

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/01/2026.

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

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

CAROLINE MEDEIROS GERALDINI

BOTUCATU – SP

JANEIRO/2024

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

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

CAROLINE MEDEIROS GERALDINI

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

Orientadora: Cláudia Valéria Seullner
Brandão

BOTUCATU – SP
JANEIRO/2024

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

Geraldini, Caroline Medeiros.

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

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

Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão
Capes: 50501003

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

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

Nome do autor: CAROLINE MEDEIROS GERALDINI

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Titular Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

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

Prof.^a Luciane dos Reis Mesquita

Membro interno

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

M.V. Daniela Nogueira Cremonini

Membro externo

Pet Vision Clinica Veterinaria. São Paulo – SP.

Prof.^a Natalie Bertelis Merlini

Membro externo

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

Prof. Victor José Vieira Rossetto.

Membro externo

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

Data da defesa: 23 de janeiro de 2024

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

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

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

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

TRFL: teste de ruptura do filme lacrimal

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

SUMARIO

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

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

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

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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

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

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

6 CONFLITO DE INTERESSE

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

7 AGRADECIMENTOS

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

8 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

Sep;39(7):641–51.

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