

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO SUBCONJUNTIVAL DE LIPOSSOMAS  
COM RAPAMICINA E TACROLIMUS TÓPICO  
NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

JOICE FURTADO FONZAR

Botucatu – SP  
Julho 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO SUBCONJUNTIVAL DE LIPOSSOMAS  
COM RAPAMICINA E TACROLIMUS TÓPICO  
NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

JOICE FURTADO FONZAR

Tese apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José  
Joaquim Titton Ranzani

Nome do Autor: Joice Furtado Fonzar

Título: USO SUBCONJUNTIVAL DE LIPOSSOMAS COM RAPAMICINA E TACROLIMUS TÓPICO NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani  
Presidente e Orientador  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Adj. Cláudia Valéria Seullner Brandão  
Membro  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dra. Geórgia Nadalini Rodrigues  
Membro  
Médica Veterinária Autônoma  
Botucatu – SP

Dra. Daniela Nogueira Cremonini  
Membro  
Médica Veterinária na empresa Pet Vision  
São Paulo – SP

Dra. Maria Guadalupe Sereno  
Membro  
Médica Veterinária na empresa Pet Vision  
São Paulo – SP

Dr. João Leandro Vera Chiurciu  
Membro suplente  
Médico Veterinário na empresa Pet Vision  
São Paulo – SP

Prof. Adj. Carlos Alberto Hussni  
Membro suplente  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio  
Membro suplente  
Departamento de Cirurgia  
Universidade de Uberaba – UNIUBE - MG

Data da defesa: 11 de julho de 2014.

À minha família, minha base, meu porto seguro,  
por estarem sempre presentes  
apoiando incondicionalmente a luta por meus sonhos,

Dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto aqui minha sincera gratidão a todas elas, especialmente:

A meus pais, **Helio** e **Luciana**, à minha irmã **Lígia** e à minha linda afilhada **Laura** pelo amor incondicional. Agradeço por todo apoio nas minhas escolhas pessoais e profissionais, obrigada pelo carinho e por fazerem parte de todos os momentos mesmo à distância.

Ao querido **Professor José Joaquim Tilton Ranzani**, ao qual me faltam palavras para agradecer. Obrigada pela convivência e amizade ao longo destes anos; sem sua orientação, ajuda e apoio nada disso seria possível. Agradeço pela confiança, compreensão e por tudo que me ensinou, serei eternamente grata.

Ao querido **Doutor Gustavo Adolfo García Sánchez** pela genialidade de suas ideias, pessoa sem o qual este trabalho não teria acontecido e a quem dedico profunda admiração profissional. Agradeço pela oportunidade, amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

À **Doutora Maria Josefa Bernad Bernad** por tudo que me ensinou de química e farmacologia; agradeço por sua infindável paciência e compreensão, sem sua ajuda este trabalho não teria sido possível.

À **Professora Cláudia Valéria Seullner Brandão** pela oportunidade, amizade e ajuda em todos estes anos. Muito obrigada por tudo.

Às residentes e todos os profissionais do **Hospital Veterinário de Especialidades – OFTALVET** no México por toda a ajuda e por tão gentilmente haverem me recebido em sua “casa”, meu sincero muito obrigada.

Aos colegas do **Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Química da Universidade Nacional Autônoma do México** pela agradável convivência e colaboração neste trabalho.

Às doutorandas **Natalie Bertelis Merlini e Cíntia Sesso Perches** pela amizade e por toda a ajuda profissional.

A todos os colegas do **Serviço de Oftalmologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu** pela amizade, aprendizado diário, convívio agradável e colaboração ao longo destes anos.

Ao **Professor Carlos Roberto Padovani** por sua imprescindível colaboração na análise estatística.

Aos animais utilizados neste trabalho e a todos os meus pacientes, sem os quais eu não teria adquirido os conhecimentos que tenho até o momento.

À minha amada **Shak** por me fazer sorrir todos os dias.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Campus de Botucatu**, agradeço a todos os mestres, funcionários e amigos que colaboraram com minha formação.

Aos funcionários da **pós-graduação da FMVZ, Unesp Campus de Botucatu**, em especial ao **José Roberto de Lalla Júnior e Carlos Pazini Junior** pela ajuda imprescindível para que o Doutorado Sanduíche fosse possível.

Ao **Cnpq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a **Capex** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Idade dos cães estudados em anos.....	35
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos cães estudados segundo a raça.....	35
<b>Tabela 3</b>	Momentos de avaliação e respectivos procedimentos realizados.....	37
<b>Tabela 4</b>	Tempo de tratamento com Tacrolimus e número de cães antes de iniciar a pesquisa.....	38
<b>Tabela 5</b>	Mediana e valores mínimo e máximo do teste lacrimal de Schirmer I e teste lacrimal de Schirmer II segundo momento de avaliação.....	43
<b>Tabela 6</b>	Mediana e valores mínimo e máximo do tempo de ruptura do filme lacrimal segundo momento de avaliação.....	44
<b>Tabela 7</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para clareza do meio Ocular (CMO) segundo momento de avaliação.....	45
<b>Tabela 8</b>	Mediana, valores mínimo e máximo para pálpebras segundo momento de avaliação.....	45
<b>Tabela 9</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para córnea segundo momento de avaliação.....	46
<b>Tabela 10</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para porcentagem de opacidade corneal (%OC) segundo momento de avaliação	46
<b>Tabela 11</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para vascularização corneal (VC) segundo momento de avaliação.....	47
<b>Tabela 12</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para congestão conjuntival (CC) segundo momento de avaliação.....	47
<b>Tabela 13</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para quemose (QC) segundo momento de avaliação.....	48
<b>Tabela 14</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para secreção ocular (SO) segundo momento de avaliação.....	48
<b>Tabela 15</b>	Mediana e valores mínimo e máximo para secreção: cor e consistência (SCC) segundo momento de avaliação.....	49
<b>Tabela 16</b>	Mediana e valores mínimo e máximo das variáveis segundo momento de avaliação.....	49

<b>Tabela 17</b>	Medidas descritivas das notas dos proprietários	
	.....	51

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Lipossomas vazios medindo aproximadamente 90nm na conjuntiva bulbar de coelhos.....	42
<b>Figura 2</b>	Lipossomas contendo Rapamicina medindo aproximadamente 80nm na conjuntiva bulbar de coelhos.....	42
<b>Figura 3</b>	Paciente Schnauzer, 8 anos, sem resposta ao Tacrolimus tópico há mais de um ano: antes e depois do tratamento.....	50
<b>Figura 4</b>	Paciente Pastor Branco, 4 anos, sem resposta ao Tacrolimus tópico há mais de um ano: antes e depois do tratamento...	50
<b>Figura 5</b>	Paciente Buldogue Inglês, 4 anos, sem resposta ao Tacrolimus tópico há 6 meses: antes e depois do tratamento.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCS – ceratoconjuntivite seca canina  
APC – célula apresentadora de antígeno  
MHC – complexo de histocompatibilidade maior  
IL – interleucina  
Th – T *helper*  
IFN gama – interferon gama  
TNF – fator de necrose tumoral  
VEGF – fator de crescimento vascular endotelial  
VEGFr – receptor de fator de crescimento vascular endotelial  
TSP – tromboespondina  
TIMP – inibidores de metaloproteinases  
TGF – fator de crescimento transformador  
TLS – teste lacrimal de Schirmer  
CsA – ciclosporina A  
FK506 – tacrolimus  
TLR – *toll-like receptors*  
TRFL – tempo de ruptura do filme lacrimal  
mTOR – *mammalian target of rapamycin*  
FDA – *U.S Food and Drug Administration*  
ULV – univesicular  
MLV - multivesicular

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1. Anatomia e fisiologia do filme lacrimal.....	05
2.2. Conceitos de imunologia básica.....	07
2.3. Imunologia da superfície ocular.....	09
2.4. Ceratoconjuntivite seca.....	11
2.4.1. Cães.....	11
2.4.2. Humanos.....	12
2.5. Prevalência da CCS.....	13
2.6. Imunopatologia na CCS.....	14
2.6.1. Hormônios.....	17
2.7. Diagnóstico da CCS.....	18
2.8. Tratamento.....	20
2.8.1. Ciclosporina A.....	22
2.8.2. Tacrolimus.....	23
2.8.3. Rapamicina.....	24
2.9. Medicação em oftalmologia – dificuldades e novas alternativas... 25	
2.9.1. Nanocarreadores.....	26
2.9.2. Injeção subconjuntival.....	27
2.9.3. Lipossomas.....	28
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Aspectos éticos.....	33
4.2. Medicamentos e materiais utilizados.....	33
4.3. Delineamento experimental.....	33
4.3.1. Fase I – testes em coelhos.....	33
4.3.2. Fase II – tratamento de cães com ceratoconjuntivite seca .....	35
4.4. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Fase I – teste de inflamação ocular em coelhos.....	41
5.2. Fase II – tratamento de cães com ceratoconjuntivite seca.....	43
6. DISCUSSÃO.....	52

7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	69
10. ANEXOS.....	78
10.1. Anexo 1.....	78
10.2. Anexo 2.....	79
10.3. Anexo 3.....	88

FONZAR, J. F. **Uso subconjuntival de lipossomas com Rapamicina e Tacrolimus tópico no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães.** Botucatu, 2014. 88p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o emprego da associação de Tacrolimus tópico com lipossomas contendo Rapamicina, em cães com ceratoconjuntivite seca grave, sem resposta a tratamentos convencionais. Foram estudados 29 olhos com valor de teste lacrimal de Schirmer menor que 5 mm/minuto. Os cães receberam, a cada 15 dias, durante dois meses, injeção subconjuntival de lipossomas com Rapamicina na dose de 0,4mg/ml, sendo mantida a medicação tópica com colírio de Tacrolimus 0,03%. Avaliação ocular completa, utilizando-se do protocolo de McDonald e Shaddock modificado, bem como testes de produção lacrimal Schirmer I e II e tempo de ruptura do filme lacrimal, foram realizados a cada 15 dias. O tratamento empregado não gerou efeitos adversos oculares em nenhum animal estudado. A associação de Tacrolimus tópico com lipossomas contendo Rapamicina foi eficaz na atenuação dos sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca em cães, bem como incrementou a produção lacrimal e a qualidade da lágrima dos animais tratados.

**Palavras chave:** Cão; Ceratoconjuntivite seca; Rapamicina; Tacrolimus.

FONZAR, J. F. **Use of subconjunctivally injected liposome encapsulated Rapamycin and topically administered Tacrolimus for the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs.** Botucatu, 2014. 87p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

The present study aimed to evaluate the use of the association of topical Tacrolimus with liposomes containing Rapamycin in dogs with severe keratoconjunctivitis sicca, non-responsive to conventional treatments. Were studied 29 eyes with Schirmer tear test value of less than 5 mm/min. The dogs received every 15 days a subconjunctival injection of liposomes with Rapamycin at a dose of 0.4 mg/ml for two months. Topical eye drop medication was maintained with 0.03% Tacrolimus. Complete ophthalmologic evaluation using a modified McDonald-Shadduck protocol, as well as Schirmer tear tests I and II and tear film break up time were made every 15 days. The treatment used did not cause ocular side effects in any animal studied. The association of topical Tacrolimus with liposomes containing Rapamycin was effective in alleviating the clinical signs of keratoconjunctivitis sicca in dogs, as well as increased tear production and tear film quality of the studied animals.

**Key words:** Dogs; Keratoconjunctivitis sicca; Rapamycin; Tacrolimus.

## 1. INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença inflamatória crônica comum em cães, resultante de deficiência do filme lacrimal pré corneal. Ela pode ocorrer como uma deficiência quantitativa do componente aquoso da lágrima, bem como uma deficiência qualitativa dos componentes lipídico ou mucínico do filme lacrimal, gerando instabilidade desse filme (GUM et al., 2007).

Clinicamente, a CCS caracteriza-se por secreção ocular mucóide, hiperemia conjuntival, blefaroespasma, úlcera corneal recorrente, vascularização corneal e, em casos avançados, pigmentação corneal. Cegueira ou déficit de visão do olho afetado provavelmente resultam da densa opacificação e pigmentação ou ainda de perfuração corneal secundária a uma ulceração profunda da córnea (GUM et al., 2007).

O tratamento para CCS inclui uso de antiinflamatórios, antibióticos, substitutos da lágrima artificiais e estimulantes da produção natural de lágrima (Ciclosporina A, Tacrolimus, Sirolimus). Apesar de todas essas terapias serem benéficas, a estimulação da produção lacrimal com uso de imunomoduladores tem se mostrado a alternativa mais eficaz na melhora dos sinais clínicos e prevenção da perda da visão (GRAHN e STOREY, 2004).

Tacrolimus (FK506) é um antibiótico macrolídeo isolado da fermentação do *Streptomyces tsukubaensis*. A molécula liga-se a uma proteína citosólica específica, a proteína de ligação FK (FKBP), formando um complexo que inibe a expressão da fase inicial de ativação de células T, inibindo a resposta imune mediada por células T (WHITLEY e DAY, 2011).

Rapamicina ou Sirolimus é também um antibiótico macrolídeo isolado da fermentação do *Streptomyces hygroscopicus*, há mais de uma década de uma amostra de solo em Easter Island (Rapa Nui). Apesar de ser um potente antifúngico, a Rapamicina vem sendo estudada também por suas propriedades antitumorais e imunossupressoras (SEN et al., 2012).

Apesar da estrutura da Rapamicina ser muito semelhante à do Tacrolimus e os dois componentes compartilharem da mesma proteína de ligação (FKBP), seus mecanismos de ação molecular são diferentes. O Tacrolimus inibe a fase inicial de ativação das células T, enquanto que a Rapamicina

inibe uma fase tardia. Sendo assim, quando utiliza-se Rapamicina conjuntamente com Tacrolimus é esperado um efeito sinérgico, potencializando a ação de ambos os fármacos. Com a associação dos dois princípios a dose necessária a ser utilizada de cada composto diminui (IKEDA et al., 1997).

CCS afeta diretamente a qualidade de vida do paciente, seja ele humano ou animal, pois leva a uma situação de incômodo e irritabilidade constantes. Particularmente em animais, esse quadro é mais severo, pois os sinais são percebidos pelos proprietários em estágios muito avançados da doença, e ainda, a medicação e lubrificação ficam na dependência total e completa do proprietário. Devido à importância dessa afecção na qualidade de vida é imprescindível a compreensão de seus mecanismos patológicos tanto em humanos como em animais, para que novas e efetivas alternativas de tratamento sejam criadas.

O tratamento a base de lubrificantes para olho seco é geralmente limitado devido ao efeito fugaz das lágrimas artificiais aquosas sobre a superfície ocular e, ainda, ao incômodo e distorção visual causados pela administração frequente de pomadas ou géis. A utilização de lipossomas para o tratamento desta afecção, por se tratar de um método de liberação lenta, promove a diminuição da frequência de aplicação de medicamentos, bem como redução da distorção visual (SHENGYAN et al., 2012).

Os tratamentos convencionais para olho seco em cães requerem aplicação frequente de colírios pelos proprietários, o que muitas vezes é incomodo ao animal e inviável a seu dono. Desta forma, o desenvolvimento de um tratamento à base de lipossomas, via subconjuntival, visa à diminuição da frequência de aplicação de medicamentos tópicos. Acrescente-se ainda que, a utilização de Rapamicina/Sirolimus associada ao tratamento convencional com Tacrolimus é uma nova alternativa à estimulação lacrimal em cães, fatos que justificam a realização desta pesquisa.

Até o presente momento, na literatura consultada, não foram encontrados relatos da aplicação da tecnologia lipossomal para o tratamento da ceratoconjuntivite seca canina, bem como não foram encontrados estudos que utilizem o fármaco Rapamicina/Sirolimus associado ao Tacrolimus para tratamento desta enfermidade nos cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Anatomia e Fisiologia do Filme Lacrimal

A produção e a manutenção da lágrima na superfície ocular são importantes, dentre suas principais funções destacam-se a prevenção de infecções bacterianas e virais, a preservação do ambiente homeostático do filme lacrimal e ainda, a promoção de uma superfície óptica regular para refração da luz (STERN et al., 2004a).

Durante muitos anos, o filme lacrimal foi caracterizado por ser formado de três camadas: uma camada mucínica que recobre a superfície corneal; uma camada intermediária aquosa e finalmente, uma camada superficial formada por lipídeos, que atuam reduzindo a evaporação (LAMBERT, 1994).

As mucinas da camada mais interna são formadas nas células de Goblet da conjuntiva, enquanto que a porção lipídica do filme lacrimal é produzida pelas glândulas de Meibômio. A porção aquosa do filme lacrimal nos cães é produzida principalmente pela glândula lacrimal principal, que está localizada dorsolateralmente ao bulbo ocular e também, em menor proporção, pela glândula da terceira pálpebra (GUM et al., 2007).

Mais recentemente, estudos demonstraram que este modelo de camadas bem definidas e delimitadas não está perfeitamente correto. O epitélio corneal possui uma superfície composta por glicocálix formada por mucinas e fatores de crescimento epiteliais. E ainda, a camada intermediária aquosa do filme, longe de ser somente composta por água, é preenchida também por mucinas ligadas à membrana, pequenas mucinas solúveis e mucinas maiores formadoras de gel (STERN et al., 2004b).

Admite-se que, para compreender a fisiologia da produção lacrimal, deve-se levar em consideração a interrelação entre as glândulas lacrimais, a superfície ocular e as conexões nervosas que as suprem. Todas essas partes consideradas como um todo é o que se chama de “Unidade Funcional Lacrimal” (STERN et al., 2004a).

Stern et al. (1998) apresentou o conceito “Unidade Funcional Lacrimal” para descrever a relação entre a superfície ocular e as glândulas lacrimais na produção de lágrima normal e também durante a inflamação.

A secreção da glândula lacrimal é controlada por atividade neural e hormonal. A glândula lacrimal apresenta inervação parassimpática e simpática: a via parassimpática é ativada através de um arco reflexo, por nervos sensoriais na córnea e a via simpática é ativada através dos nervos simpáticos, que se originam no núcleo motor parassimpático do nervo facial, mas que viajam com o nervo trigêmeo até a glândula lacrimal (GUM et al., 2007).

Um estímulo às terminações nervosas da córnea resulta na geração de impulsos aferentes pelo ramo do nervo trigêmeo. O impulso é transmitido pelas células do gânglio do trigêmeo e faz sinapse no cérebro, que envia o impulso eferente através do gânglio pterigopalatino e então para as glândulas lacrimais (STERN et al., 1998).

Alguns trabalhos citam a hipótese de que o impulso nervoso que estimula a produção das células de Goblet e as glândulas de Meibômio também percorre essa rota (DIEBOLD et al., 2001; LEDOUX et al., 2001). Dessa forma, pode-se compreender que os três principais componentes do filme lacrimal são secretados para a superfície ocular em um sistema coordenado e controlado entre si (WILLIAMS, 2008).

Alguns neurotransmissores também estão envolvidos nesse processo, tais como acetilcolina, peptídeo intestinal vasoativo, substância P, noradrenalina e calcitonina, porém sabe-se que a acetilcolina e a noradrenalina destacam-se por serem os mais potentes estimuladores na produção de água e eletrólitos nas lágrimas (LAMBERT, 1994).

O controle hormonal realizado pelo eixo hipotálamo-pituitário gonadal tem um efeito profundo na secreção lacrimal, com participação de diferentes hormônios; hormônio adrenocorticotrófico, hormônio estimulador alfa melanocítico, prolactina, andrógenos, estrógenos e progestágenos, todos influenciando a função da glândula lacrimal (LAMBERT, 1994). Dentre todos, destacam-se os hormônios andrógenos, que apresentam papel importante na produção lacrimal, com efeitos relacionados ao sexo e idade, que serão discutidos mais adiante (WILLIAMS, 2008).

## 2.2. Conceitos de imunologia básica

Para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos que estão envolvidos na superfície ocular e ainda, para posteriormente, compreender o tratamento objetivado pelo estudo em questão, faz-se necessária a revisão de alguns conceitos de imunologia básica.

Imunidade inata é aquela baseada na resposta fagocitária como primeira linha de defesa em uma enfermidade. Há fagocitose do patógeno e consequente liberação de citocinas, que irão determinar o comportamento de outras células do sistema imune. Este tipo de imunidade ocorre minutos a horas após o dano e é visto clinicamente com sinais de inflamação aguda: vermelhidão, dor, inchaço, calor, podendo ocorrer ainda perda da função do tecido afetado. Outras características importantes são vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que permitem a chegada de células imunes ao sítio de infecção (TIZARD, 2002).

Imunidade adaptativa é o tipo de resposta imune que depende do encontro entre um antígeno patológico e uma célula apresentadora de antígeno (APC) circulante. APCs, como o próprio nome diz, são especializadas em capturar e processar antígenos, apresentando-os aos linfócitos T, promovendo assim estímulo à diferenciação e proliferação desse tipo celular (TIZARD, 2002).

Essas APCs, carregando o antígeno, migram do tecido afetado a um linfonodo regional para ativar e estimular produção de linfócitos. Esses linfócitos viajam até o sítio de infecção para combater o patógeno e podem ainda liberar citocinas, que direcionam outras células imunes para combater este patógeno. São necessários mais de sete dias para que haja uma população suficiente e específica de linfócitos e outras células imunes para combater o agente (TIZARD, 2002).

Sendo assim, a resposta imune vai depender da ativação e diferenciação dos linfócitos T, que serão discutidos a seguir. Para que ocorra a ativação das células T há dois sinais distintos que devem ocorrer: o primeiro é realizado através de reconhecimento do antígeno e o segundo através de receptores acessórios de ativação (TIZARD, 2002; BIROS, 2007).

No primeiro sinal há a participação de duas classes de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) que estão presentes na superfície das APCs e são importantes na apresentação do antígeno processado aos receptores de células T: MHC I, que apresenta antígenos intracelulares e MHC II, que apresenta antígenos exógenos, como de bactérias e fungos por exemplo (TIZARD 2002; BIROS, 2007).

Cada indivíduo possui uma variedade enorme de receptores de células T, sendo que cada célula T também é capaz de reconhecer uma variedade enorme de antígenos. No entanto, uma célula T só pode se ligar ao antígeno processado, no contexto de MHC de um mesmo indivíduo. Receptores CD8 e CD4 também se ligam a MHC I e MHC II, respectivamente. Linfócitos CD8 e CD4 contribuem para o primeiro sinal de ativação das células T (TIZARD, 2002; BIROS, 2007).

Sem o segundo sinal, ou sinal acessório, não há ativação de células T. Esse segundo sinal é importante na ativação de células T jovens e serve para amplificar os sinais intracelulares da interação entre receptores de células T e MHC. Após a formação da ligação da célula T acessória com a APC, há regulação por interleucina 2 (IL-2), que resulta em proliferação e expansão de células T antígeno específicas (TIZARD, 2002; BIROS, 2007).

A partir desses dois sinais é que a diferenciação das células T será iniciada. Existem três fatores que influenciam diretamente a natureza das células T que serão produzidas: a forma de apresentação do antígeno, o tipo de APC e o microambiente em que as células T são ativadas (BIROS, 2007).

Existem cerca de três tipos de células T *helper* (Th) na resposta imune adaptativa: Th-1, Th-2 e Th-3. Elas são definidas pelas citocinas e pelo tipo de resposta efetora que induzem (BIROS, 2007).

Por exemplo, células Th-1 são caracterizadas pela produção de interferon gama (IFN gama), fator de necrose tumoral (TNF) e IL-2. Estão relacionadas com reações de hipersensibilidade, rejeição a tumores e transplantes, podendo ainda ser mediadas por células B. As Th-2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e estão associadas a respostas alérgicas. As Th-3 são menos estudadas, porém caracterizadas por seu potencial em suprimir a resposta imune mediada por Th1 (BIROS, 2007).

O nível de sinal durante a ativação das células T é ditado pela afinidade dos receptores de células T com o MHC; assim, alta afinidade leva à resposta por Th-1 e baixa afinidade leva à resposta por Th-2 ou Th-3 (BIROS, 2007).

Quando os patógenos já foram combatidos ou quando já não há necessidade de resposta por células T é imperativo que essa resposta seja interrompida para não haver inflamação ou danos desnecessários. Ao terminar a imunidade adaptativa, reestabelece-se a homeostase, o privilégio imunológico e um ambiente que promove a auto-tolerância (BIROS, 2007).

### **2.3. Imunologia da Superfície Ocular**

O termo superfície ocular foi introduzido em 1977 para descrever a regeneração do epitélio corneal e ressaltar a importância da relação entre o filme lacrimal, a córnea e a conjuntiva. Estudos mais recentes consideram a superfície ocular não somente uma parte da “Unidade Funcional Lacrimal”, como também uma unidade imunológica com a habilidade de responder a estímulos internos e externos (BARABINO et al., 2012).

A córnea normalmente transparente é desprovida de vasos linfáticos e sanguíneos, uma característica chamada de “privilégio angiogênico corneal”. Essa característica tem implicação importante no “privilégio imune corneal” por retardar o transporte de APCs para o compartimento linfóide (devido à ausência dos vasos linfáticos), bem como limitar as células efetoras que chegam à córnea (KUCHLE et al., 2002).

Estudos recentes sugerem que a manutenção desse privilégio imune não é um processo passivo, mas sim ativo que envolve equilíbrio entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos no epitélio corneal (ELLENBERG et al., 2010).

A córnea normal expressa receptores de fator de crescimento vascular endotelial (VEGFr-1) que atuam como armadilha aos fatores de crescimento vascular endotelial endógeno (VEGF), que são potentes estimuladores da angiogênese (AMBATI et al., 2007). Como resultado, tanto a hemangiogênese como a linfangiogênese são inibidas, contribuindo para a imunidade da superfície ocular.

Outros fatores antiangiogênicos expressados pela córnea são a trombospondina (TSP1), o receptor antagonista da interleucina 1 (IL-1ra) e ainda, os inibidores de metaloproteinases (TIMPs), que também são capazes de inibir neovascularização corneal (BARABINO et al., 2012).

Adicionalmente a este mecanismo inato único da córnea, a superfície ocular também usa uma série de mecanismos para modular e suprimir a resposta imune inflamatória, o que inclui células efetoras e algumas moléculas (BARABINO et al., 2012).

A predominância de APCs (estromal e epitelial) está na periferia da córnea e limbo e, em menor quantidade na área central. Essas células apresentadoras de antígeno imaturas são caracterizadas por apresentarem baixa expressão MHC II, o que contribui para a tolerância de células T, mas quando há um insulto à superfície ocular, essas mesmas APCs, induzidas por citocinas inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) são capazes de adquirir MHC II e moléculas estimulatórias (BARABINO et al., 2012).

No entanto, há vários outros mecanismos que tentam controlar esse processo antagonizando o efeito das citocinas. Dentre eles pode-se citar o fator de crescimento transformador beta (TGF-beta), que é encontrado na lágrima humana e apresenta efeito supressor à maturação das APCs, ou ainda, o receptor antagonista da interleucina 1 (IL-1ra), que atenua os efeitos da IL-1, e também o peptídeo vasoativo intestinal, que é secretado pelas terminações nervosas na córnea e regula a expressão de citocinas pro inflamatórias como a IL-1 e TNF-alfa, estimulando ainda citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF-beta (MOTTERLE et al., 2006).

APCs migram através dos compartimentos linfóides e ativam células T, que vão para a superfície ocular. Há fortes evidências que células T reguladoras como CD4+ e CD25+, induzidas pela presença de IL-2 e TGF-beta, atuam no centro da modulação para limitar os danos imunes da células T reativas (SHEVACH, 2006).

Células T CD8+ são conhecidas por serem a população de células T predominante no epitélio conjuntival humano. Em pacientes com olho seco tratados com dexametasona tópica observou-se aumento dessas células

reguladoras, no entanto sua importância na imunopatologia da superfície ocular ainda permanece desconhecida (REINOSO et al., 2011).

Mais recentemente, vêm-se estudando outros mecanismos que limitam os efeitos das células T reativas na superfície ocular, tais como PD-L, expressado pelas células epiteliais e endoteliais da córnea, que inibiria a proliferação de células T e produção de citocinas e também FasL, expressado pelo epitélio e endotélio corneal, com capacidade de gerar apoptose de células T reativas, diminuindo a inflamação da superfície ocular (EL ANNAN et al., 2010).

## **2.4. Ceratoconjuntivite Seca**

### **2.4.1. Cães**

Ceratoconjuntivite Seca (CCS), mais comumente conhecida por olho seco, é uma condição inflamatória da superfície ocular causada pela redução patológica do componente aquoso do filme lacrimal, que leva à lesão da córnea. É comum no cão e diagnosticada por teste lacrimal de Schirmer (TLS) I com medida menor que 10mm/min concomitantemente com sinais clínicos patológicos da superfície ocular (WILLIAMS, 2008). Já Kaswan e Salisbury (1989) consideram como portadores de olho seco cães com valor de TLS I abaixo de 15mm/min.

A CCS canina pode ser classificada em 2 tipos: no primeiro a produção lacrimal é deficiente e, no segundo, a evaporação devido à baixa qualidade da lágrima é a responsável pela deficiência do filme lacrimal. No cão, esse último tipo é visto em animais braquicefálicos, que apresentam lagoftalmia, o que leva a uma falha do fechamento palpebral completo, gerando uma área central de deficiência do filme lacrimal; ou ainda, em cães que apresentam deficiência do componente lipídico do filme lacrimal, o que gera aumento da evaporação desse filme (WILLIAMS, 2008).

A CCS pode ter uma única causa ou diversas causas associadas; dentre as possíveis causas em cães pode-se citar: predisposição genética de certas raças; induzida por drogas como anestesia geral, atropina, sulfonamidas; de causa congênita, como por exemplo a alacrimia, que geralmente acomete

raças miniatura e é unilateral; iatrogênica por remoção da glândula da terceira pálpebra; infecciosas, por exemplo na cinomose canina; traumática ou ainda por desordem metabólica, como por exemplo diabetes melitus, hiperadrenocorticism e hipotireoidismo (GIULIANO e MOORE, 2007; WILLIAMS et al., 2007).

O avançar da idade também está diretamente relacionado com diminuição do lacrimejamento. Em filhotes de cães está descrito que a idade, o peso e o sexo dos animais afetam diretamente o valor do Teste Lacrimal de Schirmer, sendo que a partir da 9ª ou 10ª semana de vida esses cães passam a apresentar valores normais, como de adultos (BROADWATER et al., 2010).

#### **2.4.2. Humanos**

Em humanos olho seco é definido como “uma desordem multifatorial das lágrimas e superfície ocular que resulta em sinais de desconforto, visão prejudicada e instabilidade do filme lacrimal, com potencial dano à superfície ocular, acompanhada pelo aumento da osmolaridade do filme lacrimal e inflamação da superfície ocular” (INTERNATIONAL DRY EYE WORKSHOP, 2007).

Em humanos a CCS é também dividida em dois tipos:

- ✓ Olho seco evaporativo: em que a produção de lágrima está normal, porém a superfície ocular não está adequadamente lubrificada. Entre as causas mais comuns está disfunção das glândulas de Meibômio, alterações palpebrais, baixo ritmo de piscar e deficiência de vitamina A (INTERNATIONAL DRY EYE WORKSHOP, 2007).
- ✓ Olho seco por deficiência do componente aquoso: que é caracterizado por redução da secreção e volume lacrimal devido a uma falha funcional da glândula lacrimal. Este pode ser dividido em duas subclasses em humanos: Olho seco por Síndrome de Sjögren ou Olho seco não Sjögren (BARABINO et al., 2012).

Síndrome de Sjögren é uma exocrinopatia em que as glândulas lacrimal, salivar e potencialmente outras glândulas e órgãos sofrem um processo

autoimune, associado a outros sinais sistêmicos como artrite reumatóide. Atualmente, a causa da apoptose do tecido epitelial glandular e infiltração de linfócitos CD4+ nas glândulas lacrimais na Síndrome de Sjögren vem sendo atribuída a infecções virais tais como *Epstein Barr* vírus, vírus da hepatite C e vírus tipo I da leucemia de células T (BARABINO et al., 2012).

Olho seco não Sjögren está relacionado a uma disfunção da glândula lacrimal sem sinais aparentes de afecção imunomediada sistêmica. Em humanos ainda, entre as causas mais comuns estão a baixa de lágrima relacionada à idade, onde há diminuição da secreção e volume lacrimal, bem como aumento da osmolaridade e instabilidade do filme lacrimal com alterações na composição dos lipídeos secretados pelas glândulas de Meibômio (SULLIVAN et al., 2006).

Outras causas comuns seriam uso de drogas sistêmicas que diminuem a produção lacrimal, hormônios sexuais, baixa umidade do ar, ambientes com ventiladores e ar condicionado, que aumentam a evaporação da lágrima, uso crônico de colírios, uso de lentes de contato e cirurgias refrativas (BATTAT et al., 2001).

## **2.5. Prevalência da CCS**

Em humanos estima-se que, apenas nos Estados Unidos, aproximadamente 5 milhões de pessoas com 50 anos ou mais sofrem com olho seco (BARABINO et al., 2012).

O primeiro levantamento da prevalência de olho seco na população canina foi realizado em uma população de cães de uma Universidade dos Estados Unidos em 1976 e sugeriu uma prevalência de 0,4% de animais afetados. Em 1998, também nos Estados Unidos foi documentada uma prevalência de 35% em uma população de 460 cães (WILLIAMS, 2008).

Williams (2008) cita ainda um trabalho mais recente, porém não publicado, onde os autores estudaram a prevalência da CCS em uma população canina nos Estados Unidos de 1000 cães, sendo que 4% apresentaram TLS menor que 10mm/min.

No Brasil, Andrade e Laus (1997) relataram uma prevalência da enfermidade em cães entre 11 a 14,5%.

## 2.6. Imunopatologia na CCS

A Ceratoconjuntivite Seca canina é, sem dúvida, uma enfermidade comum e provavelmente uma condição pouco reconhecida na rotina clínica veterinária. Seu tratamento vem sendo revolucionado nos últimos 15 anos após a introdução dos imunomoduladores, tais como Ciclosporina A (CsA) e Tacrolimus (FK506), o que sugere uma origem imunomediada para a enfermidade, no entanto sua etiopatogenia ainda não é completamente entendida (WILLIAMS, 2008).

A quantidade normal de filme lacrimal e seus constituintes antiinflamatórios reparam e previnem os danos causados pela exposição da superfície ocular aos agentes ambientais, tais como vento, baixa umidade do ar, piscadas ou exposição dos olhos a bactérias e vírus (STERN et al., 1998).

Uma diminuição na produção de lágrima e conseqüentemente uma diminuição na lubrificação da superfície ocular expõe a córnea aos riscos dos danos provocados pelos fatores ambientais. Em pacientes com CCS, um estado de inflamação crônica surge desse ambiente seco adverso, o qual resulta em secreção de citocinas inflamatórias pelas glândulas lacrimais e superfície ocular. Com a progressão da CCS, há maior diminuição da produção de lágrima devido aos infiltrados linfocíticos e a secreção de citocinas, com eventual destruição ou disfunção das glândulas lacrimais, além de poder haver perda do reflexo nervoso ao estímulo para produção da lágrima (STERN et al., 2004a).

A perda desse reflexo nervoso ocorre porque a secreção de citocinas e células inflamatórias pelas células epiteliais e/ou infiltrados linfocíticos impedem a transmissão neural direta ou indiretamente; esse processo é chamado de inflamação neurogênica (STERN et al., 2004a).

Williams (2008) relata que os primeiros estudos sobre a etiopatogenia da CCS canina aparecem por volta de 1980 com o Dr. Rene Kaswan, o qual documentou a avaliação histológica de 40 glândulas da terceira pálpebra e 9 glândulas lacrimais principais de 28 cães com CCS por diferentes causas; concluiu que 20% das glândulas da terceira pálpebra e 22% das glândulas lacrimais principais apresentavam tecido glandular insuficiente.

Izci et al. (2002) mostraram um decréscimo no número de linfócitos CD8 e uma inversão na proporção de linfócitos CD4/CD8, em glândulas da terceira pálpebra de cães com CCS tratados por um mês com Ciclosporina 2%, com melhora dos sinais clínicos concomitante, o que sugere a importância desse tipo de células em cães, assim como em humanos.

Williams (2008) cita um trabalho próprio, porém não publicado onde realizou-se imunohistoquímica de glândulas da terceira pálpebra de nove animais com TLS I normal, seis com CCS idiopática e dois com CCS de origem neurológica. O número de linfócitos CD3 apresentou-se maior nos animais com CCS idiopática e também o número de células T e B foi maior nesse grupo, o que sugere, que o aumento no número de linfócitos T estaria mais relacionado à causa da enfermidade do que como resultado do olho seco, pois caso contrário, estaria elevado também nos animais com problemas neurológicos. Tudo isso leva a pensar em uma causa imunomediada nesses animais idiopáticos.

Em outra tentativa de comprovar uma causa imunomediada a casos de CCS canina, estudou-se por imunofluorescência anticorpos contra antígenos lacrimais em nove cães com CCS idiopática sendo que cinco desses animais apresentaram esses anticorpos. Em 31 animais testados para anticorpos contra tecido ductal da glândula da terceira pálpebra, apenas nove foram positivos. E ainda 67% desses animais apresentavam hipergamaglobulinemia e 16% apresentavam IgA elevada. A relevância desses resultados para compreender a etiologia da CCS canina, no entanto, não é definida, porque é impossível afirmar que tais alterações sejam a causa ou a consequência da enfermidade (KASWAN et al., 1985).

Em animais com Leishmaniose e olho seco concomitante foi feito estudo histopatológico das glândulas lacrimais, resultando que a diminuição da secreção da lágrima se dá devido à infiltração no ducto glandular, o que leva a oclusão do ducto e diminuição do fluxo de saída (NARANJO et al., 2005).

Na CCS, a superfície ocular perde sua homeostase e apresenta graus variados de inflamação caracterizados pela expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, com infiltração de células T reativas (STERN et al., 2010).

Os mecanismos precisos da imunopatogenia da CCS não estão bem estabelecidos, mas o primeiro passo parece se dar com ativação dos componentes imunes inatos. Em muitas doenças autoimunes, resposta imune primária (como a ativação de células *natural killer*) representam um importante papel não somente no direcionamento da resposta, mas também na modulação da resposta imune adaptativa subsequente (WILLIAMS, 2008).

Outra família de imunoproteínas inatas chamada *Toll-like receptors* (TLR) também vem sendo estudada por estar envolvida na inflamação da superfície ocular na CCS. Supõe-se que a apoptose, que ocorre em grande número na CCS, liberaria cromatina e pequenas partículas ribonucleares que ativariam esse tipo de célula e que essas células teriam então, a capacidade de induzir autoimunidade na CCS (YEH et al., 2003).

Em humanos e alguns modelos animais, citocinas pró-inflamatórias encontram-se elevadas em indivíduos com CCS, tais como IL-1 alfa e beta, TNF-alfa, IL-6, IL-23, IFN-gama e IL-17 (KANG et al., 2011).

IL-1 e TNF-alfa são capazes de estimular o recrutamento de leucócitos para a superfície ocular inflamada e ativar essas células para promover adesão de moléculas no epitélio e também expressar MHC classe II nas células apresentadoras de antígeno. A IL-6 está relacionada ao desenvolvimento de células Th17 e ainda há uma estreita correlação entre a presença de IL-6 com a severidade do dano à superfície ocular epitelial, incluindo sinais clínicos, como dor e irritação, como também tintura positiva para fluoresceína e lissamina verde. A IL-23 é essencial para a sobrevivência e proliferação de células Th17 (BARABINO et al., 2012).

Quimiocinas apresentam atividade de quimioatração para leucócitos, tendo a importante função de regular a ativação e tráfico dos linfócitos para a superfície ocular através dos tecidos linfoides. Na CCS, algumas das quimiocinas já estudadas com atividade comprovada em humanos são: CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, CCL20 (BARABINO et al., 2012).

Na superfície ocular com CCS, têm-se um ambiente rico em citocinas e o epitélio conjuntival produz muito MHC classe II, até o presente momento na literatura consultada não está muito bem definida a importância do MHC classe II na patogenia da CCS (BARABINO et al., 2012).

Na CCS há envolvimento de células T reativas devido à contínua inflamação da superfície ocular. O principal mecanismo na promoção de resposta imune seria a apresentação de antígeno pelas APCs. Tanto o epitélio como o estroma corneal possuem APCs imaturas, então supõe-se que o estresse dessecativo na CCS poderia induzir à mobilização e maturação das APCs na superfície ocular, desencadeando a resposta imune (BARABINO et al., 2012).

Há evidências ainda, em estudos com córneas de olho seco de ratos, que há um crescimento exclusivamente de vasos linfáticos e não sanguíneos, que aumentariam seu calibre e área em direção ao centro da córnea com a progressão do olho seco, o que contribui para a migração das APCs (BARABINO et al., 2012).

A compreensão dos mecanismos e mudanças inflamatórias que levam a uma profunda redução da produção lacrimal não é simples. Sugere-se que a citotoxicidade associada aos linfócito do tecido lacrimal é o mecanismo central dos efeitos patológicos na lacrimogênese. Uma segunda hipótese estaria associada à apoptose das células do epitélio glandular, sendo a maior responsável pela hiposecreção da lágrima. A terceira possibilidade estaria associada às citocinas liberadas pelas células inflamatórias que alterariam a produção lacrimal. E finalmente, como última causa pode-se considerar que as células inflamatórias, as citocinas associadas a elas ou então os auto anticorpos podem influenciar a neurotransmissão na glândula lacrimal, inibindo o estímulo neurológico necessário para a secreção lacrimal. Esses mecanismos não são excludentes, assim deve-se pensar na combinação de todos esses diferentes fatores no mecanismo de deficiência da lágrima, tanto em cães como também em humanos (WILLIAMS, 2008).

### **2.6.1. Hormônios**

Dentre os múltiplos fatores envolvidos na etiologia da CCS está a atividade hormonal. Em humanos, em pacientes diagnosticados com CCS, que não apresentam Síndrome de Sjögren, a predominância é de mulheres após menopausa, mulheres gestantes ou ainda mulheres que tomam contraceptivos. A princípio suspeitava-se que o principal hormônio envolvido

seria o estrógeno, no entanto, mulheres após menopausa apresentam níveis diminuídos de estrógeno, enquanto que, mulheres grávidas ou que tomam contraceptivos têm nível elevado de estrógeno (CORCORAN et al., 2010).

A alteração comum a todos os grupos de mulheres afetadas com olho seco seria a diminuição das taxas de hormônios andrógenos, que ocorre com a diminuição da função ovariana em mulheres após menopausa e também com mulheres grávidas e que tomam contraceptivos (CORCORAN et al., 2010).

Os hormônios andrógenos estariam ainda relacionados à atividade das glândulas de Meibômio e também possuem propriedades antiinflamatórias. Krenzer et al. (2000) observaram que pacientes que tomavam medicação anti androgênica apresentaram sinais oculares e sintomatologia de olho seco, com desvitalização do epitélio corneal e diminuição do tempo de ruptura do filme lacrimal.

Zylberberg et al. (2007) demonstraram que o estrógeno regula a produção de metaloproteinases 2 e 9 em glândulas lacrimais de coelhos, além de aumentar a expressão de citocinas inflamatórias como IL-1 beta, IL-6 e IL-8 nas células do epitélio corneal humano. Já os hormônios andrógenos teriam atividade anti-inflamatória reduzindo TNF-alfa e IL-1 beta (CORCORAN et al., 2010).

Em cães, na literatura consultada, não há estudos que comprovem a relação entre a atividade hormonal e a patogenia da CCS.

## **2.7. Diagnóstico da CCS**

A avaliação da reflexão de uma fonte de luz focal sobre a superfície ocular demonstra a integridade do epitélio corneal e do filme lacrimal, sendo importante na avaliação da superfície ocular (OLLIVIER et al., 2007).

O teste padrão para mensuração da lagrima no cão é feito através do Teste Lacrimal de Schirmer, sozinho (TLS I) ou após anestesia tópica (TLS II) (VAN DER WOERDT e ADAMCAK, 2000; OLLIVIER et al., 2007). O teste é realizado utilizando-se tiras comerciais graduadas em milímetros e posicionadas no meio do fórnix conjuntival inferior durante um minuto. Para a

realização do TLS II deve-se instilar colírio anestésico e realizar a secagem do fórnix conjuntival com auxílio de um *swab* (OLLIVIER et al., 2007).

O TLS I, na realidade, acessa a combinação da quantidade de lágrima produzida e o volume no fórnix conjuntival (WILLIAMS, 2005). Consideram-se normais valores acima de 15mm/min; entre 11-14mm/min CCS subclínico; entre 6-10mm/min CCS moderada e abaixo de 5mm/min CCS severa.

Os valores do TLS I, segundo a literatura, variam de  $18.64 \pm 4.47$ mm/min a  $23.90 \pm 2.12$ mm/min (HAMOR et al., 2000; OLLIVIER et al., 2007). Já o TLS II determina o nível de lágrima basal, que em cães e gatos supõe-se ser 50% da volume total (OLLIVIER et al., 2007). Segundo a literatura seus valores são muito mais variáveis e vão de  $3,6 \pm 2.8$ mm/min a  $13.95 \pm 4.40$ mm/min (HAMOR et al., 2000; OLLIVER et al., 2007).

Outros testes que podem ser utilizados em conjunto com o TLS para acessar a lágrima e a integridade do filme lacrimal, promovendo uma maior abrangência de diagnóstico dos distúrbios lacrimais em cães são: tempo de ruptura do filme lacrimal, teste com rosa de bengala, teste com verde de lissamina e avaliação das glândulas de Meibômio (OFRI et al., 2007).

O tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) está sendo cada vez mais utilizado para acessar a combinação de uma produção lacrimal reduzida e aumento da evaporação em um filme lacrimal deficiente (SAITO e KOTANI, 2001). Esse teste avalia a habilidade da superfície corneal em reter uma película lacrimal uniforme. É realizado instilando-se uma gota de fluoresceína tópica no olho e depois mantendo-o aberto manualmente conta-se o tempo desde a última piscada (manual) até o aparecimento do primeiro ponto escuro de evaporação do filme lacrimal. Recomenda-se o auxílio de luz de cobalto para uma melhor visualização. Em cães um TRFL normal apresenta valores acima de 20 segundos, podendo estar abaixo dos 5 segundos em casos de CCS. Moore et al. (1987) referem um valor de aproximadamente 19,5 segundos em cães adultos saudáveis.

Coloração pelo rosa bengala e lissamina verde mostram alterações patológicas da superfície epitelial (SAITO e KOTANI, 1999). Rosa bengala é um derivado da fluoresceína e está disponível comercialmente nas formas de colírio ou tiras de papel. A aplicação com tiras é mais recomendada do que em solução por causar menor irritação. Tanto o rosa bengala como a

lissamina verde coram células epiteliais mortas ou desvitalizadas, especialmente superfícies corneais com deficiência de algum componente do filme lacrimal, no entanto, a lissamina verde vem sendo estudada por apresentar uma menor citotoxicidade às células do epitélio corneal (OLLIVIER et al., 2007).

As glândulas de Meibômio apresentam um papel fundamental provendo lipídios, que reduzem a evaporação da película lacrimal, porém há poucos estudos sobre sua avaliação em cães e nenhum estudo que comprove sua relação com a CCS canina (OFRI et al., 2007).

Sendo assim, o TLS continua sendo um importante critério para julgar uma superfície ocular saudável, sendo as leituras abaixo de 10mm/min consideradas como olho seco. Apesar de sua pobre repetibilidade e inconsistência, o TLS I é o teste padrão de eleição para avaliar a produção lacrimal em cães há mais de 30 anos (BROADWATER et al., 2010). O que acontece na prática clínica veterinária, no entanto, é que este teste não é realizado como rotina, sendo o olho seco portanto somente diagnosticado em casos crônicos. 975647781 D

## **2.8. Tratamento**

Recentes pesquisas sobre a patogenia da CCS levam a uma compreensão diferente de tratamento da enfermidade. A abordagem tradicional baseada no uso de substitutos da lágrima, apesar de ter grande importância na manutenção do equilíbrio fisiológico da superfície ocular, demonstra grandes limitações (WILLIAMS, 2008).

CCS idiopática em cães é considerada uma afecção presumidamente imunomediada que envolve as glândulas lacrimais, sendo os imunomoduladores os fármacos de eleição para seu tratamento (WILLIAMS, 2008). Um fator que sugere fortemente a origem imunomediada de algumas CCS idiopáticas em cães está na resposta positiva ao tratamento com fármacos imunomoduladores. A imunomodulação para afetar ou manipular o sistema imune nos seus pontos críticos pode causar uma mudança na expressão da enfermidade e promover uma estratégia efetiva de tratamento da CCS (GIULIANO e MOORE, 2007).

Ciclosporina A (CsA), Tacrolimus (FK506) e Rapamicina são produtos de origem natural que inibem a ativação de linfócitos. Tacrolimus e Rapamicina são moléculas pequenas que se ligam a receptores citosólicos chamados imunofilinas. Nos linfócitos T, a CsA se liga à ciclofilina, enquanto que FK506 e a Rapamicina se ligam a um receptor distinto, o FKBP (BERTELMANN e PLYER, 2004).

Ciclofilinas são diferentes do FKBP, porém apresentam atividade enzimática semelhante. Tanto o complexo Ciclofilina/Ciclosporina quanto FKBP/Tacrolimus interagem com a calcineurina bloqueando a transcrição de linfocinas. Sem linfocinas, não há IL-2 e a ativação de linfócitos Th é bloqueada, resultando em inibição da ativação de resposta das células T e B (BERTELMANN e PLYER, 2004).

Já a Rapamicina não apresenta efeito na produção de linfocinas, agindo no bloqueio da transdução dos receptores dessa linfocinas, inibindo assim a proliferação de linfócitos T. Tacrolimus e Rapamicina são muito mais potentes que a Ciclosporina na inibição da resposta de células T e B (TIZARD, 2002).

Apesar da estrutura da Rapamicina ser muito semelhante à do Tacrolimus, e os dois componentes compartilharem da mesma proteína de ligação (FKBP), seus mecanismos de ação molecular são muito diferentes. Sendo assim, quando utiliza-se Rapamicina conjuntamente com Tacrolimus obtém-se efeito sinérgico, potencializando a ação de ambas as drogas. Com a associação dos dois princípios a dose necessária a ser utilizada de cada composto diminui (IKEDA et al., 1997).

Gilger et al. (2013) estudaram um derivado semi sintético da CsA, o SCY-641, o qual é um potente inibidor de citocinas e que possui solubilidade em água elevada, o que o coloca em vantagem em relação aos outros imunomoduladores que são altamente insolúveis em água.

A formulação de colírios com substâncias altamente lipofílicas e insolúveis requer o uso de uma base oleosa, o que pode acarretar em algumas desvantagens como dificuldade de aplicação, irritação local e ainda possibilidade de reações alérgicas por conta do veículo oleoso (GILGER et al., 2013).

No estudo de Gilger et al. (2013) concluiu-se que o tratamento tópico com SCY-641 é bem tolerado e apresentou resultados semelhantes na produção lacrimal, quando comparado com outros imunomoduladores.

Os imunomoduladores somente irão agir quando ainda existe algum remanescente de tecido glandular, ou seja, quando a glândula ainda não atingiu um estado avançado de inflamação, senão as alternativa terapêuticas viáveis seriam cirúrgicas, como a tarsorrafia parcial, oclusão do ponto lacrimal, transposição do ducto parotídeo, ou ainda, a transposição de glândulas salivares menores (WILLIAMS, 2008; ANGÉLICO et al., 2011).

Apesar dos efeitos promissores dos imunomoduladores é importante enfatizar as limitações do uso tópico. O tratamento requer meses de continuidade para demonstrar sua eficácia e ainda alguns pacientes demonstram intolerância como ardência e irritabilidade após aplicação, o que faz com que o uso seja descontinuado (BARABINO et al., 2012).

### **2.8.1. Ciclosporina A**

A CsA é um antibiótico macrolídeo que foi isolado a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*. Sua estrutura molecular é constituída por um undecapeptídeo cíclico hidrofóbico. No citoplasma, a CsA liga-se às ciclofilinas. O complexo ciclofilina/CsA bloqueiam a calcineurina induzindo a fosforilação de fatores de transcrição que estão envolvidos na expressão células T, tais como a IL-2 e INF-gama. O efeito do tratamento com CsA é o bloqueio da resposta de Th1 e indução da expressão de MHC classe I (TIZARD, 2002).

A Ciclosporina A (CsA) foi a primeira droga a ser testada via tópica para tratar a CCS canina. Os primeiros trabalhos sugeriam uma concentração para uso oftalmológico de 2% (MORGAN e ABRAHAMS, 1991). Já outros sugeriam 1% (OLIVERO et al., 1991) e a formulação comercial mundialmente conhecida Optimune (Union, New Jersey) apresenta concentração de 0,2%.

CsA é um metabólito fúngico natural que foi extensivamente estudado devido ao seu uso como imunossupressor no controle da rejeição de transplantes de órgãos e no tratamento de enfermidades imunomediadas.

Sua apresentação tópica oftalmológica foi aprovada pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em dezembro de 2002 (BERTELMANN e PLYER, 2004).

Em humanos, já teve sua eficácia tópica em oftalmologia comprovada no alívio de sinais da CCS e atividade antiinflamatória. Apesar dos efeitos adversos da administração de CsA pelas vias oral e endovenosa como nefrotoxicidade e hipertensão, o uso tópico demonstrou baixa absorção sistêmica e nenhum efeito colateral, a não ser uma sensação passageira de queimação após a aplicação, relatada por alguns pacientes (SALL et al., 2000).

Os efeitos imunomodulatórios da CsA ocorrem pela inibição da ativação de células T. Ela atua no citoplasma formando um complexo com a ciclofilina A, que se liga à calcineurina resultando em produção de citocinas. Estudos demonstraram diminuição da IL-6 após seis meses de tratamento tópico com CsA (TURNER et al., 2000).

Outro mecanismo da Ciclosporina A seria a inibição da apoptose, demonstrada em humanos e em células da glândula lacrimal de cães (KASWAN e SALISBURY, 1989).

### **2.8.2. Tacrolimus**

Tacrolimus (FK506) é um antibiótico macrolídeo isolado da fermentação do *Streptomyces tsukubaensis*. A molécula liga-se a uma proteína de ligação citosólica específica, a proteína de ligação FKBP, formando um complexo que inibe a expressão da fase inicial de ativação de células T, inibindo a resposta imune mediada por essas células (WHITLEY e DAY, 2011).

Assim como a CsA, o Tacrolimus é lipofílico, embora após aplicação tópica o nível intraocular atingido pelo Tacrolimus demonstrou ser mais elevado que o atingido pela CsA. Níveis intraoculares podem ser significativamente aumentados por combinação do fármaco com os veículos de transporte, como lipossomas (MOLOKHIA et al., 2013).

Em humanos o uso tópico do FK506 foi considerado benéfico no tratamento de pacientes após ceratoplastia por causa de úlcera de Mooren e também em pacientes que sofrem de conjuntivite atópica, com redução dos sinais clínicos (MOORE, 2004).

Williams (2008) relata que em casos refratários ao efeito lacrimogênico da Ciclosporina 2%, o uso do Tacrolimus apresenta melhora dos sinais clínicos. E Berdoulay et al. (2005) encontraram um efeito lacrimogênico do Tacrolimus mais potente que a Ciclosporina. Moore (2004) refere que a atividade do Tacrolimus *in vitro* é 10 a 100 vezes mais potente que a CsA.

Tacrolimus tópico já foi avaliado em uma série de trabalhos com bons resultados para o tratamento da CCS canina. Uma formulação a 0,03% aplicada duas vezes ao dia demonstrou ser segura e tão eficaz quanto a CsA 2% (GRAHN e STOREY, 2004). Em outro trabalho a concentração de 0,02% também foi capaz de aumentar a secreção lacrimal sem efeitos colaterais em cães (BERDOULAY et al., 2005).

### 2.8.3. Rapamicina

A Rapamicina, também chamada de Sirolimus é um antibiótico macrolídeo cíclico, que tem uma estrutura molecular semelhante ao Tacrolimus. Ela foi isolada a partir do *Streptomyces hygroscopicus*, encontrado pela primeira vez na Ilha de Páscoa (Rapa Nui), fato que deu origem a seu nome (BERTELMANN e PLYER, 2004).

As propriedades imunossupressoras da Rapamicina foram primeiro detectadas por Sehgal em 1977. Rapamicina se liga ao FKBP-13 (proteína 13 de ligação FK), mas não tem efeito sobre o complexo de Calcineurina/Calmodulina (em contraste com a CsA). Além disso, não interfere com a produção de IL-2. No entanto, a Rapamicina inibe algumas proteínas mTOR, cujo nome do inglês é *Mammalian Target of Rapamycin*, que estão associadas com a progressão do ciclo celular na fase G1 (ONYESOM et al., 2013).

Está aprovada pela FDA desde 1999 para a profilaxia contra rejeição de transplantes de órgão em pacientes humanos maiores de 13 anos de idade (GHANBARZADEH et al., 2013). A Rapamicina apresenta pobre solubilidade em água (2.6µg/mL) e alta lipofilicidade ( $\log P_{O/W} = 5.77$ ). Sua biodisponibilidade quando administrada por via oral é baixa, devido à sensibilidade aos ácidos gástricos, absorção intestinal e metabolismo

hepático. A encapsulação do fármaco dentro de nanopartículas, como por exemplo lipossomas, poderia melhorar sua estabilidade (ONYESON et al., 2013).

Em comparação com CsA e Tacrolimus (FK506), a Rapamicina interfere com a progressão do ciclo celular em um estágio posterior e não bloqueia os fatores estimuladores de proliferação (por exemplo, IL-2), mas sim o sinal de proliferação que é induzido por esses fatores (GHRAN e STOREY, 2004).

Rapamicina é reconhecida ainda por suas propriedades anticâncer, sendo capaz de inibir crescimento tumoral e metástase (ONYESOM et al., 2013).

Em oftalmologia a Rapamicina já foi testada na forma de colírio em concentração de 1mg/ml (0,1%) (BUECH et al., 2007). Neste estudo Buech et al. (2007) demonstraram que o colírio de Rapamicina não foi capaz de penetrar a córnea íntegra; conseguindo atingir a concentração terapêutica mínima, que seria 7 a 12 ng/ml, apenas após a remoção completa do epitélio corneal de porcos.

## **2.9. Medicação em Oftalmologia – Dificuldades e Novas Alternativas**

O olho é um órgão pequeno e complexo separado do resto do corpo por múltiplas camadas de barreiras biológicas. As estruturas e tecidos oculares internos estão protegidos do meio externo pelas estreitas junções das células do epitélio corneal e da superfície mucosa. Portanto, o primeiro desafio da administração de drogas em oftalmologia é ultrapassar essas barreiras protetoras, conseguindo atingir os tecidos alvo em uma concentração terapêutica efetiva (SHENGYAN et al., 2012).

O objetivo da administração de medicamentos oftalmológicos é tratar de forma localizada as doenças oculares, sem atividade sistêmica da droga, o que poderia causar efeitos indesejados. (SHENGYAN et al., 2012)

Um sistema ideal de administração de fármacos para o olho deve possuir algumas propriedades importantes, tais como: um perfil de liberação controlado, que mantenha a concentração terapêutica do fármaco durante um período prolongado de tempo, reduzindo assim a frequência de

administração; adaptação e retenção específicas aos tecidos doentes, melhorando a eficiência terapêutica e diminuindo efeitos colaterais; um método de administração eficaz que não gere efeitos colaterais (SHENGYAN et al., 2012).

As dificuldades para administrar medicamentos oftalmológicos começam na anatomia e fisiologia do olho, um órgão que é dividido em segmentos anterior e posterior. A administração tópica na forma de colírios, suspensões ou pomadas são as formas preferidas para tratamento de doenças do segmento anterior, além da facilidade de acesso e baixo custo. No entanto, administração local para a porção anterior do olho via tópica é significativamente limitada por alguns mecanismos da superfície ocular, como lacrimejamento, evaporação e reposição lacrimal constante (ACHOURI et al., 2013).

Adicionalmente, drogas administradas topicamente são absorvidas pela via corneal (córnea - humor aquoso - tecidos intraoculares) ou pela via não corneal (conjuntiva – esclera – coróide - epitélio pigmentar da retina). Devido a todos esses mecanismos e barreiras oculares, menos de 5% do total administrado topicamente atinge o humor aquoso (ACHOURI et al., 2013).

Por exemplo, após administração de uma solução oftalmológica comum contendo 0,05% de ciclosporina para tratar olho seco, mais de 95% da droga atinge a circulação sistêmica via transnasal ou absorção conjuntival (PENG et al., 2011).

### **2.9.1. Nanocarreadores**

Até o presente momento na literatura, nanocarreadores parecem ser uma ferramenta promissora como sistema de administração de fármacos para a superfície ocular (SHENGYAN et al., 2012).

Nanotecnologia é o ramo da ciência que estuda e desenvolve materiais com dimensões entre 1-100nm. O termo “nanotecnologia” começou a ser utilizado em 1974 por pesquisadores japoneses e desde então vem sendo utilizado em diferentes áreas como medicina, farmacologia, química e agricultura. Nas duas últimas décadas inúmeros trabalhos foram publicados relatando o sucesso da aplicação de nanopartículas para tratamentos

inovadores na medicina, o que inclui uma variedade de aplicações que promovem meios muito mais eficientes de disponibilidade dos fármacos aos tecidos (GONZALEZ et al., 2013).

Nanopartículas, por apresentarem um tamanho muito pequeno, apresentam alta difusividade por membranas, tal como o epitélio corneal: um significativo número de trabalhos já demonstraram que o uso tópico de nanomateriais aumenta a permeabilidade corneal de algumas drogas (SHENGYAN et al., 2012).

Avanços no desenvolvimento de sistemas de administração oftalmológica baseados em nanopartículas não servem apenas para o tratamento de doenças da superfície ocular, como também geram novas possibilidades para o tratamento de afecções intraoculares, com acometimento por exemplo da coróide ou retina, usando métodos de administração não invasivos. (SHENGYAN et al., 2012)

Muitos pesquisadores têm desenvolvido diferentes tipos de nanomateriais para administração oftalmológica de fármacos. Os três principais objetivos da medicação ocular com nanocarreadores seriam: aumento da permeabilidade do fármaco; controle dos mecanismos de liberação do fármaco e capacidade de modificar a superfície do nanocarreador para um alvo específico (ACHOURI et al., 2013).

Devido ao tamanho pequeno desses nanocarreadores, a permeabilidade do fármaco aumenta muito, reduzindo a frequência de medicação e reduzindo o custo do tratamento (SHENGYAN et al., 2012).

### **2.9.2. Injeção Subconjuntival**

Atualmente, administração de fármacos pela via periocular vem sendo também investigada como um método pouco invasivo, porém muito eficiente em atingir concentrações intraoculares desejadas (SHENGYAN et al., 2012).

Administração periocular refere-se a injeção da droga na periferia do olho, tal como região subconjuntival, porção subtenoniana ou regiões parabolbares (POZO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

No entanto, administração periocular de fármacos não é livre de efeitos adversos, tais como aumento da pressão intraocular, desenvolvimento de catarata, hifema, estrabismo e descompensação corneal (REGNIER, 2007).

A administração subconjuntival é indicada para condições inflamatórias ou infecciosas da córnea e segmento anterior. Essa via de administração promove níveis terapêuticos do medicamento por 8 a 12 horas após uma única injeção de fármacos solúveis em água e de 2 a 3 semanas para suspensões. É indicada para suplementar a terapia tópica e reduzir a necessidade de medicação frequente (REGNIER, 2007).

Injeção subconjuntival é ainda considerada a menos dolorosa e o mais eficiente meio de administração de fármacos para o segmento posterior (POZO-RODRÍGUEZ et al., 2013)

Geralmente a via subconjuntival é mais útil para a administração de fármacos altamente hidrofílicas ou lipofílicas, que não apresentam boa penetração através do epitélio corneal. Para melhor eficácia sua administração deve ser realizada abaixo da conjuntiva bulbar ou da cápsula de Tenon (POZO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

Apesar da natureza invasiva das injeções perioculares, muitos estudos *in vivo* já demonstraram que nanopartículas administradas por essa via não causaram nenhum sinal de irritação ou resposta inflamatória, porém o uso prolongado de tais medicações deve ser ainda pesquisado (SHENGYAN et al., 2012).

Níveis terapêuticos prolongados foram alcançados após injeção subconjuntival de suspensão de lipossomas contendo diferentes tipos de drogas tais como: 5-Fluorouracil, Ciclosporina, Gentamicina e Tobramicina (MEZEI e MEISNER, 1992).

### **2.9.3. Lipossomas**

Lipossomas são partículas biocompatíveis e biodegradáveis compostas de bicamadas lipídicas, constituídas principalmente por fosfolipídios. A tecnologia lipossomal foi descoberta há mais de 50 anos atrás, no entanto, ainda não é largamente utilizada na indústria farmacêutica (SHENGYAN et al., 2012).

Apresentam uma estrutura esférica oca, formando uma vesícula com uma fase lipofílica (bicamada lipídica) e uma fase hidrofílica (compartimento aquoso). Devido a essa natureza bifásica, os lipossomas podem encapsular tanto agentes terapêuticos hidrofílicos quanto lipofílicos em cada compartimento. Algumas propriedades lipossomais, como por exemplo a carga de sua superfície, podem ser controladas e modificadas variando sua composição lipídica. Uma medicação lipossomal tópica por exemplo, será melhor absorvida pela córnea se apresentar uma carga positiva, do que uma carga negativa ou neutra (MEZEI e MEISNER, 1992).

Estudos recentes, utilizando formulações lipossomais para administração de fármacos em oftalmologia comprovam haver aumento da absorção e maior controle na liberação de medicamentos para o olho. No entanto, os lipossomas ainda enfrentam alguns desafios que merecem ser estudados, como a estabilidade estrutural limitada e a baixa capacidade de armazenamento, devido a natureza complexa de sua estrutura (SHENGYAN et al., 2012.)

Lipossomas são vesículas microscópicas esféricas compostas por folhas circulares de fosfolipídios que envolvem um compartimento aquoso. Os fosfolipídios apresentam uma cabeça hidrofílica polar orientada para o exterior e uma cauda hidrofóbica apolar localizada no interior da membrana. Em solução aquosa se arranjam em camadas, formando vesículas parecidas com células artificiais, que envolvem água e material insolúvel em água em uma esfera de fosfolipídios (MEZEI e MEISNER, 1992).

Como resultado, os lipossomas permitem que substâncias solúveis e insolúveis em água possam ser utilizadas juntas sem adição de surfactantes ou outros emulsificantes (MEZEI e MEISNER, 1992).

Os diferentes tipos de lipossomas que podem ser formados são univesicular (ULV) ou multivesicular (MLV) e, dependendo de sua composição, podem ter carga positiva, negativa ou neutra. Desta forma, lipossomas podem ser personalizados para a maioria das necessidades variando seu conteúdo lipídico, tamanho, carga e método de preparação (MEZEI E MEISNER, 1992).

Os principais componentes lipossomais são lipídeos, água, fármacos e possíveis eletrólitos. Os lipídeos são principalmente fosfolipídeos e colesterol.

A maioria dos lipossomas é preparada utilizando-se lecitina de ovo ou de soja. Em estudos de biocompatibilidade foi demonstrado que a lecitina de soja apresenta os melhores resultados. Colesterol geralmente é incorporado aos lipossomas para conferir estabilidade a membrana e minimizar o escape da droga solúvel encapsulada, no entanto sua inclusão afeta as propriedades vesiculares. Eletrólitos são utilizados para melhorar a formação das camadas lipídicas e promover isotonicidade. Sendo os lipossomas constituídos de substâncias similares a membranas celulares, é esperado que eles sejam preparações biocompatíveis e biodegradáveis (MEZEI e MEISNER, 1992).

Devido à natureza bifásica (água e lipídeos) dos lipossomas, tanto ingredientes lipofílicos quanto hidrofílicos, dependendo da sua solubilidade, podem ser acomodados às vesículas e, com isso, quase qualquer tipo de fármaco pode ser encapsulado. O medicamento ideal para ser encapsulado é aquele que apresenta potente atividade farmacológica e que seja, ou altamente solúvel em água, ou em lipídeos (MEZEI E MEISNER, 1992).

Se o fármaco é solúvel em água, ele será encapsulado dentro do compartimento aquoso e sua concentração no produto lipossomal dependerá do volume de água e da solubilidade do fármaco. Se a fármaco é lipofílico, se encontrará aderido às camadas lipídicas ou dissolvido na fase de lipídeos. Estando o fármaco associado com as camadas lipídicas, ele não sairá facilmente para a fase externa aquosa e por isso geralmente o coeficiente de encapsulação de fármacos lipofílicos é maior que de hidrofílicos (MEZEI e MEISNER, 1992).

As principais vantagens do uso de lipossomas são a redução da frequência de medicação, diminuição da concentração do medicamento, capacidade de ser alvo específico no tecido desejado, o que melhora o índice terapêutico do fármaco e reduz sua toxicidade nos tecidos sadios e, ainda, a habilidade de atingir passivamente o sistema mononuclear fagocitário (MAURER et al., 2001; HUWYLER et al., 2002).

Em farmacologia oftalmológica, os lipossomas são estudados em uma variedade de métodos de aplicação para tratamento de afecções tanto de segmento anterior quanto segmento posterior. Zhao et al. (2009) estudaram a encapsulação da Rapamicina em lipossomas demonstrando ser um método

eficaz de aplicação da droga, capaz de diminuir consideravelmente a vascularização corneal de ratos.

A aplicação tópica é o meio mais conveniente e frequente, mas alguns pesquisadores experimentaram também as vias intravítrea e subconjuntival, com o objetivo de melhorar a penetração dos fármacos pela via ocular (MEZEI e MEISNER, 1992).

Apesar de ser mais vantajosa para o tratamento de doenças do segmento anterior, a administração tópica em oftalmologia encontra alguns obstáculos, como a remoção rápida do medicamento pelo filme pré corneal, a justaposição das células do epitélio corneal, que promovem uma barreira efetiva à penetração da maioria dos agentes farmacológicos e a pouca penetração de substâncias altamente hidrofílicas e hidrofóbicas através do epitélio e estroma corneal (MALHOTRA e MAJUMDAR, 2001; KAUR e SMITHA, 2002).

Com o objetivo de evitar esses problemas a aplicação subconjuntival foi também estudada na forma lipossomal com resultados promissores quanto à penetração e farmacocinética intraocular. O tempo de ação do fármaco na forma de lipossomas aplicado subconjuntival foi consideravelmente prolongado. Estudos em coelhos demonstraram que após 7 dias da aplicação das vesículas lipídicas via subconjuntival foi detectado conteúdo lipossomal em córnea, esclera, retina e coróide, demonstrando que esse tipo de aplicação reduz a necessidade frequente de medicação (HIRNLE et al, 1991).

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como principais objetivos avaliar em cães com Ceratoconjuntivite Seca:

- A ação da associação de Tacrolimus tópico 0,03% com lipossomas contendo Rapamicina na concentração 0,4mg/ml;
- a via subconjuntival para a administração de fármacos no tratamento de cães com ceratoconjuntivite seca canina crônica e grave;
- o efeito do tratamento no Teste Lacrimal de Schirmer I e II, bem como no Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal com a progressão do tratamento.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos

A pesquisa foi conduzida obedecendo-se aos critérios da *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (ARVO 2012) e sob a anuência dos proprietários e aprovação da Câmara de Ética e Experimentação Animal da FMVZ – UNESP – Campus Botucatu, São Paulo, Brasil (Protocolo nº 195/2013).

### 4.2. Medicamentos e materiais utilizados

As soluções contendo lipossomas vazios e lipossomas com Rapamicina foram gentilmente cedidas pelos Laboratórios Santgar no México, em associação com a Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM).

Laboratórios Santgar também forneceram todos os demais colírios e tiras diagnósticas utilizados neste estudo e estão listados Anexo 1.

### 4.3. Delineamento Experimental

#### 4.3.1. Fase I – Testes em coelhos

- **Testes em coelhos utilizando lipossomas sem medicação**

Foram utilizados 8 animais *Oryctolagus cuniculus*, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Nacional Autônoma do México, sendo todas fêmeas jovens. Todos os animais estudados apresentavam-se clinicamente sadios e sem alterações ao exame clínico oftalmológico.

Os 8 coelhos receberam injeção subconjuntival de 0,3ml de uma solução contendo lipossomas vazios no olho esquerdo, servindo o olho direito como controle de cada animal.

Foi aplicada 1 injeção a cada 7 dias, por um período de um mês (4 semanas).

Os animais foram avaliados a cada 3 dias, utilizando-se uma modificação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular (Anexo 2).

Para a aplicação das injeções foi realizada anestesia tópica com colírio de Cloridrato de Proparacaína 0,5% e contenção manual.

- **Testes em coelhos utilizando lipossomas com Rapamicina**

Após encerrado o período de um mês de testes com lipossomas vazios, iniciaram-se os testes com lipossomas contendo Rapamicina na concentração de 0,4mg/ml.

Os mesmos 8 coelhos receberam injeção subconjuntival de 0,3ml de uma solução contendo lipossomas com Rapamicina no olho esquerdo, servindo o olho direito como controle de cada animal.

Foi aplicada 1 injeção, a cada 7 dias, por um período de um mês (4 semanas).

Os animais foram avaliados a cada 3 dias utilizando-se uma modificação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular (Anexo 2).

Após os dois meses de testes, os 8 animais foram mantidos sob observação por mais dois meses.

- **Biópsia Conjuntival**

Foi coletado de 4 animais material conjuntival para análise sob Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).

As coletas ocorreram 7 dias após a aplicação da última injeção subconjuntival, tanto com lipossomas vazios quanto com lipossomas com Rapamicina.

Com contenção manual e colírio de Cloridrato de Proparacaína 0,5% colocou-se um blefarostato infantil. Com uma pinça colibri e uma tesoura de conjuntiva foi retirado da conjuntiva bulbar superior na posição de 11 a 2 horas um fragmento retangular de aproximadamente 1cmx0,5cm; a profundidade do fragmento incluía conjuntiva bulbar e cápsula de Tenon.

O fragmento foi mantido refrigerado em solução de Glutaraldeído e processado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Nacional Autônoma do México.

#### 4.3.2. Fase II – Tratamento de Cães com Ceratoconjuntivite Seca

- **Animais utilizados**

Foram utilizados 29 olhos de 17 animais da espécie canina, sendo 12 machos (3 castrados e 9 não castrados) e 5 fêmeas (2 castradas e 3 não castradas).

Com relação à idade, na Tabela 1 observam-se os valores mínimo e máximo, bem como a mediana, média e desvio padrão dos animais estudados.

**TABELA 1. Idade dos animais estudados em anos.**

	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio padrão
Idade	3	13	7	7,4	2,9

Na Tabela 2 está demonstrado o número de animais de cada raça utilizada no estudo.

**TABELA 2. Distribuição dos cães estudados segundo a raça.**

Raça	Número de animais
Schnauzer	5
Poodle	3
Pastor Alemão	2
Bulldogue Inglês	2
Pastor Branco	1
Basset Hound	1
Maltês	1
Welsh Corgi	1
Lhasa Apso	1

- **Critérios de inclusão para o estudo:**

Todos os animais utilizados foram previamente diagnosticados com Ceratoconjuntivite Seca crônica de causa supostamente imunomediada. A causa imunomediada é sugerida e não comprovada. Os animais que participaram do estudo passaram por uma avaliação geral, na qual foram descartadas causas sistêmicas, endócrinas ou infecciosas.

Além de estarem saudáveis, porém exibindo sinais clínicos oculares, foram selecionados apenas animais que preencheram rigorosamente os critérios abaixo delineados:

- ✓ Teste Lacrimal de Schirmer I menor que 5mm/minuto, em um ou ambos os olhos;
- ✓ Sinais clínicos de olho seco crônico como: secreção ocular intermitente, desconforto ocular, blefarospasmo, decréscimo de visão, opacidade, vascularização ou pigmentação corneal;
- ✓ Cães submetidos a tratamento para olho seco com Tacrolimus 0,03% tópico por um período mínimo de quatro meses, sem resposta<sup>1</sup>;
- ✓ Cães dóceis e proprietário comprometido a realizar corretamente o tratamento, bem como comparecer a todos os retornos.

- **Sequência experimental**

Os animais foram selecionados no Hospital Veterinário de Especialidades OFTALVET na Cidade do México, México.

Após inclusão dos animais nos pré-requisitos da pesquisa e concordância dos respectivos proprietários, iniciou-se o tratamento com lipossomas.

---

<sup>1</sup> Nota: entende-se por “sem resposta” o tratamento que não alcançou regressão dos sinais clínicos e tampouco revelou aumento dos valores do Teste Lacrimal de Schirmer I.

Em todos os momentos de avaliação foi utilizado uma modificação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular (Anexo 2).

Os animais receberam a cada 15 dias, 0,15ml de uma injeção subconjuntival (SC) de lipossomas contendo Rapamicina na concentração 0,4mg/ml e continuaram o tratamento tópico prévio que incluía Tacrolimus 0,03% tópico, três vezes ao dia.

Para realização das injeções utilizou-se colírio anestésico tópico de Cloridrato de Proparacaína 0,5% e contenção manual.

Todos os animais selecionados estavam e continuaram sendo tratados com colírio lubrificante de Hialuronato de Sódio 0,1% e com colírio de Tacrolimus a 0,03% três vezes ao dia cada, protocolo de tratamento para olho seco do Hospital cedente dos cães.

Na Tabela 3 encontram-se descritos os momentos de avaliação.

**TABELA 3. Momentos de avaliação e respectivos procedimentos realizados.**

<b>Momento</b>	<b>Procedimento</b>
<b>M1</b>	Avaliação prévia -1ª injeção SC
<b>M2</b>	Avaliação 15 dias após primeira injeção -2ª injeção SC
<b>M3</b>	Avaliação 15 dias após segunda injeção -3ª injeção SC
<b>M4</b>	Avaliação 15 dias após terceira injeção -4ª injeção SC
<b>M5</b>	Avaliação 15 dias após quarta injeção

Na Tabela 4 observa-se o tempo de tratamento antes de iniciar o estudo e o número de animais.

**TABELA 4. Tempo de tratamento com Tacrolimus e número de cães antes de iniciar a pesquisa.**

Tempo de Tratamento	Número de cães
Acima de 1 ano	10
6 meses a 1 ano	4
4 a 6 meses	3

O período total de tratamento para cada cão foi de 60 dias, correspondendo a 4 injeções recebidas, com 5 momentos de avaliação.

Nos dias de avaliação, os proprietários foram orientados a não limpar e não instilar qualquer colírio, estando os animais há no mínimo, 8 horas sem qualquer medicamento.

Todos os animais foram avaliados e injetados pelo mesmo pesquisador, com a ajuda de diferentes auxiliares.

Ao chegarem ao consultório, os animais foram posicionados na mesa e imediatamente tomavam-se dois tipos de fotos, sendo uma à distância (de rosto inteiro) com uma câmera digital Canon SX50 e outra mais próxima (córnea e superfície ocular) com uma Câmera de Retina Digital Portátil Kowa modelo Genesis-D.

Ato contínuo realizava-se o Teste Lacrimal de Schirmer I, cuja tira era posicionada no saco conjuntival inferior, durante um minuto.

Procedia-se então a instilação de uma gota do colírio anestésico Proparacaína, cujo excesso do saco conjuntival era retirado com o auxílio de um *swab* estéril; colocava-se outra tira do Teste Lacrimal de Schirmer para mensurar o TLS II, também posicionado no saco conjuntival inferior por um minuto.

Após isso, colocava-se uma gota de solução fisiológica 0,9% em uma tira de Fluoresceína, essa tira era então posicionada na conjuntiva bulbar superior, tocando-a levemente. Com o auxílio de lâmpada de fenda portátil Kowa modelo SL-15 com filtro azul de cobalto em iluminação difusa, o pesquisador fechava as pálpebras superior e inferior, simulando uma piscada completa. Ao abri-las e segura-las abertas, começava a contar o tempo até que a película lacrimal se rompesse, com aparecimento de pontos enegrecidos, sendo esse o Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal. Esse

procedimento era repetido 3 vezes, sendo o valor obtido uma média dessas 3 mensurações.

Na sequência, procedia-se lavagem para retirada do excesso de Fluoresceína e eram tomadas mais fotos. Então, instilava-se uma gota de solução fisiológica 0,9% em uma tira de Rosa Bengala, tocava-se levemente a conjuntiva bulbar superior e observava-se com auxílio de lâmpada de fenda com filtro de azul de cobalto em iluminação difusa, além de tomar mais fotos. Tanto para a Fluoresceína, quanto para o Rosa Bengala, a avaliação era feita de uma adaptação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular (Anexo 2), classificando com notas de 0 a 4, a porcentagem da superfície corneal que corou-se com os corantes.

Por fim, exceto no momento M5, instilava-se colírio anestésico de Cloridrato de Proparacaína 0,5% e com auxílio do proprietário ou de um ajudante para conter o animal, o pesquisador procedia a injeção de 0,15ml da solução contendo lipossomas de Rapamicina na concentração 0,4mg/ml pela via subconjuntival.

Se necessário, para manter as pálpebras mais abertas, utilizava-se blefarostato infantil ou neonato. A agulha utilizada foi de 8mm de comprimento por 0,3mm de diâmetro acoplada a uma seringa de 1ml. A aplicação foi realizada com auxílio de uma pinça Colibri na conjuntiva bulbar superior na posição de 11 a 2 horas à 3-4mm do limbo.

Para evitar erros, interferência da opinião dos proprietários ou subjetividade por parte do pesquisador, em todos os momentos de avaliação foram tomadas diversas fotos, e preenchidas as folhas de avaliação segundo a modificação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular (Anexo 2), realizado não somente baseado na avaliação clínica, mas também através de um comparativo de fotos da progressão do tratamento.

- **Questionário dos proprietários**

Levando em consideração a opinião dos donos dos cães estudados e também como forma de integra-los a participar mais ativamente do processo, pois o tratamento com Tacrolimus tópico dependia do apoio deles em casa;

em todos os momentos de avaliação, os mesmos deveriam responder a um questionário atribuindo nota de 0 a 10 (sendo zero ruim e 10 excelente) a 4 itens, obrigando-os assim a observar em suas casas essas quatro características (Anexo 3).

#### **4.4. Análise estatística**

Os valores atribuídos a todos os itens da modificação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular, TLSI, TLSII e Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal foram avaliados momento a momento pela técnica da análise de variância não paramétrica complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Fase I – Testes em coelhos

Não foram observadas, em nenhum momento de avaliação, tanto das injeções de lipossomas vazios quanto de lipossomas contendo Rapamicina, alterações de valor dos itens do protocolo modificado de McDonald e Shaddock, bem como não foram constatados efeitos adversos do uso das injeções nos dois meses de estudo, ou nos dois meses de avaliação posteriores.

- Biópsia conjuntival

Após 7 dias da aplicação subconjuntival de lipossomas vazios (Figura 1) e lipossomas contendo Rapamicina, podia-se observar a presença das partículas lipídicas no tecido conjuntival.

Nas imagens das conjuntivas que receberam lipossomas com Rapamicina observava-se ainda cristais do fármaco livres no tecido conjuntival (Figura 2).

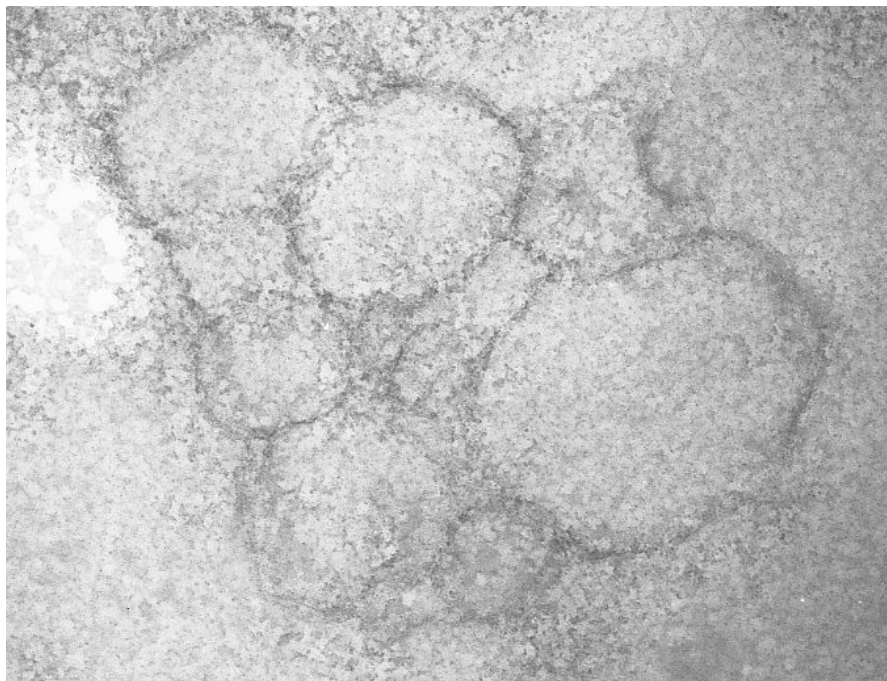


FIGURA 1. Foto em Microscopia Eletrônica de Transmissão. Lipossomas vazios medindo aproximadamente 90nm na conjuntiva bulbar de coelhos, após 7 dias da injeção.

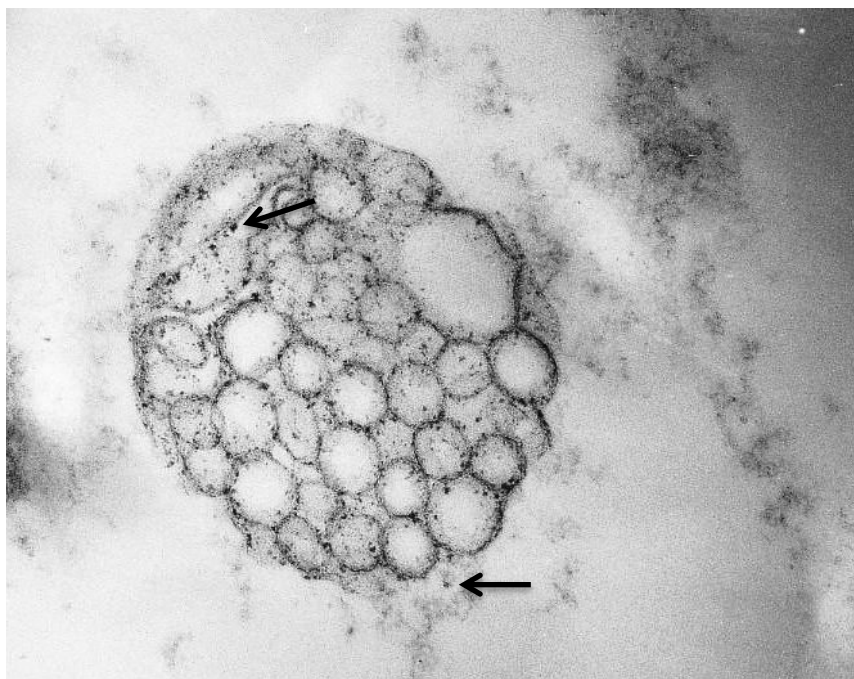


FIGURA 2. Foto em Microscopia Eletrônica de Transmissão. Lipossomas contendo Rapamicina medindo aproximadamente 80nm na conjuntiva bulbar de coelhos, após 7 dias da injeção. Observam-se pequenos pontos enegrecidos de cristal livre do fármaco fora das esferas lipídicas (setas).

## 5.2. Fase II – Tratamento de Cães com Ceratoconjuntivite Seca

- Teste Lacrimal de Schirmer I e Teste Lacrimal de Schirmer II

Na Tabela 5 estão apresentados a mediana, o valor mínimo e máximo do TLS I e do TLS II, em milímetros por minuto, de acordo com o momento de avaliação.

TABELA 5. Mediana e valores mínimo e máximo do TLS I e TLS II segundo momento de avaliação

Variável	Momento de Avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>TLS I</b>	1,5(0,0;4,0)a	4,0(0,0;15,0)ab	4,0(0,0;21,0)bc	4,5(0,0;20,0)c	6,0(0,0;21,0)d	p<0,001
<b>TLS II</b>	0,0(0,0;4,0)a	0,0(0,0;10,0)ab	0,0(0,0;11,0)ab	1,5(0,0;13,0)b	2,0(0,0;13,0)b	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo. Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si (p<0,001), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 5, pode-se inferir que:

- O TLS I apresentou aumento numérico progressivo de seus valores de acordo com os momentos de avaliação.
- Não houve diferença significativa entre o M1 e M2 ou entre M2 e M3.
- Houve diferença significativa entre os valores de M1 e M3 e também entre M4 e M5.
- Ao tomar como referência M1, que é o momento de avaliação antes de iniciada a medicação, e compará-lo aos outros momentos (sob efeito da medicação), houve diferença significativa e com aumento numérico de valores em todas as avaliações a partir do momento 3 (M3, M4 e M5).
- O TLS II apresentou aumento numérico progressivo de seus valores de acordo com os momentos de avaliação.
- Os dois últimos momentos de avaliação (M4 e M5) foram significativamente maiores que M1 (pré medicação).
- Não houve diferenças significativas entre M1 e M2, M2 e M3, M3 e M4 ou M4 e M5.

- Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL)

A Tabela 6 mostra a mediana, valor mínimo e máximo do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal, em segundos, de acordo com os momentos de avaliação.

**TABELA 6. Mediana e valores mínimo e máximo do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal segundo momento de avaliação**

Variável	Momento de Avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>TRFL</b>	6,0(4,0;13,0)a	10,0(5,0;21,0)b	10,0(5,0;25,0)bc	10,0(5,0;25,0)bc	11,0(6,0;25,0)c	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ( $p < 0,001$ ), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 6, pode-se inferir que:

- O Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal apresentou aumento numérico progressivo de seus valores de acordo com os momentos de avaliação.
- Houve diferença significativa de valores entre M1 e M2, M1 e M5 e entre M2 e M5.
- Não houve diferença significativa entre os valores entre M2 e M3, M3 e M4 ou M4 e M5.

Os seguintes itens são resultados numéricos de acordo com a modificação do protocolo de McDonald-Shadduck para graduação da inflamação ocular. Sendo o zero indicativo de normalidade e quanto mais distante do zero, maiores alterações clínicas.

- Clareza do Meio Ocular (CMO - escala de 0 a 4)

A Tabela 7 mostra a mediana, valor máximo e valor mínimo da Clareza do Meio Ocular de acordo com o momento de avaliação.

TABELA 7. Mediana e valores mínimo e máximo para Clareza do Meio Ocular (CMO) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de Avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>CMO</b>	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	p>0,05

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

De acordo com a Tabela 7, pode-se inferir que:

- Não houve diferença significativa dos valores de Clareza do Meio Ocular entre os momentos estudados.
- Pálpebras (escala de 0 a 3)

Na Tabela 8 estão apresentados a mediana e os valores mínimo e máximo para as Pálpebras de acordo com o momento de avaliação.

TABELA 8. Mediana, valores mínimo e máximo para Pálpebras segundo momento de avaliação

Variável	Momento de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>Pálpebra</b>	1,0(0,0;2,0) <sup>b</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>ab</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>ab</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>ab</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si (p<0,001), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 8, pode-se inferir que:

- A escala de pontos para avaliação palpebral apresentou diminuição numérica de seus valores de acordo com os momentos de avaliação.
- Houve diminuição significativa de valor entre os momentos M1 e M5.
- Não houve diferenças significativas ao comparar os outros momentos de avaliação.
- Córnea (escala de 0 a 4)

A Tabela 9 mostra os resultados da mediana e valores mínimo e máximo da escala de avaliação corneal de acordo com os momentos de avaliação.

TABELA 9. Mediana e valores mínimo e máximo para Córnea segundo momento de avaliação

Variável	Momento de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>Córnea</b>	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	p> 0,05

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Segundo a Tabela 9, pode-se inferir que:

- Não houve diferença significativa entre os valores da escala de pontos para avaliação corneal entre os momentos estudados.
- Porcentagem de Opacidade Corneal (%OC - escala de 0 a 4)

Na Tabela 10 estão apresentados a mediana e os valores mínimo e máximo para avaliação da Porcentagem de Opacidade Corneal (%OC) de acordo com os momentos de avaliação.

TABELA 10. Mediana e valores mínimo e máximo para Porcentagem de Opacidade Corneal (%OC) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>%OP</b>	2,0(1,0;4,0) <sup>b</sup>	1,5(1,0;4,0) <sup>ab</sup>	1,0(0,0;3,0) <sup>ab</sup>	1,0(0,0;3,0) <sup>ab</sup>	1,0(0,0;3,0) <sup>a</sup>	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si (p<0,001), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 10, pode-se inferir que:

- Houve diminuição numérica dos valores para avaliação da Opacidade Corneal em função dos momentos de avaliação.
- Houve diferença significativa entre os valores de M1 e M5.
- Não houve diferença significativa de valores entre os demais momentos.
- Vascularização Corneal (VC - escala de 0 a 2)

Na Tabela 11 observa-se a mediana e valores mínimo e máximo para avaliação da Vascularização Corneal (VC) segundo momento de avaliação.

TABELA 11. Mediana e valores mínimo e máximo para Vascularização Corneal (VC) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>VC</b>	2,0(0,0;2,0) <sub>a</sub>	2,0(0,0;2,0) <sub>a</sub>	2,0(0,0;2,0) <sub>a</sub>	2,0(0,0;2,0) <sub>a</sub>	2,0(0,0;2,0) <sub>a</sub>	p>0,05

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Segundo a Tabela 11, pode-se inferir que:

- Não houve diferença significativa entre os valores da escala de pontos para avaliação da vascularização corneal entre os momentos estudados.
- Congestão Conjuntival (CC - escala de 0 a 3)

A Tabela 12 mostra os resultados da mediana, valor mínimo e valor máximo para avaliação da Congestão Conjuntival (CC) segundo momento de avaliação.

TABELA 12. Mediana e valores mínimo e máximo para Congestão Conjuntival (CC) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>CC</b>	2,0(0,0;2,0) <sub>c</sub>	1,0(0,0;2,0) <sub>b</sub>	1,0(0,0;2,0) <sub>ab</sub>	0,5(0,0;2,0) <sub>ab</sub>	0,0(0,0;1,0) <sub>a</sub>	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ( $p < 0,001$ ), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 12, pode-se inferir que:

- A escala de pontos para avaliação da Congestão Conjuntival apresentou diminuição numérica de seus valores em função do tempo decorrido entre os momentos de avaliação.
- Houve diferença significativa entre os valores da escala de pontos para avaliação da congestão conjuntival entre os momentos M1 e M3, M1 e M5 e M2 e M5.
- Não houve diferença significativa entre os momentos M3 e M4.

- Quemose (escala de 0 a 4)

Na Tabela 13 estão os resultados da mediana, valores mínimo e máximo da avaliação da Quemose e Inchaço Conjuntival (QIC) segundo momento de avaliação.

TABELA 13. Mediana e valores mínimo e máximo para Quemose e Inchaço Conjuntival (QIC) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de Avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>Quemose</b>	1,0(0,0;2,0) <sup>b</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	0,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ( $p<0,001$ ), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 13, pode-se inferir que:

- Houve diferença significativa entre M1 e os demais momentos, não havendo diferença significativa entre os momentos estudados a partir de M2.
- Secreção Ocular (SO - escala de 0 a 3)

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados da mediana, valor mínimo e valor máximo para a avaliação da Secreção Ocular (SO) de acordo com o momento de avaliação.

TABELA 14. Mediana e valores mínimo e máximo para Secreção Conjuntival (SC) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de Avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>SO</b>	2,0(1,0;3,0) <sup>c</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>b</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>b</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>ab</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ( $p<0,001$ ), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 14, pode-se inferir que:

- Houve diminuição numérica dos valores de avaliação da Secreção Conjuntival em função do tempo de tratamento.
- Foi observado diferença significativa entre M1 e todos os outros momentos e também entre M2 e M5 e M3 e M5.

- Secreção: Cor e Consistência (SCC – escala de 0 a 3)

Na Tabela 15 são apresentados os resultados da avaliação da Secreção (SCC) de acordo com o momento de avaliação.

TABELA 15. Mediana e valores mínimo e máximo para Secreção: Cor e Consistência (SCC) segundo momento de avaliação

Variável	Momento de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>SCC</b>	2,0(1,0;3,0) <sup>c</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>b</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>b</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>ab</sup>	1,0(0,0;2,0) <sup>a</sup>	p<0,001

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

Os valores seguidos por pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ( $p<0,001$ ), quanto à variável analisada, nos diferentes momentos estudados.

De acordo com a Tabela 15, pode-se inferir que:

- Houve diminuição numérica dos valores em função do tempo de tratamento.
- Foram observadas diferenças significativas entre M1 e todos os demais momentos e também entre M2 e M5 e M3 e M5.
- Demais variáveis

As demais variáveis estudadas, por não apresentarem diferenças significativas em seus valores em todos os momentos de avaliação, como também por avaliarem estruturas que não são fundamentais no estudo do olho seco, estão apresentadas juntas na Tabela 16.

TABELA 16. Mediana e valores mínimo e máximo das variáveis segundo momento de avaliação

Variáveis	Momentos de avaliação					Valor p
	M1	M2	M3	M4	M5	
<b>Flare Aquoso</b>	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	
<b>Celularidade Aquoso</b>	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	
<b>Iris</b>	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	
<b>Lente</b>	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	p>0,05
<b>Vítreo</b>	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	p>0,05
<b>Retina</b>	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;0,0)	

M1, M2, M3, M4 e M5 são os momentos de avaliação com 15 dias de intervalo.

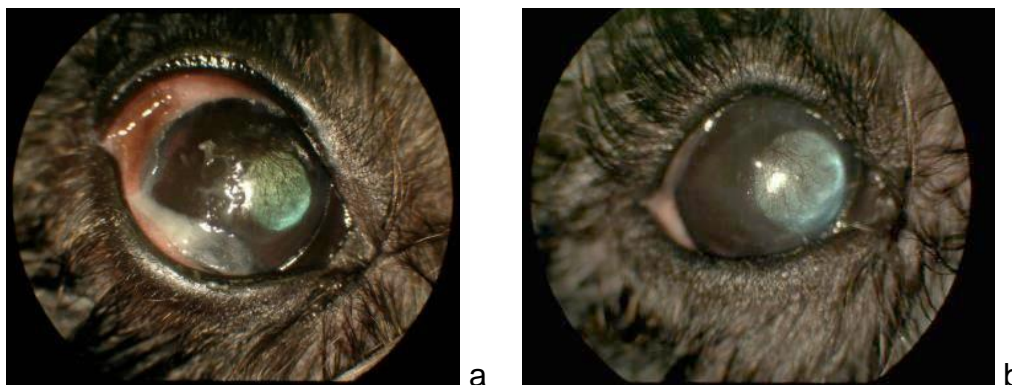


FIGURA 3. Paciente Schanauzer, 8 anos, sem resposta ao Tacrolimus tópico há mais de um ano: antes e depois do tratamento. a) No momento M0 (pré tratamento). Observa-se córnea sem brilho, com secreção, hiperemia conjuntival e opacidade corneal. b) No momento M5 (após 2 meses de tratamento). Observa-se diminuição da hiperemia conjuntival e secreção, maior brilho da superfície corneal e discreta diminuição da opacidade e vascularização corneal.

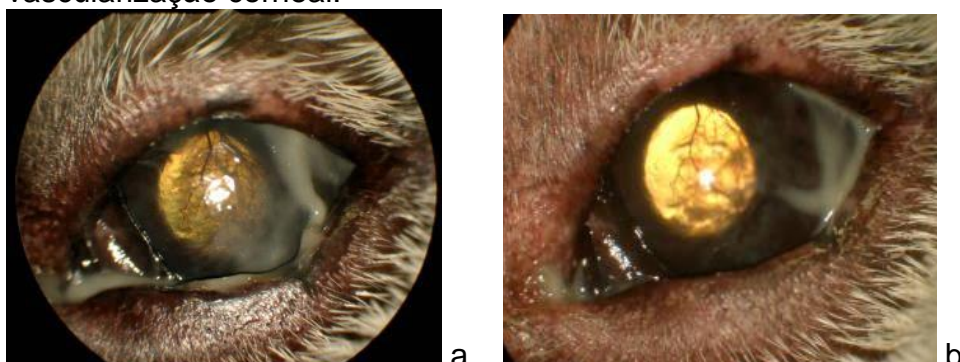


FIGURA 4. Paciente Pastor Branco, 4 anos, sem resposta ao Tacrolimus tópico há mais de um ano: antes e depois do tratamento. a) No momento M0 (pré tratamento). Observa-se córnea sem brilho, com secreção mucosa abundante e vascularização corneal. b) No momento M5 (após 2 meses de tratamento). Observa-se diminuição da secreção e maior brilho da superfície corneal com diminuição discreta da vascularização corneal.

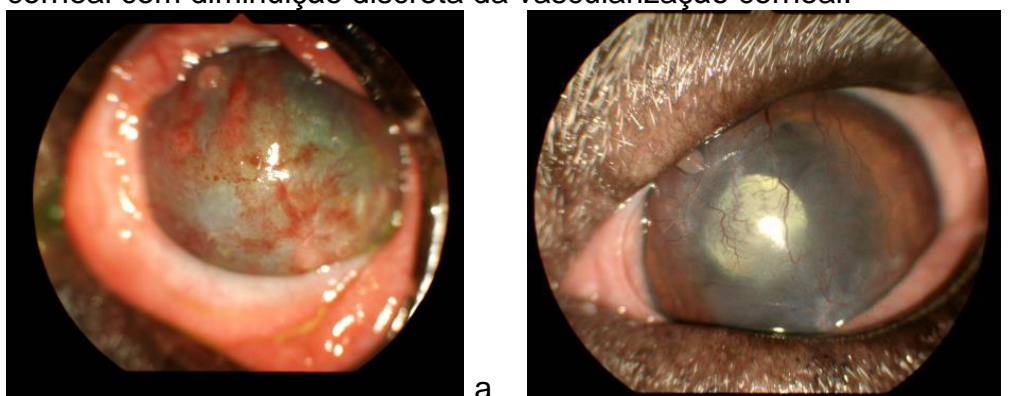


FIGURA 5. Paciente Buldogue Inglês, 4 anos, sem resposta ao Tacrolimus tópico há 6 meses: antes e depois do tratamento. a) No momento M0 (pré tratamento). Observa-se intensa hiperemia e quemose, córnea opaca e vascularizada. b) No momento M5 (após 2 meses de tratamento). Observa-se diminuição significativa da hiperemia e quemose bem como da vascularização e opacidade corneal.

- Avaliação dos proprietários

Todos os proprietários que participaram deste estudo avaliaram positivamente os dois meses de tratamento.

Na Tabela 17 são apresentados dados descritivos das notas atribuídas pelos proprietários no final do tratamento aos itens: Conforto, Lubrificação, Secreção e Hiperemia.

TABELA 17. Medidas descritivas das notas dos proprietários segundo item

Item	Medida Descritiva					
	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo	Média	Desvio padrão	CV (%)
<b>Conforto</b>	5,0	7,0	9,0	7,2	1,6	22,2%
<b>Lubrificação</b>	2,0	7,0	10,0	6,7	2,2	32,8%
<b>Secreção</b>	0,0	7,0	9,0	6,9	2,4	34,8%
<b>Hiperemia</b>	5,0	7,0	10,0	7,2	1,5	20,8%

CV (Coeficiente de Variação)

De acordo com a Tabela 17, pode-se inferir que:

- as notas atribuídas ao item Hiperemia obtiveram resultados mais homogêneos, enquanto que as notas atribuídas à Secreção foram as mais heterogêneas.
- A classificação quanto à homogeneidade das notas da mais homogênea à mais heterogênea seria: Hiperemia>Conforto>Lubrificação>Secreção

## 6. DISCUSSÃO

Devido à ausência de literatura com testes utilizando lipossomas com Rapamicina pela via subconjuntival, optou-se por avaliar em coelhos, a possibilidade de efeitos adversos que este tipo de tratamento poderia ocasionar, antes de aplicá-lo em cães com Ceratoconjuntivite Seca. O modelo experimental escolhido foi o coelho, por tratar-se de um bom modelo experimental em oftalmologia e de fácil manuseio.

A aplicação de 0,3ml da solução contendo lipossomas vazios e lipossomas com Rapamicina a cada 7 dias, durante 8 semanas, não gerou inflamação, incômodo ou qualquer efeito adverso nos coelhos. Mesmo após finalizadas as aplicações, durante 2 meses, os 8 animais não apresentaram sinais de irritação ocular. Ao utilizar nos coelhos o dobro da quantidade já prevista para o uso em cães e com um intervalo de aplicação mais curto, a obtenção de bons resultados serviu de base para o início dos testes na espécie canina.

O intervalo de aplicação para cães de 15 dias foi recomendado pelos profissionais dos Laboratórios Santgar, fornecedor do medicamento, que através de estudos de liberação *in vitro* da suspensão lipossomal contendo Rapamicina, chegaram à conclusão que aproximadamente 12 dias seriam necessários para que toda a Rapamicina fosse liberada das nanopartículas. Dessa forma, no 15º dia não haveria mais medicamento subconjuntival, podendo ser realizada outra aplicação.

Nos coelhos foi realizada biópsia conjuntival e posterior envio das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). O objetivo dessa análise não foi avaliar a inflamação tecidual, mas sim investigar como os lipossomas estariam depositados abaixo da conjuntiva. Exatamente no mesmo lugar da injeção, após 7 dias, ainda havia lipossomas com Rapamicina e também cristais do fármaco livres no tecido.

Na literatura há diversos trabalhos que sugerem causa imunomediada à CCS canina idiopática (ICZI et al., 2002; WILLIAMS, 2008). No presente trabalho, suspeitou-se da causa imunomediada após serem descartadas causas congênicas, sistêmicas, endócrinas ou infecciosas.

Em humanos há predominância do número de mulheres portadoras de CCS devido a causas hormonais, especialmente a influência de hormônios andrógenos (BARABINO et al., 2012). No presente estudo, como houve predominância de machos sobre as fêmeas em cerca de 1/3, a distribuição de sexo na amostra é casual, não sendo suficiente para revelar dados sobre a influência do sexo na CCS.

Considera-se pacientes portadores de olho seco grave aqueles animais cujo TLS I apresenta valores abaixo de 5mm/minuto (WILLIAMS, 2005). Todos os 29 olhos selecionados para este estudo apresentavam valores abaixo de 5mm/min.

Um fator que sugere fortemente a origem imunomediada de algumas CCS idiopáticas em cães está na resposta positiva ao tratamento com drogas imunomoduladoras (GIULIANO e MOORE, 2007). No entanto, os imunomoduladores somente irão agir quando ainda existe algum remanescente de tecido glandular (WILLIAMS, 2008). No presente estudo, foram selecionados animais com olho seco grave de causa supostamente imunomediada, porém que não apresentavam resposta efetiva ao tratamento com Tacrolimus 0,03%. Baseado na experiência clínica deste autor e seus colaboradores, optou-se por testar a associação de dois imunomoduladores justamente nesses animais irresponsivos, a fim de provar que, restando algum remanescente de tecido glandular, é possível obter atenuação dos sinais de CCS.

Utilizar a associação de imunomoduladores em animais que respondem bem a tratamentos convencionais com Tacrolimus ou Ciclosporina não teria sentido, sendo o objetivo desta investigação conseguir um tratamento novo e alternativo para animais refratários a tratamentos anteriores.

O fato de a tecnologia dos lipossomas, bem como o princípio ativo da Rapamicina apresentarem um elevado custo, fez com que o autor e seus colaboradores optassem pelo investimento no tratamento apenas do olho seco crônico, grave e sem resposta, visto que esses casos idiopáticos que não respondem a nenhum tratamento são comuns na rotina clínica oftalmológica.

No entanto, considera-se aqui a possibilidade de estudos futuros com cães que apresentem olho seco leve a moderado, empregando a injeção

subconjuntival de lipossomas com Rapamicina sem estar associada ao Tacrolimus tópico. Tomando como base o presente estudo, acredita-se que tal investigação alcançaria bons resultados.

Na CCS, a superfície ocular perde sua homeostase e apresenta graus variados de inflamação caracterizados pela expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, com infiltração de células T reativas (STERN et al., 2010). Apesar de utilizarem mecanismos distintos, tanto o Tacrolimus, quanto a Rapamicina, agem inibindo a ativação de resposta das células T e B, sendo os dois imunomoduladores muito mais potentes que a Ciclosporina (TIZARD, 2002). Dessa forma, optou-se por associar a Rapamicina ao Tacrolimus, e não à Ciclosporina, pois os dois imunomoduladores apresentam um mecanismo de ação similar e muito mais efetivo.

Em comparação ao Tacrolimus, a Rapamicina interfere com a progressão do ciclo celular em um estágio posterior e não bloqueia os fatores estimuladores de proliferação, mas sim o sinal de proliferação que é induzido por esses fatores (GRAHAN e STOREY, 2004). Tacrolimus inibe a fase inicial de ativação de células T, incluindo IL-2, IL-3, IL-4, INF gama, TNF e fator de estimulação de granulação de mastócitos, enquanto que a Rapamicina não apresenta efeito na expressão da fase inicial de células T, mas inibe fortemente a fase tardia da ativação de células T. Seus efeitos não estão limitados ao crescimento de células T mediado por IL-2 ou IL-4, mas também pela capacidade de inibir IL-12, IL-7 e IL-15. Dessa forma, a Rapamicina bloqueia a progressão do ciclo celular do meio para o final da fase G1 e tem ainda efeitos sobre a produção de anticorpos, o que contribui para sua atividade imunorregulatória (SHANMUGANATHAN et al, 2005).

Tomando-se como base essas informações, onde supõe-se que o efeito das duas drogas seriam complementares, e ainda, baseando-se no estudo realizado por Ikeda et al. (1997) onde comprovou-se o efeito sinérgico dos dois imunomoduladores no tratamento da uveoretinite, optou-se por investigar se essa associação seria eficaz no tratamento da CCS canina imunomediada crônica e pouco responsiva.

Ainda, segundo Ikeda et al. (1997) a utilização da Rapamicina associada ao Tacrolimus faria com que a dose necessária a ser utilizada de cada composto diminuísse. Tacrolimus tópico já foi utilizado em uma série de

estudos em cães para tratamento de CCS, sendo a concentração de 0,03% eficaz na regressão de sinais clínicos (GRAHN e STOREY, 2004). Não há na literatura, até o presente momento, trabalhos sobre o uso tópico de Rapamicina no tratamento da CCS canina. Buech et al. (2007) utilizaram Rapamicina na forma de colírio em porcos na concentração de 1mg/ml. No presente trabalho, optou-se por utilizar a Rapamicina em uma concentração baixa (0,4mg/ml), visto que a aplicação seria subconjuntival, não necessitando uma concentração alta capaz de permear a córnea e ainda estaria associado ao Tacrolimus. A concentração do Tacrolimus foi mantida a 0,03% devido à disponibilidade comercial do colírio no país onde foi realizado este estudo.

Outra justificativa para manter o Tacrolimus na concentração 0,03% reside no fato que todos os animais selecionados para este estudo já encontravam-se sob tratamento para CCS no mesmo Hospital Veterinário, que tem como protocolo de tratamento para olho seco utilizar colírio lubrificante de Hialuronato de Sódio 0,1% e Tacrolimus 0,03% na forma de colírio.

Além disso, visto que o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da injeção subconjuntival de Rapamicina associada ao Tacrolimus, e por tratar-se de animais com olho seco grave (TLS I menor que 5mm/min), decidiu-se por manter o tratamento com o colírio lubrificante, visando o bem estar dos animais estudados; a medicação a ser testada era totalmente inovadora e uma tentativa ao tratamento do olho seco, podendo apresentar resposta positiva ou negativa; retirar o colírio lubrificante poderia seguramente acarretar problemas graves à superfície ocular destes cachorros.

Dessa forma, todos os olhos dos cães estudados estavam sob o uso prévio dos mesmos medicamentos, tanto o lubrificante quanto o Tacrolimus na concentração 0,03%, que ao serem mantidos, não se alteraria a rotina de medicação, à qual animais e proprietários já estavam acostumados; bastaria apenas comparecer a cada 15 dias para as injeções.

A Rapamicina é praticamente insolúvel em água e altamente lipofílica (GHANBARZADEH et al., 2013). Tais características fazem com que a formulação de uma medicação tópica oftalmológica seja uma tarefa difícil de ser realizada. Nanocarreadores parecem ser uma ferramenta promissora como sistema de administração de fármacos para a superfície ocular e ainda

a encapsulação da Rapamicina em lipossomas poderia melhorar sua estabilidade, prolongando sua bioviabilidade (SHENGYAN et al., 2012; GHANBARZADEH et al., 2013). Assim, neste trabalho optou-se pela encapsulação do fármaco em lipossomas, a fim de obter uma formulação oftalmológica que fosse eficaz no tratamento de doenças oculares.

Buech et al. (2007) formularam um colírio de Rapamicina e concluíram que o mesmo não foi capaz de penetrar a córnea intacta. A administração subconjuntival é indicada para condições inflamatórias ou infecciosas da córnea e segmento anterior, sendo recomendada para fármacos altamente hidrofílicas ou lipofílicas, que não apresentam boa penetração através do epitélio corneal. Essa via promove níveis terapêuticos do medicamento na forma de suspensão de 2 a 3 semanas, sendo indicada para suplementar a via tópica e reduzir a necessidade de medicação frequente (REGNIER, 2007). Devido a tais fatores, no presente estudo decidiu-se pela administração subconjuntival da solução lipossomal contendo Rapamicina, objetivando penetração e níveis terapêuticos capazes de tratar o segmento anterior, bem como ser uma alternativa inovadora ao tratamento do olho seco em cães, cuja frequência de medicação poderia ser reduzida.

O tratamento com imunomoduladores requer meses de continuidade para demonstrar sua eficácia e alguns pacientes demonstram intolerância aos efeitos colaterais de sua administração tópica ocular, como ardência e irritabilidade após aplicação (BARABINO et al., 2012). Tomando-se como referência esses dados, a presente investigação considerou como animais sem resposta aqueles que estavam sob tratamento prévio com Tacrolimus há no mínimo 4 meses, sendo que a maioria já estava utilizando a concentração 0,03% há mais de um ano. O fato de acrescentar outro imunomodulador pela via subconjuntival, também objetivou avaliar se essa via seria bem tolerada para o tratamento da CCS canina, reduzindo os efeitos adversos da administração tópica.

O fato do presente tratamento ter sido avaliado por apenas dois meses pode ser questionável no que diz respeito ao tempo mínimo necessário para que seja atingida a eficácia completa da associação dos dois imunomoduladores. Os resultados obtidos nos dois meses de estudo demonstraram boa resposta, no entanto, não pode-se afirmar que a

continuidade das aplicações seguiria gerando regressão dos sinais clínicos de CCS, abrindo possibilidade à realização de pesquisa continuada nessa área.

Outro fator a ser considerado aqui, seriam os efeitos causados à conjuntiva desses animais, que estariam recebendo múltiplas injeções. As quatro aplicações deste estudo não geraram qualquer efeito colateral à superfície ocular dos 17 animais, no entanto, são necessárias mais pesquisas sobre a aplicação múltipla e contínua da formulação de lipossomas contendo Rapamicina via subconjuntival por um tempo maior de tratamento.

O Teste Lacrimal de Schirmer é o teste padrão para mensuração da produção lacrimal de cães (OLLIVIER et al., 2007). O TLS I revela a combinação da quantidade lacrimal produzida com o volume do fórnix conjuntival (WILLIAMS, 2005). Já o TLS II determina o nível de lágrima basal, que em cães supõe-se ser 50% do volume total (OLLIVIER et al., 2007). Para esta pesquisa foram incluídos animais que apresentavam valores de TLS I e II entre 0 e 4mm/minuto. Sendo que após as quatro aplicações subconjuntivais houve aumento significativo desses valores na maioria dos animais, alcançando para o TLS I um valor máximo de 21mm/minuto e para o TLS II 13mm/minuto, demonstrando que a medicação proposta aqui é capaz de aumentar não somente a quantidade lacrimal produzida, como também o volume lacrimal basal.

O Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal mostra a combinação da produção lacrimal e quantidade de evaporação, sendo útil para mensurar a qualidade da lágrima (SAITO e KOTANI, 2001). No presente estudo os animais incluídos apresentavam valores de TRFL de 4 a 13 segundos, após os dois meses de medicação esses valores aumentaram significativamente, alcançando valores entre 6 e 25 segundos, fato que sugere que além de ser capaz de aumentar a produção lacrimal, a associação de Tacrolimus com Rapamicina foi capaz de melhorar a qualidade da lágrima.

O protocolo de McDonald e Shadduck (1977) avalia a inflamação ocular e diversas adaptações já foram realizadas para diferentes estudos em oftalmologia, fato que justificou a escolha desse protocolo na avaliação da inflamação ocular em cães com CCS.

Neste estudo, através da utilização de tal protocolo demonstrou-se que a medicação em questão foi capaz de diminuir significativamente a inflamação

palpebral, a opacidade corneal, a congestão e secreção conjuntival, representando melhora dos sinais clínicos dos animais estudados.

O fato de os proprietários atribuírem notas à progressão do tratamento também contribuiu para a constatação da regressão dos sinais clínicos de CCS. A melhora significativa dos valores do protocolo modificado de McDonald e Shaddock para a Congestão Conjuntival e Quemose são consistentes com a nota atribuída à Hiperemia, a qual obteve valores mais homogêneos. A segunda nota mais homogênea foi aquela atribuída ao item Conforto, o que revela que além do tratamento em questão não haver gerado incomodo aos pacientes, foi capaz de melhorar sua qualidade de vida.

É importante ressaltar aqui, que a associação de Tacrolimus 0,03% tópico com injeção subconjuntival de Rapamicina foi capaz de melhorar sinais clínicos, quantidade e qualidade da lágrima da maioria do animais estudados, todos portadores de olho seco crônico e grave. No entanto, apesar desses efeitos benéficos positivos, a medicação proposta não levou esses animais a uma produção de lágrima normal, que seria acima de 10 mm/minuto, fato que atenta para dois fatores relevantes: o primeiro seria em relação à cronicidade da enfermidade, talvez esses animais já não possuíam tecido glandular suficiente para alcançar valores normais, ou então, o tempo de tratamento de dois meses não teria sido suficiente para atingir a resposta máxima da produção lacrimal desses cães, o que sugere que sejam feitas mais pesquisas tomando-se um tempo maior de tratamento.

Os presentes dados apresentados são, até o momento na literatura, inéditos no que diz respeito ao tratamento da CCS canina severa e refratária. Não há relatos da utilização de lipossomas contendo Rapamicina via subconjuntival em cães, bem como não há relatos na Medicina Veterinária da associação de Tacrolimus 0,03% com Rapamicina. A medicação foi bem tolerada por todos os animais, não havendo efeitos colaterais.

Sugere-se aqui a continuidade de estudos que pesquisem a associação de imunomoduladores não somente para o tratamento da CCS canina, mas também para outras afecções imunomediadas, bem como mais estudos sobre o uso dos lipossomas para tratamento de doenças oculares de cães.

## 7. CONCLUSÕES

Pelo presente estudo, sob as condições metodológicas aplicadas, concluiu-se que, em cães com Ceratoconjuntivite Seca:

- A associação de Tacrolimus tópico 0,03% com lipossomas contendo Rapamicina na concentração 0,4mg/ml é capaz de atenuar os sinais clínicos da CCS canina;
- A via subconjuntival, bem tolerada por todos os animais estudados, não promove efeitos colaterais;
- A formulação terapêutica empregada propicia o aumento da produção lacrimal dos cães, bem como a qualidade da lágrima, com elevação significativa dos valores de TLS I e II e TRFL.

**REFERÊNCIAS** (Elaborado segundo a norma ABNT 6023)<sup>2</sup>

ACHOURI, D.; ALHANOUT, K.; PICCERELLE, P.; ANDRIEU, V. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Develop. Ind. Pharmacy.*, v. 39, n.11, p. 1599-1617, 2013.

AMBATI B.K.; PATTERSON E.; JANI P.; JENKINS C.; HIGGINS E.; SINGH N.; SUTHAR T.; VIRA N.; SMITH K.; CALDWELL R. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br. J. Ophthalmol.* v. 91, p. 505–508, 2007.

ANDRADE, A.L.; LAUS. J.L. Enfermidades da córnea de pequenos animais. *Clínica Veterinária*, n.12, p.34-39, 1997.

ANGÉLICO, G.T.; RANZANI, J.J.T.; BRANDÃO, S.A.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R.; SERENO, M.G.; CREMONINI, D.N. Transplante de glândulas salivares menores no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1087-1092, 2011.

BARABINO S.; CHEN Y.; CHAUHAN, S.; DANA, R. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.*, v. 31, n. 3, p. 271-285, 2012.

BATTAT L.; MACRI A.; DURSUN D.; PFLUGFELDER S.C. Effects of laser in-situ keratomileusis on tear production, clearance and the ocular surface. *Ophthalmology.* v.108, p.1230–1235, 2001.

BERDOULAY A.; ENGLISH R.V.; NADELSTEIN B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Ophthalmol.*, v.8, p. 225–232, 2005.

BERTELMANN E.; PLEYER, U. Immunomodulatory therapy in ophthalmology – is there a place for topical application? *Ophthalmologica.*, v.218, p.359-367,

---

<sup>2</sup> Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.  
National Library of Medicine. List of journals indexed in index Medicus. Washington, 2008. 337p.

2004.

BIROS, D. J. Ocular Immunity. In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 223-235.

BROADWATER, J.J.; COLITZ, C.; CARASTRO, S.; SAVILLE, W. Tear production in normal juvenile dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v.13, p.321-325, 2010.

BUECH, G.; BERTELMANN, E.; PLEYER, U.; SIEBENBRODT, I.; BORCHERT. Formulation of Sirolimus Eye Drops and Corneal Permeation Studies. *J. Ocul. Pharmacol. Therap.*, v.23; n. 3, 2007.

CORCORAN M.P.; MEYDANI M.; LICHTENSTEIN A.H.; SCHAEFER E.J.; DILLARD A.; LAMON-FAVA S. Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J. Endocrinol.*, v. 206, p.217–224, 2010.

DIEBOLD, Y.; RIOS, J.D.; HODGES, R.R.; RAWE, I.; DARTT, D.A. Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 42, p. 2270–2282, 2001.

EL ANNAN J.; GOYAL S.; ZHANG Q.; FREEMAN G.J.; SHARPE A.H.; DANA R. Regulation of T-cell chemotaxis by programmed death-ligand 1 (PD-L1) in dry eye-associated corneal inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; v. 51, p. 3418–3423, 2010.

ELLENBERG D.; AZAR D.T.; HALLAK J.A.; TOBAIGY F.; HAN K.Y.; JAIN S.; ZHOU Z.; CHANG J.H. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog. Retin. Eye Res.*, v. 29, p. 208–248, 2010.

GHANBARZADEH, S., VALIZADEH, H., ZAKERI-MILANI, P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *BioImpacts.*, v. 3, n. 2, p. 75-81, 2013.

GILGER B.C.; WILKIE, D.A.; SALMON J.H.; PEEL, M.R. A topical aqueous calcineurin inhibitor for the treatment of naturally occurring keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v. 16, n. 3, p. 192-197, 2013.

GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P. Diseases and surgery of the canine lacrimal secretory system In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 633 a 661.

GONZALEZ, L., LOZA, R.J., HAN, K.Y., SUNOGROT, S., CUNNINGHAM, P.P., DRAKE, J., JAIN, S., HONG, S. CHANG., J.H. Nanotechnology in corneal neovascularization therapy – a review. *J. Ocular Pharmacol. Therapeutics.*, v. 29, n. 2, p.124-134, 2013.

GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. *Vet. Clin. N. Am: Sm. Anim. Pract.*, v.34, n.3, p.739-753, 2004.

GUM, G.G.; GELLAT, K.N.; ESSON, D.W. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology.*, Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 149 a 182.

HIRNLE, E.; HIRNLE, P.; WRIGHT, J.K. Distribution of liposome-incorporated carboxyfluorescein in rabbit eyes. *J. Microencapsul.*, v.8, n.3, p.391-399, 1991. (resumo)

HUWYLER, J., CERLETTI, A., FRICKER, G., EBERLE, A.N.; DREWE, J. Bypassing of P-glycoprotein using immunoliposomes. *J. Drug Target*, v. 10, p.73–79, 2002. (resumo)

IKEDA, E.; HIKITA, N.; ETO, K.; MOCHIZUKI, M. Tacrolimus-rapamycin combination therapy for experimental autoimmune uveoretinitis. *Jpn. J. Ophthalmol.*, v. 41, n.6, p. 396-402, 1997.

INTERNATIONAL DRY EYE WORKSHOP. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee. *Ocul.*

*Surf.*, v. 5, p. 75-92, 2007. (não há autores) <<http://tearfilm.org/pdfs/OM%20-%20Definition%20%26%20Classification.pdf>> Acesso em: 05 jun. 2014.

IZCI C, CELIK I, ALKAN F, OGURTAN, Z.; CEYLAN, C; OZKAN, Y. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Am. J. Vet. Res.*, n. 63, p. 688–694, 2002. (resumo)

KANG M.H.; KIM M.K.; LEE H.J.; LEE H.I.; WEE W.R.; LEE J.H. Interleukin-17 in various ocular surface inflammatory diseases. *J. Korean. Med. Sci.*, v. 26, p. 938–944, 2011.

KASWAN R.L.; MARTIN C.L.; DAWE D.L. Keratoconjunctivitis sicca: immunological evaluation of 62 canine cases. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, p. 376–83, 1985. (resumo)

KASWAN R.L.; SALISBURY M.A.; WARD, D.A. Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca. A useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with cyclosporine eye drops. *Arch. Ophthalmol.*, v.107, p.1210–1216, 1989.

KAUR, I.P.; SMITHA, R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, v.28, p.353–369, 2002.

KRENZER, K.L.; DANA, M.R.; ULLMAN, M.D.; CERMAK, J.M.; TOLLS, D.B.; EVANS, J.E.; SULLIVAN, D.A. Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.85, p.4874-4882, 2000.

KUCHLE M.; CURSIEFEN C.; NGUYEN N.X.; LANGENBUCHER A.; SEITZ B.; WENKEL H.; MARTUS P.; NAUMANN G.O. Risk factors for corneal allograft rejection: intermediate results of a prospective normal-risk

keratoplasty study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, n. 240, p. 580–584, 2002.

LAMBERT D.W. Physiology of the tear film. In: SMOLIN G.; THOFT R.A. *The Cornea.*, New York: Little Brown & Co; 1994, p. 439–455.

LEDOUX, M.S.; ZHOU, Q.; MURPHY, R.B.; GREENE, M.L.; RYAN, P. Parasympathetic innervation of the meibomian glands in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 42, p. 2434–2441, 2001.

MALHOTRA, M.; MAJUMDAR, D.K. Permeation through cornea. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 39, p. 11–24, 2001. (resumo)

MAURER, N.; FENSKE, D.B.; CULLIS, P.R. Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, n. 1, p. 923–947, 2001.

McDONALD, T.; SHADDUCK, J. Eye irritation. In:\_\_\_\_\_ *Advances in Modern Toxicology.* Washington, DC: Hemisphere Publishing Corp; 1977, p.579-582.

MEZEI, M.; MEISNER, D. Liposomes and nanoparticles as ocular drug delivery systems. In: EDMAN, P. *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery.* Florida: CRC Press, 1992. p. 92-104.

MOLOKHIA, S.A.; THOMAS S.C.; GARFF, K.J.; MANDELL, K.J.; WIROSTKO, B.M. Anterior eye segment drug delivery systems: current treatments and future challenges. *J. Ocul. Pharmacol. Therap.*, v. 29, n. 2, p. 92-105, 2013.

MOORE C.P.; WILSMAN N.J.; NORDHEIM E.V.; MAJORS, L.J.; COLLIER, L.L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 28, p. 1925–1932, 1987.

MOORE, C.P. Immunomodulating agents. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, v.34, n.3, p.725- 737, 2004.

MORGAN, R.V.; ABRAHAMS K.L. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, p.1043–1046, 1991.

MOTTERLE L.; DIEBOLD Y.; ENRÍQUEZ DE SALAMANCA A.; SAEZ V.; GARCIA-VAZQUEZ C.; STERN M.E.; CALONGE M.; LEONARDI A. Altered expression of neurotransmitter receptors and neuromediators in vernal keratoconjunctivitis. *Arch. Ophthalmol.*, v. 124, p. 462–468, 2006.

NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v.133, p. 37-47, 2005. (resumo)

OFRI, R.; ORGAD, K.; KASS, P.H.; DIKSTEIN, S. Canine meibometry: establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs. *Vet. J.*, v.174, p.536–540, 2007.

OLIVERO, D.K.; DAVIDSON, M.G.; ENGLISH, R.V.; NASISSE, M.P.; JAMIESON, V.E.; GERIG, T.M. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, p.1039–1042, 1991.

OLLIVIER, F.J.; PLUMMER, C.E.; BARRIE, K.P. The eye examination and diagnostic procedures. In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 438 a 483.

ONYESOM, I.; LAMPROU, D.A.; SYGELLOU, L.; OWUSU-WARE, S.K.; ANTONIJEVIC, M.; CHOWDHRY, Z.; DOUROUMIS, D. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol. Pharmaceutics*. v. 10, p. 4281-4293, 2013.

PENG C.C.; BENGANI, L.C.; JUNG, H.J.; LECLERC, J.; GUPTA, C.; CHAUHAN A. Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery. *J. Drug*

*Del. Sci. Tech.*, v. 21, n.1, p. 111-121, 2011. (resumo)

POZO-RODRÍGUEZ, A.; DELGADO, D.; GASCÓN; A.R., SOLINÍS; M.A. Lipid nanoparticles as drug/gene delivery systems to the retina. *J. Ocul. Pharmacol. Therap.*, v.29, n.2, p.173-188, 2013.

REGNIER, A. Drug delivery. In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology.*, Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 271 a 288.

REINOSO, R.; CALONGE, M.; CASTELLANOS, E.; MARTINO, M.; FERNÁNDEZ, I.; STERN, M.E.; CORELL, A. Differential cell proliferation, apoptosis, and immune response in healthy and evaporative-type dry eye conjunctival epithelia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.52, n.7, p.4819-4828, 2011.

SAITO, A.; KOTANI, T. Tear production in dogs with epiphora and corneal epitheliopathy. *Vet. Ophthalmol.*, v.2, p.173–178, 1999.

SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Vet. Ophthalmol.*, v. 4, p.7-11, 2001.

SALL, K.; STEVENSON, O.D.; MUNDORF, T.K.; REIS, B.L. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of CsA ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA phase 3 study group. *Ophthalmol.*, v.107, p.631–639, 2000.

SEN, N.H.; LARSON, T.A.; MELETH, A.D.; SMITH, W.M.; NUSSENBLATT, R.B. Subconjunctival sirolimus for the treatment of chronic active anterior uveitis: results of a pilot trial. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 20, p. 1-5, 2012.

SHANMUGANATHAN, V.A.; CASELY, E.M.; RAJ, D.; POWELL, R.J.; JOSEPH, A.; AMOAKU, W.M.; DUA, H.S. The efficacy of sirolimus in the treatment of patients with refractory uveitis. *Br. J. Ophthalmol.*, v.89, p.666-669, 2005.

SHENGYAN, L.; JONES, L.; GU, F.X. Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromol. Biosci.*, v. 12, p. 608-620, 2012.

SHEVACH E.M. From Vanilla to 28 Flavors: Multiple Varieties of T Regulatory Cells. *Immunity.*, v. 25, p.195–201, 2006.

STERN, M.E.; BEUERMAN, R.W.; FOX, R.I.; GAO, J.; MIRCHEFF, A.K.; PFLUGFELDER, S.C. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*, v. 17, p. 584–589, 1998.

STERN M.E.; GAO J.; SIEMASKO K.F.; BEUERMAN, R.W.; PFLUGFELDER, S.C. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp. Eye Res.*, v. 78, p. 409–416, 2004a.

STERN, M.E.; BEUERMAN, R.W.; PFLUGFELDER, S.C. The normal tear film and ocular surface. In: \_\_\_\_ . *Dry eye and ocular surface disorders.*, New York: Marcel Dekker, Inc., 2004b, p. 41-62.

STERN M.E.; SCHAUMBURG C.S.; DANA R.; CALONGE M.; NIEDERKORN J.Y.; PFLUGFELDER S.C. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation. *Mucosal. Immunol.*, v.3, p. 425–442, 2010.

SULLIVAN, B.D.; EVANS, J.E.; DANA, M.R.; SULLIVAN, D.A. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Arch. Ophthalmol.*, v.124, p.286–292, 2006.

TIZARD, I.R. Drogas e outros agentes que afetam o sistema imune. In: \_\_\_\_ . *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002, cap. 36, p.478-486.

TURNER, K.; PFLUGFELDER, S.C.; JI, Z.; FEUER, W.J.; STERN, M.; REIS, B.L. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea.*, v.19; p.494–

496, 2000.

VAN DER WOERDT, A.; ADAMCAK, A. Comparison of absorptive capacities of original and modified Schirmer tear test strips in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.216, p.1576–1577, 2000.

WHITLEY, N.T.; DAY, M.J. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *J. Small Anim. Pract.*, v. 52, p. 70-85, 2011.

WILLIAMS D.L. Analysis of tear uptake by the schirmer tear test strip in the canine eye. *Vet. Ophthalmol.* v.8, p.325–30, 2005.

WILLIAMS D.L.; PIERCE V.; MELLOR P.; HEALTH M.F. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *J. Small Anim. Pract.*, v. 48, p. 252–256, 2007.

WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Vet. Clin. Small Anim.*, v. 38, p. 251-268, 2008.

YEH S.; SONG X.J.; FARLEY W.; LI D.Q.; STERN M.E.; PFLUGFELDER S.C. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.4, n.1, p. 124–129, 2003.

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

ZHAO, G.Q.; ZHANG, Z.H.; LIANG, T.; ZHANG, L.N.; LIU, J.W.; DU, Z.D. The effect of rapamycin liposome gutta inhibiting rat corneal neovascularization. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, v. 45, n.2, p. 146-152, 2009. (resumo)

ZYLBERBERG, C.; SEAMON, V.; PONOMAREVA, O.; VELLALA, K.; DEIGHAN, M.; AZZAROLO, A.M. Estrogen up regulation of metalloproteinase-2 and -9 expression in rabbit lacrimal glands. *Exp. Eye Res.*, v. 84, p.960–972, 2007.

## 9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista:

### **VETERINARY OPHTHALMOLOGY**

#### **SUBCONJUNCTIVALLY INJECTED LIPOSOME ENCAPSULATED RAPAMYCIN AND TOPICAL TACROLIMUS FOR THE TREATMENT OF MEDICALLY NON-RESPONSIVE KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA IN DOGS**

Joice F. Fonzar,\* José J. T. Ranzani, \*\* Maria J. B. Bernad, \*\*\* Carlos R. Padovani  
\*\* Cíntia S. Perches, \* Natalie B. Merlini, \* Cláudia V. S. Brandão, \*\* Gustavo A.  
García-Sánchez, \*\*\*\*

\* DVM, Master, PhD student of Faculty of Veterinary Medicine, Sao Paulo State  
University, Botucatu, SP, Brazil

\*\* DVM, Master, PhD, Professor at Faculty of Veterinary Medicine, Sao Paulo State  
University, Botucatu, SP, Brazil

\*\*\* Master, PhD, Professor at Faculty of Quemistry, Mexico's National Autonomy  
University, Mexico DF, Mexico.

\*\*\*\* DVM, Master, PhD, CLOVE diplomate, ACVO diplomate, Oftalvet, Mexico  
DF, Mexico

Address communication to:

J. F. Fonzar

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP  
Distrito de Rubião Júnior s/n – Caixa Postal 560 – CEP. 18618-970  
Tel/ Fax +55 14 3880-2032  
e-mail: [joicefonzar@hotmail.com](mailto:joicefonzar@hotmail.com)

G. A. García Sánchez  
Oftalvet  
Av. Coyoacan 1141 03100 México DF, México  
Tel/ Fax +52 55 5559-9291  
e-mail: [oftalvet2012@hotmail.com](mailto:oftalvet2012@hotmail.com)

**ABSTRACT**

*Objective* To evaluate the combination of topically administered tacrolimus and liposome encapsulated rapamycin in dogs with severe keratoconjunctivitis sicca, non-responsive to conventional medical therapy.

*Animals studied* Seventeen dogs (29 eyes) with a Schirmer tear test I value of less than 5 mm wetting/minute.

*Procedure* The eyes received a subconjunctival injection of liposomes with rapamycin at a dose of 0.4 mg/ml every 15 days for two months. Topically administered medication of 0.03% tacrolimus was utilized. Complete ophthalmologic evaluation using a modified McDonald-Shadduck protocol, as well as Schirmer tear tests (STT) I and II and tear film break up time (TBUT) were made every 15 days.

*Results* STT I and II, and the TBUT improved significantly during the 2 month treatment period ( $p < 0.001$ ). Clinical signs improved significantly with reduction in corneal opacity ( $p < 0.001$ ), conjunctival congestion ( $p < 0.001$ ), conjunctival chemosis ( $P < 0.001$ ) and conjunctival discharge ( $p < 0.001$ ).

*Conclusions* The treatment used did not cause side effects in any animal studied. The association of topical tacrolimus with liposomes containing rapamycin was effective in alleviating the clinical signs of keratoconjunctivitis sicca in dogs, as well as increased tear production and tear film quality of the studied animals.

**Key words:** Dogs, Keratoconjunctivitis sicca, Rapamycin, Tacrolimus.

## INTRODUCTION

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) is a common inflammatory disease in dogs, resulting from a deficiency of the pre-corneal tear film. This can occur either as a quantitative deficiency in the aqueous component of tears or as a qualitative deficiency in the mucinic or lipidic components of the tear film, leading to instability of this film. [1]

KCS is clinically characterized by mucoid ocular discharge, conjunctival hyperemia, blepharospasm, recurrent corneal ulceration, corneal vascularization and eventual corneal pigmentation, with chronicity blindness can occur. [1]

Canine KCS can be congenital, neurogenic, iatrogenic, breed associated, or caused by drug toxicity, but the most common cause is idiopathic. Histopathologic studies of the lacrimal tissue from idiopathic affected dogs have revealed varying degrees of lymphocytic–plasmocytic cellular infiltrate and acinar atrophy, thereby suggesting an immunologic basis for the disease. [2]

Treatment for CCS includes anti-inflammatory drugs, antibiotics, artificial tears and stimulants of the natural tear production (Cyclosporine, Tacrolimus, Rapamycin). Despite all these therapies are helpful, stimulation of natural tear production using immunomodulatory drugs seems to provide the greatest improvement in clinical signs and prevention of visual loss. [3]

Tacrolimus (FK506) is a macrolide antibiotic isolated from fermentation of *Streptomyces tsukubaensis*. The molecule binds to a specific cytosolic binding protein, the FK protein (FKBP), forming a complex which inhibits the expression of the early phase activation of T cells, inhibiting the immune response mediated by T- cells. [4]

Rapamycin, that can also be called Sirolimus is also a macrolide antibiotic isolated from the fermentation of *Streptomyces hydroscopicus*. Despite being a potent antifungal, Rapamycin has also been studied for their antitumor and immunosuppressive properties. Rapamycin, an mTOR (mammalian Target of Rapamycin) inhibitor, exerts its effect by a mechanism that is distinct from other immunosuppressive drugs. It suppresses cytokine-driven T-cell proliferation and inhibits the production, signaling and activity of many growth factors relevant to immune mediated diseases. [5]

Although the structure of Rapamycin is very similar to the Tacrolimus and the two components share the same cytosolic binding protein (FKBP), their molecular mechanisms of action are very different. Tacrolimus inhibits the early phase of T cell activation while Rapamycin inhibits the late phase of T cell activation. Thus, when the two drugs are used together is obtained a synergistic effect, enhancing the action of both drugs. With the combination of the two principles the required dose to be used for each compound decreases. [6]

Rapamycin is a strongly hydrophobic drug; it is practically insoluble in water. Consequently, clinically and commercially acceptable topical formulations of Rapamycin have been difficult to prepare. Drug-delivery systems can be of use to avoid the physicochemical and pharmacological undesirable properties of Rapamycin. [7]

Liposomes are the most commonly used carriers for both hydrophilic and hydrophobic drugs due to their versatile in vitro and in vivo physicochemical behavior. [8]

Liposomes are biocompatible and biodegradable particles consisting of membrane-like lipid bilayers composed mostly of phospholipids. Formed by amphiphilic phospholipids, liposomes have hollow spherical structures (vesicles) with

both lipophilic (lipid bilayer) and hydrophilic (aqueous compartment) phases. Due to this biphasic nature, liposomes can encapsulate both hydrophilic and/or lipophilic therapeutic agents in each compartment. [9]

A literature search for subconjunctival Rapamycin liposomal delivery systems for the eye produced no result.

The aim of this research is to study the efficacy of the association of Tacrolimus 0.03% topical suspension and subconjunctival Rapamycin liposomes at 0.4mg/ml to induce tear production in dogs with chronic KCS that did not respond to conventional medical treatment.

## **MATERIAL AND METHODS**

This prospective clinical trial study was performed in Veterinary Specialties Hospital – OFTALVET in Mexico City, Mexico in association with Sao Paulo State University in Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

Sao Paulo State University's Board of Ethics and Animal Experimentation approved this study for dogs and the respective hospital boards also approved the protocols for clinical trials on client-owned animals. All owners of patients gave informed consent to participate in the investigation and were fully informed that long-term outcome, complications, and efficacy of the subconjunctival Rapamycin liposomes in dogs with KCS were not known.

### *Criteria for selection of cases*

All 17 dogs included in this study were patients of Veterinary Specialties Hospital – OFTALVET and were examined by one of the investigators. Their ages ranged from 3 to 13 years with a mean age of 7.4 years. Five dogs were sexually intact females and 12 were males. All dogs were pure breed representing 9 breeds (5 Miniature Schnauzers, 3 Poodles, 2 German Shepherds, 2 English Bulldog, 1 White Shepherd, 1 Basset Hound, 1 Maltese, 1 Lhasa Apso, 1 Welsh Corgi Pembroke).

Dogs were diagnosed with immune-mediated KCS after a complete ophthalmic examination by a board-certified veterinary ophthalmologist.

All subjects additionally received a complete physical examination prior to entry into the study, and were judged to be free of any significant ocular and systemic disease that could impact the results.

Dogs newly diagnosed with immune-mediated KCS or currently undergoing treatment with topical Tacrolimus for less than 4 months were not eligible for this study.

All dogs accepted for this study had a STT I value of less than  $< 5$  mm/min in one or both eyes and were undergoing treatment with topical 0.03% Tacrolimus for a period of 4 months or more, without any improvement.

Ten dogs were undergoing treatment with Tacrolimus for more than 1 year, 4 dogs for 6 months to 1 year and 3 dogs for 4 months to 6 months of treatment without response.

### *Medication manufacturing*

Laboratorios Santgar in Mexico manufactured the suspension of liposomes with Rapamycin at 0.4mg/ml and the 0.03% Tacrolimus eyedrops.

## Procedures

A complete ophthalmic examination including Schirmer tear test I and II (STT I and STT II), slit lamp biomicroscopy, applanation tonometry, fluorescein dye test, tear film break up time, rose bengal dye test and indirect ophthalmoscopy were performed on all patients at each visit.

All ocular structures and the clinical signs of KCS were evaluated at each visit and scored by a modified McDonald-Shadduck score system.

Every 15 days the dogs received 0.15ml of a subconjunctivally injected suspension of liposomes with Rapamycin at 0.4mg/ml in the affected eye. All the dogs received 4 injections in a 2 months period.

The injections were performed after topical ocular anesthesia and manual restraint by the owner.

Enrolled dogs were treated with 0.03% Tacrolimus eye drops by their owners at home by applying one drop to the affected eye approximately every 8 hours.

The medication with topical Sodium Hialuronate was allowed 3 times a day.

Examinations were scheduled every 15 days and STT was measured more than 8 hours after the most recent topical medication.

Owners were also asked to monitor for any adverse reactions such as increased ocular redness, blepharospasm or local conjunctival or skin irritation following subconjunctival injection administration.

## Data analysis

The values assigned to all items in the modified McDonald-Shadduck scoring system, TLS I, TLS II and tear film break up time were evaluated by the technique of analysis of nonparametric variance complemented by Dunn's multiple comparisons test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ . All means, variances, and probabilities were calculated using computerized statistical software.

## RESULTS

No adverse effects, such as blepharospasm, ocular hyperemia, conjunctival chemosis, periocular swelling, or increased ocular discharge, were reported by the owners or noted on ophthalmic examinations, and all dogs completed the 60-day study period.

Statistically significant increases in STT I and STT II values after the 60 day period of treatment compared with STT I and STT II prior the subconjunctival injections were observed (Table 1).

Table 1. Shirmer tear test I and II, Median (minimum value; maximum value)

	Day after initiation of treatment					P value
	0	15	30	45	60	
<b>STT I</b>	1,5(0,0;4,0)a	4,0(0,0;15,0)ab	4,0(0,0;21,0)bc	4,5(0,0;20,0)c	6,0(0,0;21,0)d	P<0,001
<b>STT II</b>	0,0(0,0;4,0)a	0,0(0,0;10,0)ab	0,0(0,0;11,0)ab	1,5(0,0;13,0)b	2,0(0,0;13,0)b	P<0,001

STT , Schirmer tear test

Equal letters – no significant difference

Different letters – significant difference

Statistically significant increase in the tear film break up time was observed after the first subconjunctival injection with a significant difference between the values before and after treatment (Table 2).

Table 2. Tear film break up time, Median (minimum value; maximum value)

	Day after initiation of treatment					P value
	0	15	30	45	60	
<b>TBUT</b>	6,0(4,0;13,0)a	10,0(5,0;21,0)b	10,0(5,0;25,0)bc	10,0(5,0;25,0)bc	11,0(6,0;25,0)c	p<0,001

TBUT, tear film break up time

Equal letters – no significant difference

Different letters – significant difference

With a modified McDonald-Shadduck scoring system, the eyes in this study exhibited statistically improvement in clinical signs frequently associated with KCS, including corneal opacity, conjunctival congestion, conjunctival chemosis and conjunctival discharge (Table 3).

Table 3. Modified McDonald-Shadduck test results, Median (minimum value; maximum value)

	Day after initiation of treatment					P value
	0	15	30	45	60	
<b>Eyelids</b>	1,0(0,0;2,0)b	0,0(0,0;2,0)ab	0,0(0,0;2,0)ab	0,0(0,0;2,0)ab	0,0(0,0;2,0)a	p<0,001
<b>%CO</b>	2,0(1,0;4,0)b	1,5(1,0;4,0)ab	1,0(0,0;3,0)ab	1,0(0,0;3,0)ab	1,0(0,0;3,0)a	p<0,001
<b>CC</b>	2,0(0,0;2,0)c	1,0(0,0;2,0)b	1,0(0,0;2,0)ab	0,5(0,0;2,0)ab	0,0(0,0;1,0)a	p<0,001
<b>CCh</b>	1,0(0,0;2,0)b	0,0(0,0;2,0)a	0,0(0,0;2,0)a	0,0(0,0;2,0)a	0,0(0,0;2,0)a	p<0,001
<b>CD</b>	2,0(1,0;3,0)c	1,0(0,0;2,0)b	1,0(0,0;2,0)b	1,0(0,0;2,0)ab	1,0(0,0;2,0)a	p<0,001
<b>CDCC</b>	2,0(1,0;3,0)c	1,0(0,0;2,0)b	1,0(0,0;2,0)b	1,0(0,0;2,0)ab	1,0(0,0;2,0)a	p<0,001

%CO, % área of corneal opacity

CC, conjunctival congestion

CCh, conjunctival chemosis

CD, conjunctival discharge

CDCC, conjunctival discharge color and consistence

Equal letters – no significant difference

Different letters – significant difference

## DISCUSSION

In this study, we describe the results of the use of topical 0.03% Tacrolimus associated to subconjunctival liposomes with Rapamycin at 0.4mg/ml for the treatment of medically non-responsive immune-mediated KCS in dogs.

In humans, there is a predominance of the number of women with KCS due to hormonal causes. [10] In our study, as there was a predominance of males over females, it is not enough to reveal data on the influence of gender on KCS.

The positive response to treatment with immunomodulatory drugs strongly suggests the immune-mediated origin of some idiopathic KCS. [11] However, topical immunosuppressant drugs will only act when there is still some residual glandular tissue. [12] In the present study, were selected only dogs with severe idiopathic dry eye that had no effective response to treatment with Tacrolimus 0.03%. We decided to

test the association of two immunomodulatory drugs in order to prove that is possible to obtain attenuation of clinical signs of KCS if there is residual glandular tissue.

In KCS, the ocular surface loses its homeostasis and presents varying degrees of inflammation characterized by the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines, with infiltration of reactive T cells. [13] Despite using different mechanisms of action, both Tacrolimus and Rapamycin, act by inhibiting the activation of T and B cell response, being much more potent than Cyclosporine. [4] Thus, we chose to associate Rapamycin to Tacrolimus, and not to Cyclosporine, because they are more effective.

Rapamycin is like Tacrolimus as it is an inhibitor of T cell activation. However, it differs from Tacrolimus in that it targets a unique serine-threonine kinase involved in cell signaling. Hence, it functions as non-calcineurin inhibitor of T cells. It has additional immunomodulatory effects, including the inhibition of IL-2 dependent and independent proliferation of B-lymphocytes. [14]

Assuming that the effect of Tacrolimus and Rapamycin would be complementary, and, based on the study where it was shown the synergistic effect of the two immunomodulatory drugs in the treatment of uveoretinitis [6], we chose to investigate whether this association would be effective in the treatment of severe and non-responsive immune-mediated canine KCS.

The use of Rapamycin associated with Tacrolimus would decrease the required dose of each compound. [6] Topical Tacrolimus has been used in previous studies in dogs for the treatment of KCS, with an effective concentration of 0.03%. [3] There are no data in the literature using topical Rapamycin in the treatment of canine KCS. Some investigators used Rapamycin eye drops in pigs at a concentration of 1 mg/ml. [15] In our study, we used Rapamycin at a low concentration (0.4mg/ml), whereas the application would be subconjunctival, not requiring a high concentration ability to permeate the cornea and would be associated with Tacrolimus. The concentration of Tacrolimus was maintained at 0.03% due to the commercial availability of the drops in the country where this study was conducted.

Rapamycin is insoluble in water and highly lipophilic. [16] Such characteristics make the formulation of a topical ophthalmic medication a difficult task to accomplish. Nanocarriers seem to be a promising tool as a drug delivery system to the ocular surface and the encapsulation of Rapamycin in liposomes could improve its stability, prolonging its bioavailability. [9,16] Because of that, we chose in this study to encapsulate Rapamycin into liposomes in order to obtain an ophthalmic formulation that could be effective in the treatment of ocular disorders.

The study that used Rapamycin eye drops at 1mg/ml concluded that it was unable to penetrate the intact cornea. Subconjunctival administration is indicated for inflammatory or infectious conditions of the cornea and anterior segment and is recommended for highly hydrophilic or lipophilic drugs that do not have good penetration through the corneal epithelium. [17] Because of these factors, in our study, we decided to use subconjunctival administration of liposomes containing Rapamycin, aiming penetration and therapeutic levels capable of treating anterior segment as well as being a new alternative to the treatment of dry eye in dogs, whose frequency of medication could be reduced.

The treatment with immunomodulatory drugs requires months to demonstrate its effectiveness. [10] Our study had just a two-month period and can be questionable with respect to the minimum time necessary for complete effectiveness of the combination of the two immunomodulatory drugs. The results obtained in the two months of our study showed good results, however, cannot confirm that the continuity

of subconjunctival applications would generate more improvement of the lacrimal production or regression of clinical signs of KCS.

It is important to note here that the combination of topical Tacrolimus with a subconjunctival injection of Rapamycin was able to improve clinical signs, quantity and quality of the tear film of most of the severe dry eye patients studied. However, several key questions remain unanswered: What are the long-term effects of these injections on the immune system? Is there any way to predict which patients are likely to respond to treatment? Which treatment or combination of treatments is the most effective to KCS and other immune mediated diseases? The preliminary reports of the newer treatments should hopefully be the catalyst for randomized control studies that are needed in order to formulate an evidence base for the best treatment for severe and non-responsive canine KCS or other immune-mediated diseases.

We conclude that the management of patients with severe KCS who do not respond to first line immunomodulatory treatment is challenging. Our initial experience with Rapamycin and Tacrolimus demonstrates its effectiveness in the majority of patients with refractory KCS by not only controlling clinical signs of the disease but also improving the quantity and quality of the tear film.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge **Cnpq Brazil** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), **Capes Brazil** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and **Laboratórios Santgar Mexico** for the financial support.

## REFERENCES

- 1 - Gum GG, Gellat KN, Esson DW. Physiology of the eye. In: Gellat KN. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2007; 149-182.
- 2 - Carter R, Colitz CMH. The causes, diagnosis and treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Medicine* 2002; **97**:683-694.
- 3 - Grahn BH, Storey ES. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2004; **34**:3.
- 4 - Whitley NT, Day MJ. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *Journal of Small Animal Practice*. 2011; **52**:70-85.
- 5 - Sen NH, Larson TA, Meleth AD. et al. Subconjunctival sirolimus for the treatment of chronic active anterior uveitis: results of a pilot trial. *American Journal of Ophthalmology*. 2012; **20**:1-5.
- 6 - Ikeda E, Hikita N, Eto K et al. Tacrolimus-rapamycin combination therapy for experimental autoimmune uveoretinitis. *Japanese Journal Ophthalmology* 1997; **41**:6.

- 7 - Rouf MA, Vural I, Renoir JM et al. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *Journal of Liposome Research*. 2009; **19**:4.
- 8 - Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L et al. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013; **10**:4281-4293.
- 9 - Shengyan L, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromolecular Bioscience*. 2012; **12**:608-620.
- 10 - Barabino S, Chen Y, Chauhan S et al. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Progress in Retina and Eye Research*. 2012; **31**:3.
- 11 - Giuliano EA, Moore CP. Diseases and surgery of the canine lacrimal secretory system In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 633 a 661.
- 12 - Williams DL. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*. 2008; **38**:251-268.
- 13 - Stern ME, Schaumburg CS, Dana R et al. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation. *Mucosal Immunology*; 2010; **3**:425–442.
- 14 - Shanmuganathan VA, Casely EM, Raj D et al. The efficacy of sirolimus in the treatment of patients with refractory uveitis. *British Journal of Ophthalmology*. 2005; **89**:666-669.
- 15 - Buech G, Bertelmann E, Pleyer U et al. Formulation of Sirolimus Eye Drops and Corneal Permeation Studies. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2007; **23**:3.
- 16 - Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *BioImpacts*. 2013; **3**:2.
- 17 - Regnier A. Drug delivery. In: GELLAT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*., Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 271 a 288.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Anexo 1

Medicamentos e tiras diagnósticas utilizadas no estudo:

- Tacrosan (Tacrolimus 0,03%) – (Fabricado por Laboratórios Santgar, México DF, México).
- Humectan (Hialuronato de Sódio 0,1%) - (Fabricado por Laboratórios Santgar, México DF, México)
- Paracaína (Cloridrato de Proparacaína 0,5%) – (Fabricado por Laboratórios Santgar, México DF, México)
- Tear Flo (Tira estéril para Teste Lacrimal de Schirmer) – (Fabricado por Hub Pharmaceuticals, LLC, California, EUA)
- Bio Glo (Tira estéril de Fluoresceína Sódica) – (Fabricado por Hub Pharmaceuticals, LLC, California, EUA)
- Rose Glo (Tira estéril de Rosa Bengala) – (Fabricado por Hub Pharmaceuticals, LLC, California, EUA)

## 10.2. Anexo 2

### **Escala de avaliação com lâmpada de fenda para graduar a inflamação ocular**

Oftalmoscopia indireta e reflexos neuro-oftalmológicos para clareza do meio ocular. Sistema adaptado de pontuação McDonald-Shadduck, modificado por C. Murphy e posteriormente por R.H. Scagliotti

#### **Clareza do Meio Ocular**

0 = Meio ocular limpo. O reflexo tapetal atravessa a pupila; a cor tapetal refletida é distinta e forte. Oftalmoscopia indireta pode claramente focar vasculatura retiniana secundária e terciária e cabeça do nervo óptico. O reflexo de ameaça e ofuscamento são positivos.

1 = O reflexo tapetal é visível, mas um pouco sem forma. Oftalmoscopia indireta revela a vasculatura secundária e terciária da retina e a cabeça do nervo óptico, mas com imagem um pouco borrada. Os reflexos de ameaça e ofuscamento são positivos.

2 = O reflexo tapetal está severamente suprimido. A córnea pode estar nebulosa e a câmara anterior permite a visualização da íris e lente e o vítreo permite visualização das artérias e veias da vasculatura retiniana. Pode haver perda de detalhes do nervo óptico. Os reflexos de ameaça e ofuscamento são positivos.

3 = A córnea apresenta edema e a câmara anterior apresenta *flare* e pode ter também hipópio. A íris é visível e edematosa. Pouco se alcança ver o reflexo tapetal e o segmento posterior não pode ser avaliado. O reflexo de ameaça tem resposta variável e o reflexo de ofuscamento é positivo.

4 = A córnea é edematosa e a câmara anterior turva com hipópio. Pouco se vê a íris. O reflexo de ameaça é ausente e o reflexo de ofuscamento tem resposta variável.

## **Pálpebras**

0 = Superfície normal e glândulas de Meibômio normais. Superfície livre de foliculose e outras alterações de pele como escoriação, eritema ou pêlos quebrados.

1 = Meibomite e/ou foliculose (pêlos quebrados e inchaço)

2 = Meibomite e/ou foliculose, sinais de escoriação (alopecia, eritema, pêlos quebrados)

3 = Meibomite e/ou foliculose, sinais de escoriação (alopecia, eritema, pêlos quebrados), edema de pálpebra, pústulas e pápulas

## **Córnea**

0 = Córnea normal. Com a lâmpada de fenda observa-se uma linha brilhante cinza na superfície epitelial e uma linha brilhante cinza na superfície endotelial com uma aparência sólida do estroma.

1 = Alguma perda de transparência. Observando com a secção óptica da lâmpada de fenda, apenas a metade anterior do estroma está envolvida. As estruturas subjacentes são claramente visíveis com iluminação difusa, apesar de poder haver alguma nebulosidade.

2 = Perda de transparência moderada. Adicionalmente ao envolvimento do estroma anterior, a nebulosidade se estende até o endotélio. O estroma tem perda da sua aparência marmoreada e é homogeneamente branco. Com iluminação difusa, as estruturas subjacentes são claramente visíveis.

3 = Envolvimento da espessura total do estroma. Com a secção óptica, a superfície endotelial é ainda visível. No entanto, com iluminação difusa mal se alcança ver as estruturas subjacentes (observador ainda consegue graduar *flare*, irite, resposta pupilar e alterações na lente)

4 = Envolvimento da espessura total do estroma. Com a secção óptica, não consegue visualizar o endotélio. Com iluminação difusa, não se vê estruturas subjacentes. Não é possível graduar *flare* aquoso, irite, alterações na lente ou resposta pupilar.

### **% Opacidade Corneal**

0 = Córnea normal sem áreas de opacidade

1 = 1 a 25% de opacidade

2 = 26 a 50% de opacidade

3 = 51 a 75% de opacidade

4 = 76 a 100% de opacidade

### **Vascularização Corneal**

0 = Sem vascularização corneal

1 = Vascularização está presente, mas as veias não invadem toda a circunferência da córnea. Invasão vascular não penetra mais do que 2 milímetros.

2 = Vasos invadem 2 milímetros ou mais de toda a circunferência da córnea.

### **Congestão Conjuntival**

0 = Normal. Pode aparecer pálido a rosa avermelhada sem injeção perilímbica (exceto nas posições 12h e 6h) com vasos nas conjuntivas palpebral e bulbar facilmente observados.

1 = Uma cor avermelhada mais forte predominantemente na conjuntiva palpebral com alguma injeção perilímbica, mas principalmente nas partes superior e inferior do olho, nas posições de 4h a 7h e de 11h a 1h.

2 = Cor vermelho brilhante na conjuntiva palpebral acompanhado de injeção perilímbica cobrindo pelo menos 75% da circunferência corneal na região do limbo.

3 = Vermelho escuro e intenso com congestão tanto da conjuntiva bulbar quanto da conjuntiva palpebral com injeção perilímbica pronunciada e presença de petéquias na conjuntiva. As petéquias predominam a terceira pálpebra e a conjuntiva palpebral superior.

### **Quemose**

0 = Normal, sem inchaço do tecido conjuntivo.

1 = Inchaço acima do normal, mas sem eversão das pálpebras (percebe-se que as pálpebras estão na posição correta); inchaço geralmente começa no canto interno do saco conjuntival inferior.

2 = Inchaço com desalinhamento da posição normal das pálpebras superior e inferior; principalmente na pálpebra superior, com eversão parcial. Nesse estágio, pode-se observar também inchaço no saco conjuntival inferior.

3 = Inchaço pronunciado com eversão parcial das pálpebras superior e inferior. Facilmente detectável com o animal com a cabeça levantada, se as margens palpebrais não se tocam, há eversão.

4 = Eversão pronunciada da pálpebra superior e inferior. É difícil retrair as pálpebras para observar região perilímbica.

### **Secreção Ocular**

0 = Normal. Sem secreção

1 = Secreção presente na porção interna do olho, mas não nas pálpebras ou pêlos.

2 = Secreção é abundante, facilmente observada, e pode ser coletada das pálpebras e pêlos ao redor dos olhos.

3 = Secreção flui através das pálpebras, molhando a pele e os pêlos ao redor dos olhos.

### **Secreção: Cor e Consistência**

0 = Normal. Sem secreção.

1 = Presente na porção interna das pálpebras e é serosa (limpa) ou mucóide (branca/cinza).

2 = Secreção é abundante, facilmente observada, pode ser coletada das pálpebras e pêlos e é amarela ou verde.

3 = Secreção flui pelas pálpebras e molha a pele e pêlos com uma secreção amarela ou verde. Apresenta odor fétido.

### **Flare Aquoso**

0 = Nenhuma proteína é visível na câmara anterior quando observada por biomicroscopia de lâmpada de fenda, com feixe pequeno, brilhante e alta magnificação.

1 = Vestígio. Uma pequena quantidade de proteína é detectável na câmara anterior. Esta proteína é visível apenas com uma análise cuidadosa por um

observador experiente usando lâmpada de fenda, com fenda focal fina e feixe de luz branca.

2 = Quantidade moderada de proteína é detectável na câmara anterior. A presença de proteína na câmara anterior é imediatamente aparente para um observador experiente, utilizando lâmpada de fenda e alta magnificação, mas a olho nu é detectável apenas sobre boa iluminação e observação cuidadosa.

3 = Quantidade moderada de proteína é detectável na câmara anterior. É similar ao 2, no entanto a opacidade é visível a olho nu com qualquer tipo de iluminação.

4 = Grande quantidade de proteína é detectável na câmara anterior. Similar ao 3, porém a densidade da proteína se assemelha à lente. Adicionalmente, há deposição de fibrina frequentemente em circunstâncias agudas. É necessário notar que, como a fibrina pode persistir por um período de tempo após a restauração parcial ou total da barreira hemato aquosa, é possível haver fibrina reabsorvendo mesmo em uma pontuação menor desta escala.

### **Celularidade do Humor Aquoso**

0 = Nenhuma celularidade é vista em campo de observação com a lâmpada de fenda. Ausência de células ao realizar varredura com o feixe de luz da lâmpada de fenda.

1 = Traços raros de celularidade (1 a 5 células) são vistos em um campo de foco com a lâmpada de fenda. Quando a fenda é colocada estática não se observam secções com células circulantes.

2 = 5 a 25 células são observadas em um único campo de observação com a lâmpada de fenda. Quando o instrumento é colocado estático, cada secção da câmara anterior contém células circulantes.

3 = 50 a 100 células são observadas na câmara anterior com a lâmpada de fenda. Quanto o instrumento é colocado estático, cada secção da câmara anterior contém células circulantes. Precipitados ceráticos ou depósitos celulares podem ser vistos na cápsula anterior da lente.

4 = Acima de 100 células são observadas na câmara anterior. Quando o instrumento é colocado estático, cada secção da câmara anterior contém células circulantes. Precipitados ceráticos ou depósitos celulares podem ser vistos na cápsula anterior da lente. Deposição de fibrina, hipópio ou "*clumps*" de células podem persistir um período de tempo depois de já haver cessado a exsudação de células para a câmara anterior. Por isso, é possível haver hipópio em reabsorção mesmo em uma pontuação menor desta escala.

### **Cor da Celularidade (Se há celularidade presente)**

Predominantemente marrom (> que 75%)

Predominantemente branca (> que 75%)

Mistura de várias cores

### **Íris**

0 = Normal

1 = Hiperpigmentada (escurecimento manchado a chocolate escuro)

2 = Congestão vascular, edema de íris, neovascularização de íris

3 = Sem resposta a luz direta, congestão vascular, edema de íris, neovascularização de íris, sinéquia anterior ou posterior.

### **Lente**

A lente é prontamente observada com o auxílio da lâmpada de fenda e a localização da opacidade lenticular pode ser definida através de iluminação

direta e retroiluminação. A localização da opacidade lenticular pode ser arbitrariamente dividida nas seguintes regiões que foram modificadas do exame do CERF (*Canine Eye Registry Foundation*).

A lente pode ser classificada em:

0 = Normal

1 = Anormal

E no caso de anormalidade, deve-se classificar a opacidade e localização da seguinte forma:

Cápsula anterior – difusa ou puntata

Córtex anterior – difusa ou puntata

Córtex equatorial – difusa ou puntata

Suturas anteriores – difusa ou puntata

Suturas posteriores – difusa ou puntata

Córtex posterior – difusa ou puntata

Cápsula posterior – difusa ou puntata

Generalizada – difusa ou puntata

### **Vítreo**

0 = Normal

1 = alterações relacionadas à idade

2 = anormal, com células, hemorragia ou outro.

### **Retina**

0 = Normal

1 = Anormal (Descrever)

**Coloração por Fluoresceína**

0 = nenhuma área corada por Fluoresceína

1 = 1 a 25% da superfície corneal está positiva

2 = 26 a 50% da superfície corneal está positiva

3 = 51 a 75% da superfície corneal está positiva

4 = 76 a 100% da superfície corneal está positiva

**Coloração por Rosa Bengala**

0 = nenhuma área corada por Rosa Bengala

1 = 1 a 25% da superfície corneal está positiva

2 = 26 a 50% da superfície corneal está positiva

3 = 51 a 75% da superfície corneal está positiva

4 = 76 a 100% da superfície corneal está positiva

### 10.3. Anexo 3

Questionário oral o qual proprietários deveriam responder em todos os momentos de avaliação. Antes de iniciar o questionamento, proprietários eram orientados que, quanto menor a nota pior a resposta, sendo 0 muito ruim e 10 excelente:

1 – Atribua uma nota de 0 a 10 ao conforto observado após a aplicação da injeção. Considerar aqui se o cão está se coçando, se fica com os olhos fechados ou incomodado pela luz.

2 – Atribua uma nota de 0 a 10 para a lubrificação ocular observada após a aplicação da injeção. Considerar aqui se os olhos estão mais brilhantes e a necessidade de instilar colírio lubrificante durante o dia.

3 – Atribua uma nota de 0 a 10 para a secreção ocular observada após a aplicação da injeção. Considerar aqui se a quantidade de secreção está diminuindo e se houve mudança no aspecto dessa secreção.

4 – Atribua uma nota de 0 a 10 para a inflamação ocular após aplicação da injeção. Considerar aqui o quanto os olhos têm ficado vermelhos.