep;39(7):641–51.

- 34 Doughty MJ, Laiquzzaman M, Oblak E, Button N. The tear (lacrimal) meniscus height in human eyes: a useful clinical measure or an unusable variable sign? *Contact Lens and Anterior Eye*. 2002 Jun;25(2):57–65.
- 35 Sansom J, Barnett KC. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. *J Small Animal Practice*. 1985 Mar;26(3):121
- 36 Jeong D, Kang S, Shim J, Lee E, Jeong Y, Seo K. Evaluation of ocular surface parameters in dogs with and without meibomian gland dysfunction. *Veterinary Record*. 2022 Jul;191(2):e1682.
- 37 Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S. Correlation of Tear Lipid Layer Interference Patterns With the Diagnosis and Severity of Dry Eye. *American Journal of Ophthalmology*. 1996 Dec;122(6):818–24.
- 38 Brito FLDC, Voitena JN, Marinho TOC, Moore BA, Montiani-Ferreira F. Assessment of tear film osmolarity using the IPen® Vet osmometer in Pug and Shih-Tzu dogs with and without keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*. 2022 May;25(3):219-224. doi: 10.1111/vop.12966. Epub 2021 Dec 20. PMID: 34929058.