

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CÉLULAS TRONCO NO TRATAMENTO DA
CERATOCONJUTIVITE SECA E *BREAK UP TIME TEST* NOS
PERÍODOS PRÉ, TRANS E PÓS OPERATÓRIO EM CÃES
(*Canis lupus familiaris*).**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DENISE GUIMARÃES OLIVEIRA

GUARAPUAVA- PR

2019

DENISE GUIMARÃES OLIVEIRA

CÉLULAS TRONCO NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUTIVITE SECA E *BREAK UP TIME TEST* NOS PERÍODOS PRÉ, TRANS E PÓS OPERATÓRIO EM CÃES (*Canis lupus familiaris*).

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Giuliana Gelbcke Kasecker
Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2019

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Santa Cruz

O48c Oliveira, Denise Guimarães
Células tronco no tratamento da ceratoconjuntivite seca e *break up times test* nos períodos pré, trans e pós-operatório em cães (*Canis lupus familiaris*) / Denise Guimarães Oliveira. -- Guarapuava, 2019.
ix, 59 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, 2019.

Orientadora: Giuliana Gelbcke Kasecker
Banca examinadora: Giuliana Gelbcke Kasecker, Katherinne Maria Spircoski, Heloísa Godoi Bertagnon

Bibliografia

1. Ciências Veterinárias. 2. CCS. 3. Deficiência lacrimal. 4. Teste de Schirmer. 5. Terapia celular. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.


| CDD 636.089


Denise Guimarães Oliveira

Células tronco no tratamento da ceratoconjuntivite seca e break up time test nos períodos pré, trans e pós-operatório em cães (Canis lupus familiaris)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2019.


Prof.ª. Dr.ª. Giuliana G. Kasecker Botelho
(UNICENTRO)


Prof.ª. Dr.ª. Katherinne Maria Spencoski
(UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


Prof.ª. Dr.ª. Heloisa Godoi Bertagnon
(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR
2019

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 065/2017 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 06 de novembro de 2017.

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "*Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no tratamento da ceratoconjuntivite seca em estágios iniciais e crônicos.*", protocolo número 028/2017, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição.
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - ~ Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
 - ~ Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - ~ **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Profa. Dra. Giuliana Gelbecke Kasecker
Atenciosamente,


Presidente do CEUA

A senhora
Profa. Dra. Giuliana Gelbecke Kasecke
UNICENTRO-CEDETEG

**Universidade Estadual do Centro-Oeste**

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Campus CEDETEG: Rua Símeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8166 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR.
e-mail: ceua_unicentro@yahoo.com.br

Protocolo: 028/2017

Data de entrada: 24/08/2017

Interessado: Profa. Dra. Giuliana Gelbcke Kasecker

Título do Projeto: Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no tratamento da ceratoconjuntivite seca em estágios iniciais e crônicos

Finalidade: Pesquisa

Data de Início: 10/01/2018

Data de término: 20/11/2018

PARECER:

Trata-se de reavaliação de um projeto de pesquisa pendente com reformulação. O projeto encontra-se dentro das especificações regulamentadas e necessitava-se apenas da inclusão do termo livre esclarecido, que foi apensado no projeto

VOTO DO RELATOR: Aprovado



FAED – Faculdade Educacional de Dois Vizinhos
 Av. Presidente Kennedy, 2601 - Bairro Nsa. Sra. Aparecida
 CEP 85660-000 - Dois Vizinhos – PR

Fone/Fax (46) 3581-5000 - www.unisep.edu.br - unisep@unisep.edu.br

FEFB – Faculdade Educacional de Francisco Beltrão

Av. União da Vitória, 14 – Bairro Miniguaçu

CEP 85605-040 – Francisco Beltrão - PR

Fone/Fax (46) 3520-5000 - www.unisep.edu.br - unisepfxfb@unisep.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Diferença no tempo de ruptura lacrimal em cães antes, durante e depois do procedimento anestésico**”, protocolo nº **006/2018**, sob a responsabilidade de Denise Guimarães Oliveira e Mayara Karoline de Castro que envolve a determinação a diferença no tempo de ruptura lacrimal em cães antes, durante e após o procedimento anestésico, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNISEP) DA UNIÃO DE ENSINO DO SUDOESTE DO PARANÁ – UNISEP, em reunião do dia 11 de maio de 2018.

Vigência do Projeto	180 dias
Espécie/Linhagem	Cães
Nº de Animais	20
Peso/Idade	0 a 40 kg/1 a 17 anos
Sexo	M + F
Origem	Propriedade Particular

O presente certificado foi expedido de acordo com o art. 10, V da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e com a Orientação técnica nº 5 de 27 de abril de 2015.

Dois Vizinhos, 15 de maio de 2018.

Acir Felipe Grolli Carvalho Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos dirigem-se primeiramente a Deus, que me proporcionou as oportunidades para que eu chegasse até aqui. Especialmente proporcionou que eu encontrasse pessoas que acreditaram no meu potencial e nos meus sonhos, e a primeira delas é a quem dirijo meus próximos agradecimentos: Minha mãe. Meus pais, que não mediram esforços para que eu me tornasse o que sempre sonhei, têm um papel fundamental na minha carreira e na minha vontade de continuar estudando.

Agradeço aos meus mestres. Meus professores da graduação e da pós-graduação, em quem eu sempre me espelhei e que com seus exemplos fortaleceram minha vontade de seguir a carreira acadêmica, especialmente a minha orientadora professora Giuliana.

Agradeço aos Médicos Veterinários que abriram suas portas e confiaram seus pacientes a mim, e que além de colegas acabaram se tornando também amigos. Às equipes das clínicas Vetclin® e Mundo Animal® de Dois Vizinhos-PR, Menin Centro Clínico Veterinário® e Vital Clínica Veterinária® de Francisco Beltrão-PR, Consultório Veterinário Cãogaroto® de Nova Prata do Iguçu-PR, e Clínica Escola Veterinária da Unicentro - CEVET® de Guarapuava-PR, muito obrigada.

Agradeço aos proprietários dos cães que participaram do estudo, pela confiança que depositaram em mim e por disponibilizarem seu tempo nas reavaliações mensais.

Agradeço ao laboratório CELLVET® Medicina Veterinária Regenerativa pelo preparo e envio das células tronco. À DROGAVET® Farmácia de Manipulação Veterinária, pelo preparo e envio dos testes oculares. Ao Hospital Veterinário UNISEP por ceder seu espaço para a execução das aplicações e avaliações.

RESUMO

Denise Guimarães Oliveira. Células tronco no tratamento da ceratoconjuntivite seca e break up time test nos períodos pré, trans e pós-operatório em cães (*Canis lupus familiaris*).

O sistema lacrimal tem como principal função a proteção ocular. Alguns fatores podem levar a diminuição na produção lacrimal e assim a lesões secundárias. A ceratoconjuntivite seca é uma doença que leva a esta diminuição e assim a lesões corneanas, e apesar de haver tratamentos para a mesma, ainda não há cura definitiva. As células tronco têm se tornado foco de diversas doenças e apesar de sua ação não ser totalmente compreendida, esta terapia é relatada como segura. Diante disto, objetivou-se com este trabalho relatar os efeitos da aplicação de células tronco mesenquimais em cães com ceratoconjuntivite seca, por duas vias de aplicação. Outro objetivo do presente trabalho foi o relatar os efeitos de dois protocolos anestésicos na produção lacrimal em cães hígidos, já que a anestesia é outro fator que pode levar a diminuição lacrimal. Quanto a aplicação das células tronco houve efeitos benéficos distintos entre as duas vias, sendo que os animais que as receberam em forma de colírio tiveram melhora significativa nos sinais clínicos e aqueles que receberam injeções periglandulares tiveram aumento significativo no teste de *Break Up Time* (BUTT), compatíveis com uma evolução favorável para os pacientes. Na avaliação dos protocolos anestésicos, foi observado decréscimo na produção lacrimal nos períodos trans e pós-anestésico em ambos, sem diferenças significativas entre eles. Diante disto, sugere-se que cães que sejam anestesiados com estes fármacos recebam lubrificantes oculares, e que resultados obtidos no BUTT nestes períodos sejam reavaliados após a alta anestésica para evitar um diagnóstico errôneo de ceratoconjuntivite seca.

Palavras-chave: CCS, deficiência lacrimal, Teste de *Schirmer*, terapia celular.

ABSTRACT

Denise Guimarães Oliveira.

Stem cells in the treatment of keratoconjunctivitis sicca and assessment of break up time test values in the pre, trans and postoperative periods in dogs (*Canis lupus familiaris*).

The main function of the lacrimal system is the eye protection. There are some factors that can lead to decrease in lacrimal production and thus to secondary lesions. Keratoconjunctivitis sicca leads to decrease of lacrimal film and therefore to corneal lesions. There are treatments for such condition, however definitive cure don't exist yet. Recently, the treatment of several diseases with stem cells became more relevant and although their action is not completely understood, this therapy is considered harmless. This study reports the effects of the application of mesenchymal stem cells in dogs with keratoconjunctivitis sicca, applied by two different routes. Another study was conducted objectifying to report the effects of two anesthetic protocols on lacrimal production in healthy dogs, since anesthesia is another factor that may lead to lacrimal reduction. Regarding the cell therapy, there were distinct beneficial effects between the two types of application. The animals that received stem cells as eye drops had significant improvement in clinical signs and those receiving periglandular injections had a significant increase in the Break Up Time (BUT) test, compatible with favorable patient outcomes. In the patients undergoing to anesthesia with two different protocols, it was observed that there was a decrease in the tear production in the trans and post-anesthetic periods in both cases, without significant differences between them. These results suggested that both protocols demand ocular lubrication. The results obtained in BUT in dogs under general anesthesia must be reevaluated after recovering to avoid misdiagnosis of keratoconjunctivitis sicca.

Palavras-chave: KCS, lacrimal deficiency, *Schirmer* Test, cell therapy.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BUTT – *Break Up Time Test*

CCS – *Ceratoconjuntivite seca*

CTM- *Células Tronco mesenquimais*

CTMad- *Células Tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo*

Ig – *Imunoglobulinas*

IgA- *Imunoglobulinas A*

IgG- *Imunoglobulinas G*

IgM- *Imunoglobulinas M*

mm/min – *Milímetros por minuto*

TS- *Teste de Schirmer*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Sistema lacrimal.....	15
2.2 Ceratoconjuntivite seca.....	16
2.2.1 Sinais clínicos e etiopatogenia.....	16
2.2.2 Diagnóstico	17
2.2.3 Tratamento e prognóstico	18
2.2.4 Células Tronco	20
2.3 <i>Break Up Time</i> nos períodos pré, trans e pós-anestésico.....	23
3 REFERÊNCIAS	25
4 CAPÍTULO 1 Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo administradas por via tópica e injetável em cães com ceratoconjuntivite seca	32
5 CAPÍTULO 2 Teste de Schirmer e <i>Break Up Time</i> em cães mantidos sob dois diferentes protocolos anestésicos.....	48

1. INTRODUÇÃO

A ceratoconjutivite seca (CCS) é uma enfermidade decorrente da deficiência lacrimal que causa consequências na córnea, visto que a lágrima tem como principal função a proteção desta superfície (GUSSONI & BARROS, 2003). É uma doença comum em cães (GELLAT & GELLAT, 2011) e humanos que leva a um quadro de ressecamento ocular e irritação constantes (DEWS, 2007). Além da irritação, outros sinais clínicos comuns são secreção ocular, úlcera corneana e, em casos crônicos, opacidade ou pigmentação na córnea (MILLER, 2008).

Hoje em dia há tratamentos conservativos e cirúrgicos para controle da doença, porém ambos possuem desvantagens. As técnicas cirúrgicas podem apresentar complicações e os fármacos tópicos que segundo Gellat e Gellat (2011) e Zhang et al. (2014) constituem o tratamento conservativo convencional, podem não levar à resposta satisfatória em alguns pacientes (WILLIAMS, 2017).

O pouco tempo de permanência dos colírios na superfície corneana e a exigência da alta frequência de administração destes em pacientes com CCS são razões relatadas pelas quais alguns pacientes não respondem bem aos produtos disponíveis no mercado (ANGÉLICO et al., 2011; FAN, 2016; SOARES & FRANÇA, 2005).

Os tratamentos cirúrgicos que visam a substituição da glândula lacrimal por glândulas salivares têm apresentado boa resposta. Isto se deve ao fato de a saliva ter propriedades parecidas com as da lágrima, podendo ser uma boa substituta da mesma, porém caso o paciente apresente alterações bucais, estes procedimentos são contraindicados (SOARES & FRANÇA, 2005). Além disto, pode ocorrer uma superprodução de saliva, levando à epífora e à dermatite úmida periocular, e a deposição de cálcio na superfície ocular (WILLIAMS, 2017).

A terapia com células tronco tem se tornado foco de muitas pesquisas, devido ao potencial de diferenciação destas células (MONTEIRO, 2010), e já é utilizada na Medicina Veterinária em diversas afecções de cães, gatos e equinos (ALI et al., 2016).

Alguns experimentos com aplicação de células tronco em pacientes com CCS já foram realizados, sendo observada melhora especialmente em animais com a doença em fase inicial (PEIXOTTO, 2013; MOTTIN et al., 2015; VILLATORO et al., 2015; BITTENCOURT et al., 2016).

Devido a inúmeras pesquisas acerca da CCS em cães, torna-se evidente a importância de estudos que verifiquem novos tratamentos para a afecção, já que nenhum dos tratamentos conhecidos é totalmente eficaz (ANGÉLICO et al., 2011; ZHANG et al., 2014; WILLIAMS, 2017). VILLATORO et al. (2015) descreveram as terapias regenerativas como uma nova perspectiva para o tratamento da CCS. Sendo assim, e tendo em consideração que a aplicação de células tronco não leva a alterações que contraindiquem seu uso (ALI et al., 2016; BITTENCOURT et al., 2016), objetiva-se com este trabalho, avaliar a eficácia do uso das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães.

Um outro objetivo foi obter e comparar os resultados do teste de *Break Up Time* (BUTT) nos períodos pré, trans e pós-anestésico de cães hígidos.

O BUTT avalia a produção qualitativa da lágrima (LEE & KEE, 1988) e a variação dos resultados deste teste em cães sob efeito de anestesia geral não são descritos. Baseando-se no estudo realizado por CULLEN et al. (2005) que mensuraram o BUTT em pacientes felinos hígidos sob anestesia, confirmando um decréscimo dos valores do mesmo no período trans-anestésico e na informação comprovada em estudos com cães de que os valores de outro teste lacrimal, o ST diminuem durante o período trans-anestésico, demonstrando uma diminuição na porção aquosa lacrimal (HERRING et al., 2000; SHEPARD et al., 2011; GELLAT, 2013), esta pesquisa tem por objetivo confirmar que ocorre também uma diminuição nos valores do BUTT, e assim na porção qualitativa da lágrima, durante a anestesia. CULLEN et al. (2005) entre outras considerações, sugeriram que estudos posteriores sejam realizados comparando protocolos anestésicos diferentes, portanto outro objetivo deste estudo foi comparar as variações do BUTT em animais mantidos sob dois diferentes protocolos anestésicos.

A diminuição dos parâmetros destes testes durante o tempo em que um paciente permanece anestesiado, reafirma a importância de que os mesmos recebam lubrificantes oculares neste período, já que o animal não tem a capacidade de fechar as pálpebras, conforme afirmam SANCHEZ et al. (2006) e HERRING et al. (2000). Além disto, demonstra que valores obtidos no BUTT quando o animal está sob efeito de anestesia geral, podem levar à um falso diagnóstico de CCS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistema lacrimal

O sistema lacrimal é composto por glândulas secretoras, pelo filme pré-corneano e pelos ductos excretores (MILLER, 2008). Sua porção secretora é constituída pela glândula lacrimal principal, a glândula da terceira pálpebra e as glândulas acessórias. O filme pré-corneano recobre a córnea e a conjuntiva e é responsável pela sanidade e nutrição dos mesmos. Ele é composto por três camadas, sendo denominadas lipídica, aquosa e mucosa (GUSSONI & BARROS, 2003).

A primeira camada é a mais externa, denominada lipídica. Esta tem a função de evitar a evaporação da lágrima, bem como seu transbordamento por alta tensão na superfície e pode ser observada como uma camada oleosa sobre a superfície ocular. Ela pode ser removida com shampoos ou drogas que possuam conservantes com propriedades detergentes, sendo esta uma preocupação na causa de um possível ressecamento com posterior ulceração corneana (MILLER, 2008). Os lipídios presentes na primeira camada são produzidos nas glândulas tarsais ou de meibônio. Já na glândula lacrimal principal e na glândula da terceira pálpebra, é produzida a substância aquosa que constitui a segunda camada ou porção intermediária da lágrima (GUSSONI & BARROS, 2003). Segundo EVANS & de LAHUNT (2013), a camada aquosa contém vários fatores importantes para a manutenção da saúde corneana. É nela que estão presentes substâncias antimicrobianas e as imunoglobulinas (Ig), como IgA, IgG e IgM.

A camada mucínica é a mais interna, responsável pelo aumento o tempo de contato entre a lágrima e o epitélio da córnea, e é produzida pelas células caliciformes da conjuntiva (GUSSONI & BARROS, 2003).

As secreções são distribuídas na superfície ocular após o movimento de piscar associado ao da terceira pálpebra (GUSSONI & BARROS, 2003). Quando o filme lacrimal que recobre a superfície do olho começa a evaporar, a mudança da temperatura ocular deflagra o reflexo de piscar o olho, distribuindo assim o filme novamente sobre a córnea (SHEPARD et al., 2011).

Depois de se espalhar pela córnea, a maior parte da lágrima é eliminada, por escoamento, pelas vias de drenagem, atingindo o canalículo lacrimal e o ducto lacrimal e fluindo para o vestíbulo nasal (EVANS & de LAHUNTA, 2013). Para que ocorra esta

eliminação da lágrima ocorrem alguns eventos que a conduzem a este sistema de drenagem. São eles o ato de piscar, associado às ações gravitacionais e de capilaridade e ainda dilatação do canalículo. Há ainda uma menor parte da lágrima que sai do olho por evaporação (GUSSONI & BARROS, 2003).

2.2. Ceratoconjuntivite seca

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou olho seco é uma doença decorrente da deficiência da produção lacrimal, que acomete comumente cães (GELLAT & GELLAT, 2011), sendo que a prevalência nesta espécie não está completamente definida (WILLIAMS, 2017).

2.2.1 Sinais Clínicos e etiopatogenia

A CCS provoca uma série de alterações causadas pela ausência da proteção do filme lacrimal sobre a córnea e a conjuntiva (HIDA et al., 2005). Sendo assim, os sinais clínicos podem variar, mas incluem blefaroespasma, secreção mucopurulenta ou mucoide, e ainda ulceração, vascularização e pigmentação corneana (MILLER, 2008).

WILLIAMS (2017) descreveu recentemente em animais com CCS o sinal de perda do brilho corneal. Quando fazemos o exame ocular com uma lanterna apropriada, em um olho normal podemos perceber uma reflexão cristalina, gerada pela correta cobertura da lágrima sobre a superfície corneana, porém isto se perde quando há deficiência da proteção lacrimal. O autor também descreveu a hiperemia como um sinal da CCS, e enfatizou que é importante diferenciá-la daquela presente em casos de uveíte. A hiperemia pode ser vista com a abertura ampla das pálpebras superior e inferior, apresentando-se como uma vermelhidão na superfície conjuntiva, caracterizando um quadro de conjuntivite.

Se em um cão estiverem presentes os sinais de vermelhidão ocular e secreção mucopurulenta ou mucoide, orienta-se a realização do teste de *Schirmer* (TS), a fim de descartar ou confirmar a presença de distúrbios de produção lacrimal (WILLIAMS, 2017). Segundo HIDA et al. (2005) e HARTLEY (2006) este teste que avalia a produção quantitativa da lágrima é o exame convencional para confirmação da CCS.

Segundo WILLIAMS (2008), prezando pelo diagnóstico precoce, cães de raças

braquicefálicas ou idade avançada deveriam ter o TS feito como rotina sempre que passarem por uma avaliação clínica devido a sua maior predisposição a CCS.

A etiopatogenia da doença ainda não é bem compreendida (WILLIAMS, 2008), mas sabe-se que ela pode ter etiologia variada (MILLER, 2008). Ela pode ser causada por deficiência na produção lacrimal ou por alterações que causem a evaporação precoce. Esta última condição é vista mais comumente em cães braquicefálicos, onde a ausência do fechamento total da pálpebra ou a deficiência na porção lipídica do filme lacrimal fazem com que a lágrima evapore mais rapidamente (WILLIAMS, 2008).

Segundo WILLIAMS (2017), algumas raças têm maior predisposição à doença, sendo elas: West Highland White Terrier; Lhasa Apso; Shih Tzu; English Cocker Spaniel e Cavalier King Charles Spaniel. As raças que têm predisposição à protrusão da glândula da terceira pálpebra, também têm maior predisposição à ocorrência de CCS. Sendo assim, o autor ressalta a importância do sepultamento, e não da retirada desta quando protruída.

HARTLEY et al. (2011), relataram casos de animais da raça Cavalier King Charles Spaniel com CCS associada à ictiose, uma afecção dermatológica incomum em cães. Nestes casos, os proprietários percebiam conjuntivite ou ulceração corneana logo que os animais abriam os olhos após o nascimento. Nestes animais, foi associada uma herança genética para a síndrome.

A prevalência também muda de acordo com a idade dos animais, sendo que cães mais velhos tendem a ser mais predispostos ao ressecamento ocular (WILLIAMS, 2008).

2.2.2 Diagnóstico

O TS e o *Break Up Time (BUTT)* são os métodos diagnósticos convencionais que confirmam a doença (DEWS, 2007).

WILLIAMS (2017) descreveu valores normais para o teste de TS entre 10 a 20mm, mas estudos recentes sugerem que valores entre 10 e 15mm/min se tratam de casos com a doença subclínica. Este autor ainda ressaltou que as raças predispostas à doença tendem a ter um tempo menor no TS. Mas assim como descrito por MILLER (2008) e JONES & CRISPIN (2002), um valor abaixo de 10mm/min associado aos sinais clínicos é considerado diagnóstico da doença. HIDA et al. (2005) afirmaram, em testes com humanos, que o resultado do TS não tem diferença se o olho está aberto ou fechado durante a realização da mensuração.

O TS pode parecer normal quando na deficiência de mucina e lipídios da lágrima, alteração que faz com que a evaporação seja precoce. Nestas condições, outros exames são válidos (WILLIAMS & HEWITT, 2017), como o teste de *Break up time* (BUTT) que é um método simples e efetivo de avaliar a estabilidade do filme lacrimal (LEE & KEE, 1988).

Normalmente, no ato de piscar, o filme pré corneal é espalhado pela superfície ocular, e com o passar do tempo se o olho permanecer aberto, o filme começa a evaporar e uma falha do filme é visualizada (NORN, 1969). No teste de *Break up time* (BUTT), mensura-se este tempo, chamado tempo de ruptura lacrimal, sendo a visualização do ponto de falha facilitada pela fluoresceína. Após pingar este corante na conjuntiva bulbar, é mensurado o tempo entre a abertura palpebral e o aparecimento do primeiro ponto de ressecamento corneal, que diante de uma luz que evidencie a fluoresceína notando-se uma fenda enegrecida (LEE & KEE, 1988).

SAITO & KOTANI (2001) avaliaram o BUTT nos olhos de cães hípidos da raça Beagle e a média de tempo da ruptura lacrimal foi de 21,53 segundos, quando o TS estava na normalidade, com média de 18,8 mm/min. Assim, demonstrou-se que em cães normais os valores de BUTT se encontram em torno de vinte segundos, o que também foi afirmado por GIULIANO (2013) que complementou que nos animais que possuem uma deficiência de mucina, o tempo de ruptura lacrimal geralmente se encontra em menos de cinco segundos.

2.2.3 Tratamento e prognóstico

Há algumas questões que ainda não foram elucidadas sobre a CCS, quanto à progressão e o prognóstico da doença, o sucesso do tratamento e a possibilidade de descontinuar o uso de lubrificantes após um longo tempo de uso (DEWS, 2007).

Deve-se começar a tratar a deficiência na produção lacrimal assim que ela for confirmada, e de preferência quando se encontrar em estágio inicial, antes do olho sofrer as alterações decorrentes da cronicidade da doença (WILLIAMS, 2017).

Segundo Gelatt (2011), o tratamento inclui substitutos da lágrima e estimulantes da sua produção visando a proteção corneal. São conhecidos lacrimoestimulantes com ação imunossupressora e anti-inflamatória como a ciclosporina A, o pircrolimus e o tacrolimus (RIBEIRO et al., 2008).

Quando a CCS tem como causa a ressecção da glândula da terceira pálpebra, o tratamento convencional pode não fazer efeito, já que sua ação benéfica se dá pela estimulação da glândula lacrimal (WILLIAMS, 2017).

ANGÉLICO et al. (2011) afirmaram que o tratamento tópico ainda não é suficientemente eficaz, principalmente por exigir muita disciplina do proprietário. Segundo SOARES & FRANÇA (2005), nos pacientes humanos com ceratoconjutivite seca, o tratamento conservador existente também não apresenta sucesso apesar de haver inúmeros produtos para tal no mercado.

FAN et al. (2016) relataram que a falta de adesão e absorção na córnea faz com que os colírios convencionalmente utilizados para o tratamento da ceratoconjutivite seca tenham pouco tempo de viabilidade, por isso testaram a nanotecnologia na formulação do pirecrolimus. Segundo os autores, com moléculas encapsuladas em sistemas transportadores nanodimensionados, o fármaco penetra e adere melhor na córnea.

A busca de um tratamento que seja efetivo para promover a produção lacrimal, levando a uma correta lubrificação ocular, sem a necessidade do uso contínuo de medicamentos como no tratamento convencional, justifica a investigação de novas terapias para a doença (ANGÉLICO et al., 2011; ZHANG et al., 2014).

Além disto, WILLIAMS (2017) afirmou que há uma pequena porcentagem de animais que pode não responder aos colírios já tidos como efetivos, o que segundo CASTANHO et al. (2014) é mais comum nos pacientes que têm CCS imunomediada.

Um antagonista opioide, o Cloridrato de Naltrexona, foi testado em cães com a hipótese de que aumentasse a produção de lágrima, baseando-se em estudos feitos por ZAGON et al. (2009) em ratos com deficiência na produção lacrimal e diabetes mellitus, que se beneficiaram com o uso deste princípio em solução oftálmica. Porém, o resultado do uso deste colírio em cães, na dose e frequência testadas, não foi efetivo (CHEN & POWELL, 2015).

Alguns procedimentos cirúrgicos também podem ser indicados para diminuir a evaporação da lágrima ou para substituir a lubrificação lacrimal, sendo que cirurgias com esta segunda finalidade têm sido muito exploradas (SOARES & FRANÇA, 2005).

A saliva pode ser uma boa substituta do filme lacrimal, já que faz uma eficiente lubrificação e tem propriedades muito parecidas com a lágrima, não sendo irritante (GELATT, 2011). Além disto, por sua viscosidade, a secreção salivar tem evaporação lenta e forma assim uma camada de proteção estável e duradoura sobre a superfície ocular (SOARES & FRANÇA,

2005).

A lubrificação ocular com saliva pode ser obtida com o transplante de glândulas salivares labiais para o fórnix conjuntival, e este procedimento tem demonstrado boa resposta terapêutica em humanos (SOARES & FRANÇA, 2005) e cães (CASTANHO et al. 2014). GELATT (2011) e WILLIAMS (2017) ainda sugeriram outra técnica cirúrgica cuja finalidade é a proteção da superfície do olho com secreção salivar a partir transposição do ducto da glândula parotídea.

No entanto, SOARES & FRANÇA (2005) contraindicam estas técnicas de substituição do filme lacrimal em pacientes que tenham qualquer queixa de alterações bucais, como sensação de boca seca, gengivites ou espessamento da mucosa oral.

2.2.4 Células Tronco

O transplante de células tronco se tornou foco de inúmeras pesquisas, que têm apontado a terapia como promissora em diversas áreas (MONTEIRO, 2010), especialmente em doenças inflamatórias e imunomediadas (VILLATORO et al., 2015). Estas células se caracterizam por apresentarem grande capacidade de proliferação e auto renovação e possuem capacidade de dar origem a células especializadas de diferentes linhagens dependendo do estímulo a que forem expostas (PEREIRA, 2008). Elas não possuem características específicas fazendo com que se diferenciem em células distintas de si e especializadas de outros tecidos quando submetidas à influência destes (BARRY & MURPHY, 2004), porém os mecanismos que levam a esta diferenciação ainda são desconhecidos (BYDLOWSKI et al., 2009).

De acordo com sua origem, as células-tronco são classificadas em embrionárias ou não-embrionárias. As células-tronco não-embrionárias, também chamadas de somáticas ou adultas (BRIGNIER & GEWIRTZ, 2010) podem ser isoladas de diversos tecidos do corpo como a medula óssea, o cordão umbilical, o epitélio, a polpa do dente e o tecido adiposo (YARAK & OKAMOTO, 2010). As células-tronco mesenquimais do tecido (CTM) são um tipo de células adultas multipotentes (BRIGNIER & GEWIRTZ, 2010) que podem ser isoladas do tecido adiposo. Devido a esta origem, possuem facilidade na coleta, já que esta pode ser realizada em cirurgias eletivas, e que uma pequena quantidade de gordura fornece um número satisfatório de CTM (PATRICIO et al., 2013).

ALI et al. (2016) ressaltam que apesar de hoje em dia a terapia com células-tronco ser

utilizada em animais como cães, gatos e cavalos para tratamento de diversas afecções, ainda há pontos negativos em seu uso como os riscos de transmissão de doenças bacterianas ou virais e ainda as questões religiosas e políticas que acabam limitando seu estudo. Outro ponto importante, segundo GLENN & WHARTENBY (2014) é a dificuldade de controle de ação destas células quando utilizadas *in vivo*, já que elas respondem ao ambiente em que são aplicadas, podendo agir de formas diferentes de acordo com a situação do tecido. Há possibilidade, por exemplo, de um ambiente inflamatório gerar uma resposta diferente de um ambiente onde há supressão de células inflamatórias. Além de mais estudos acerca da caracterização precisa de populações de células-tronco mesenquimais, este autor sugeriu que a forma como elas agem em diferentes situações patológicas seja estudada.

HOFFMAN & DOW (2016) afirmaram que o estudo com células tronco em animais de companhia é importante para a Medicina Humana, já que animais de laboratório com enfermidades induzidas podem não apresentar a mesma resposta que os humanos e algumas doenças são difíceis de ser induzidas devido à sua complexidade. Estudos bem elaborados com animais que tenham a doença espontaneamente demonstram melhor as evidências de sucesso ou riscos da terapia celular, e estes autores exemplificam a importância destes estudos com animais de companhia citando diversos distúrbios comuns a animais e humanos, entre elas a CCS e a Síndrome de Sjögren que em cães é experimentalmente tratada com CTM.

FONSECA (2011) fez um estudo aplicando células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea na terceira pálpebra de coelhos e cães hípidos e concluiu que esta aplicação aumentou a produção lacrimal dos animais, com maiores números do TS obtidos no sexagésimo dia após a aplicação. As avaliações ainda demonstraram não haver efeitos que contraindiquem a terapia.

RAMOS et al. (2015) relataram o uso de células tronco derivadas da membrana amniótica em duas fêmeas caninas, da raça *Golden Retriever*, com ceratoconjutivite crônica. As células foram aplicadas nestes animais de forma injetável sob a glândula da terceira pálpebra, duas vezes com intervalo de trinta dias entre as aplicações. Estes autores concluíram que não houve melhora significativa no quadro dos dois animais, levantando a hipótese deste fato ser decorrente da cronicidade da doença e sugerindo mais estudos nas duas fases da CCS. Mas relataram redução na secreção mucopurulenta dos pacientes que já pôde ser percebida desde a primeira avaliação. Apesar deste estudo ter tido uma boa frequência de avaliações dos animais, sendo esta semanal, elas se estenderam apenas até sete dias após a segunda aplicação.

Segundo PEIXOTTO (2013), em casos crônicos pode não ocorrer melhora em função da fibrose e hipoplasia já instaladas nas glândulas, já que a diferenciação celular depende também do contato das células enxertadas com as sadias. Este autor realizou aplicação única de uma fração autóloga de células mononucleares da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra em 15 cães com CCS e os acompanhou durante 16 semanas. Os animais deste estudo tiveram o tratamento clínico convencional suspenso antes da aplicação das células e mesmo assim apresentaram uma melhora significativa do aspecto da superfície ocular e dos valores do teste de BUTT durante o estudo, fato que levou o autor a supor que estes resultados possam ser ainda melhores se houver o uso concomitante de lacrimunoestimulantes e sugerir estudos com aplicações de células tronco em pacientes que são tratados com estes fármacos. Diante dos valores obtidos no TS, que aumentaram durante as primeiras semanas, mas declinaram nas avaliações seguintes, este autor sugere que mais de uma aplicação seja realizada em estudos posteriores, antes que haja este declínio.

Um estudo foi realizado por BITTENCOURT et al. (2016) com a aplicação injetável periglandular de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (*CTMad*) em vinte e quatro olhos de quinze cães de diferentes idades e raças que possuíam CCS. Como resultado, os olhos dos animais que possuíam sinais mais leves voltaram a produzir lágrimas normalmente, demonstrando valores normais no TS, assim como relatado por PEIXOTO (2013) que observou melhora significativa neste teste ao final do seu experimento em um paciente que não possuía sinais crônicos. Os animais em estágio avançado da doença aumentaram a produção lacrimal e diminuíram a gravidade dos sinais clínicos, apesar de não apresentarem remissão completa. Esses mesmos autores ressaltaram que a terapia é bem tolerada em cães, não causando efeitos colaterais oculares ou sistêmicos a curto ou longo prazo.

VILLATORO et al. (2015) realizaram o transplante de *CTMad* em cães com CCS que eram não responsivos ao tratamento clínico convencional e acompanharam estes pacientes durante 9 meses. Como resultado, nenhum dos animais apresentou efeitos adversos e houve uma melhora significativa nos sinais clínicos avaliados, bem como aumento significativo no TS de nove dos doze animais que participaram do experimento.

Diante da hipótese proposta por FONSECA (2011), de que as células tronco possam agir na CCS substituindo as células do tecido glandular lesionadas por células novas, e a produção do filme lacrimal volte a atingir valores adequados, propõe-se com este trabalho, comparar a ação das *CTMad* nas formas de aplicação injetável e tópica em cães com

ceratoconjuntivite seca.

2.3. Break Up Time Test nos períodos pré, trans e pós-operatório em cães.

A córnea é uma região que está sujeita a sofrer injúrias durante um procedimento anestésico, principalmente porque no período em que o animal está anestesiado não há completo fechamento ocular, fazendo com que a evaporação lacrimal seja mais significativa. O risco de ressecamento ocular é ainda maior nos pacientes que possuem um bulbo mais proeminente (SNOW et al., 1975).

Já se sabe que a anestesia geral causa uma redução na porção aquosa da lágrima e isso pode ser visto pela redução do valor do TS (GELLAT, 2013). A influência da anestesia neste teste já é conhecida em estudos que comparam seus valores antes e depois do animal ser anestesiado (HERRING et al., 2000; SHEPARD et al., 2011). SANCHEZ et al. (2006), também fizeram esta comparação em animais que receberam detomidina, medetomidina e butorfanol, e concluíram que a produção lacrimal decai logo após a sedação. Devido a isso, sugere-se que animais sedados recebam substitutos da lágrima durante o período de sedação (SANCHEZ et al., 2006). HERRING et al. (2000) recomendaram que os animais recebam a lubrificação ocular por pelo menos 90 minutos após o retorno da anestesia geral e recomenda-se ainda que este tempo se estenda para 24 ou 36 horas em animais que, por ter o bulbo mais proeminente, são mais predispostos a injúrias oculares por ressecamento.

Demonstrar a importância da administração de substitutos da lágrima para a lubrificação ocular, quando o animal está sedado ou anestesiado, é um dos objetivos dos estudos que determinam a variação da produção lacrimal neste período. Outra consideração importante é a interferência nos testes lacrimais. Um decréscimo no TS ocorrerá se o teste for realizado com o animal sob efeito anestésico ou logo após retornar da anestesia, podendo induzir a um diagnóstico incorreto de ceratoconjuntivite seca (HERRING et al., 2000).

Apesar de ser conhecida esta diminuição na porção aquosa da lágrima em cães durante o período em que os mesmos são anestesiados, pouco se tem conhecimento sobre as mudanças do BUTT nas mesmas circunstâncias.

CULLEN et al. (2005) conduziram uma pesquisa em pacientes felinos realizando o BUTT no período pré e pós-anestésico e, apesar de perceberem que houve um aumento no tempo de ruptura lacrimal após anestesia, sugerindo uma queda na estabilidade da lágrima,

concluíram que as diferenças não foram significativas. Porém, estes autores não realizaram o teste no período trans-anestésico, e sugeriram que estudos posteriores fossem realizados avaliando protocolos anestésicos específicos com a mensuração da produção qualitativa da lágrima sendo feita em tempos padronizados.

Considerando que o TS tem valores reduzidos, e que as diferenças do *Break up Time test* não são conhecidas em pacientes caninos que se encontram sob anestesia geral, este trabalho propôs a realização e a comparação destes testes em cães antes, durante e após o procedimento anestésico.

3.0 REFERÊNCIAS

ALI, S.; AHMAD, A.; IQBAL, N. M.; MUHAMMAD, A.; IRFAN, M.; AKHTER, S. Opportunities for Stem Cells Therapy in Veterinary Medicine. *PSM Veterinary Research*. v. 1. n. 2. p. 60-68, 2016.

ALTMANN, S.; EMANUEL, A.; TOOMEY, M.; McINTYRE, K.; COVERT, J.; DUBIELZIG, R. R.; LEATHERBERRY, G.; MURPHY, J. C.; KODIHALLI, S.; BRANDT, C. R. A Quantitative Rabbit Model of Vaccinia Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v. 51. n. 9. p. 4531-4540, 2010.

ANGÉLICO, G.T.; RANZANI, J.J.T.; BRANDÃO, C.V.S.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R.; SERENO, M.G.; CREMONINI, D.N. Transplante de glândulas salivares menores no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 63. n. 5p. 1087-1092, 2011.

BARRY, F. P.; MURPHY, M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. n.36, p.568–584, 2004.

BITTENCOURT, M.K.W.; BARROS, M. A.; MARTINS, J. F. P.; VASCONCELLOS J. P. C.; MORAIS, B. P.; POMPEIA, C; BITTENCOURT, M. D.; EVANGELHO, K. S.; KERKIS, I.; WENCESLAU, C. V. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Medicine*, v. 8, p. 63-77, 2016.

BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. n. 2, v. 125, p.336–344, 2010.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 31, s.1, p.25–35, 2009.

CASTANHO, L. S.; MOREIRA, H.; RIBAS, C. A. P. M.; WOUK, A. F P.; SAMPAIO, M.; GIORDANO, T. Transplante de glândulas salivares labiais no tratamento de olho seco em cães pela autoenxertia. *Revista Brasileira de Oftalmologia*. n. 72. p. 373-378. 2013.

CHEN, T.; POWELL, C.C. Effect of once daily topical 0,3% naltrexone on tear parameters and corneal sensitivity in dogs with uncontrolled keratoconjunctivitis sicca: a double-masked randomized placebo-controlled clinical trial. n. 18. p. 497-501. 2015.

CULLEN, C. L.; LIM, C.; SYKES, J. Tear film break up times in Young healthy cats before and after anesthesia. *Veterinary Ophthalmology*, v.8, n. 3, p.159-165, 2005.

DEWS. The definition of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the International dry Eye workshop. *Ocul. Surf.*, v.5, n.2, p.75-92, 2007.

EVANS, H. E.; de LAHUNTA, A. *Miller's Anatomy of the dog*. Elsevier Saunders. Missouri. p. 746 -770. 2013.

FAN, Y.; ZHUANG, B.; WANG, C.; XU, X.; LV, Z. Pirecrolimus micelle exhibits excelente therapeutic effect for Keratoconjunctivitis Sicca. n. 140. p. 1-10. 2016.

FONSECA, S.A. Efeitos clínicos e histopatológicos da aplicação autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e cães. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 83p. 2011.

GELATT, K.N. Surgery of nasolacrimal apparatus and tear systems. In: GELATT, K.N.; GELATT, J.P. *Veterinary ophthalmic surgery*. 2° ed. Roca. São Paulo. p. 150. 2011.

GIULIANO, E. A. Disease and surgery of the canine lacrimal secretory system In: GELATT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. *Veterinary ophthalmology*. 5° ed. Roca. São Paulo. p. 912-925. 2013.

GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal Stem Cells*. n. 26. V. 6. p.526–539, 2014.

GUSSONI, F. R. A.; BARROS. P.S. de M., S. Epífora no cão: Mensuração do pH da lágrima. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. n. 40. p. 87-9. 2003.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*, n. 9, p. 53-57. 2006.

HARTLEY, C.; DONALDSON, D.; SMITH. K.C.; HENLEY, W.; LEWIS, T. W.; BLOTT, S.; MELLERSH, C.; BARNETT, K. C. Congenital Keratoconjunctivitis sicca and ichthyosiform dermatoses in 25 Cavalier King Charles spaniel dogs. Part I: Clinical signs, histopathology, and inheritance. *Veterinary Ophthalmology*. p. 1-12. 2011.

HERRING, I. P.; PICKETT, J. P.; CHAMPAGNE, E. S.; MARINI, M. Evaluation of aqueous tear production in dogs following general anesthesia. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v. 36. p. 427-430. 2000.

HIDA, R. Y.; DANTAS, M. C. N.; HIDA, M. M.; TSUBOTA, K. Estudo quantitativo da lágrima pelo teste de fenol vermelho na população brasileira. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. n. 68. p. 433-437. 2005.

HOFFMAN, A. M.; DOW, S. W. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells*. n. 7. v. 34. p. 1709- 1729. 2016.

JONES, S. P. & CRISPIN, S. *Manual of small animal Ophthalmology*. 2° edition. British Small Animal Veterinary Association. p. 107. 2002.

LAUST, J. L.; ORIÁ, A. P. Doenças corneanas em pequenos animais. Revista de educação continuada do CRMV-SP. v. 2. p. 26-33. 1999.

LEE, J. H.; KEE, C. W. The significance of tear film Break Up Time in the diagnosis of Drye Eye syndrome. v 2. p. 69-71. 1988.

MILLER Lacrimal system. In SLATTER, D. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária.3 ed. São Paulo: Roca, p.157-170. 2008.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. Ciência rural. v.40 n. 1. 2010.

NORN, M.S. Desiccation of the precorneal film. I. Corneal wetting-time. Acta Ophthalmology. v.47 n. 4. p. 865-880. 1969.

OH, J. Y.; KIM, M. K.; SHIN, M. S.; LEE, H. J.; KO, J. H.; WEE, W. R.; LEE, J. H. The Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Role of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Wound Healing Following Chemical Injury. Stem Cells, v. 26 n.4. 1047–1055. 2008.

OLIVEIRA, F. A.; OLESKOVICZ, N.; MORAES, A. N. Anestesia total intravenosa em cães e gatos com propofol e suas associações. Revista de Ciências Agroveterinárias. v.6 n.2 p. 170-178. 2007.

PATRICIO, L. F. L.; REBELATTO, C. L. K; BROFMAN, B. B.; MACIEL, O. C.; BELTRAME, H. F. V.; BRITO, R.; LOCATELLI-DIETRICH, R. Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. n.4, v.65, p.946–954, 2013.

PEREIRA, L. V.; OKAMOTO, O. K. A importância das células-tronco para a saúde pública. Ciência e Saúde coletiva. n.13, v. 1, p. 7–14, 2008.

PEIXOTO, R.V.R. Aplicação autóloga da fração de células mononucleares (FCM) da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra em cães com ceratoconjuntivite seca, e sua repercussão sobre a superfície ocular. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 72p. 2013.

RAMOS, S. D.; CRUZ, R. M. A.; MIGLINO, M. A. *et al.* Células-Tronco de membrana amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v.13(1), p.87-88, 2015.

RIBEIRO, A. P.; BRITO, F. L. da C.; MARTINS, B. da C.; MAMEDE, F.; LAUS, J. L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. Ciência Rural. v. 38 n. 2. p. 568-575. 2008.

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

SANCHEZ, R. F.; MELLOR, D.; MOULD, J. Effects of medetomidine and medetomidine-butorphanol combination on Schirmer tear test 1 readings in dogs. Veterinary Ophthalmology. v. 9 n. 1. p. 33-37. 2006.

SHEPARD, M. K.; ACCOLA, P. J.; LOPEZ, L.A.; SHAGHNESSY, M.R.; HOFMEISTER, E. H. Effect of duration and type of anesthetic on tear production in dogs. American Journal of Veterinary Research. v. 72. n. 5. p. 608-612. 2011.

SOARES, E. J. C.; FRANÇA, V. P. Transplante de glândulas salivares labiais no tratamento do olho seco grave. Arquivo Brasileiro de Oftalmologia. v. 68 n. 4. p. 481-489. 2005.

SNOW, J. C.; KRIPKE, B. J.; NORTON, M.L.; CHANDRA, P.; WOODCOME, H. A. Corneal injuries during general anesthesia. Anesthesia & Analgesia. v. 54. n. 4. p. 465-467. 1975.

VILLATORO, A. J.; FERNÁNDEZ, V.; CLAROS, S. LLANOS, G. A. R.; BECERRA, J.; ANDRADES, A, J. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *Bio Med Research International*. p.1-10, 2015.

WILLIAMS, D. L. Immunopathogenesis of Keratoconjunctivitis Sicca in the dog. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*. n. 38. p. 251-268. 2008.

WILLIAMS, D. L.; H, HEWITT. Tear ferning in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Open Veterinary Journal*. v. 7. p. 268-272. 2017.

WILLIAMS, D. L. PIERCE, V.; MELLOR, P. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *Journal Small Animal Practice*. n. 48. p. 252-256. 2007.

WILLIAMS, D. Canine Keratoconjutivites sicca: Current concepts in diagnosis ans treatment. In *Science inquest*. v. 2 tissue 1. 2017.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas do tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. n.5, v. 85, p.647–656, 2010.

ZAGON, I. S.; KLOCEK, M. S.; SASSANI, J. W.; MCLAUGHLIN. Dry eye reversal and corneal sensation restoration with topical Naltrexone in Diabetes Mellitus. *Archives of ophthalmology*. v. 127. n.11. p. 1468-1473. 2009.

ZHANG, X.; LIU, Z.; DING, W.; ZHANG, J.; SHI, H.; ZHU, W. Efficacy and safety of acupuncture at a single BL1 acupoint in the treatment of moderate to severe dry eye disease. Protocol for a randomized, controlled trial. v 97. n.22. p. 1-7. 2018.

Artigos científicos

(Artigos de acordo com as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

4. CAPÍTULO 1

Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo administradas por via tópica e injetável em cães com ceratoconjuntivite seca

Autores

Denise Guimarães Oliveira, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná, Brasil.

Ana Paula Motter, Aluna do curso de Medicina Veterinária da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

André Vitor Fieira, Aluno do curso de Medicina Veterinária da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Bruna Becchi Borçatto, Aluna do curso de Medicina Veterinária da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Giselle Sabadin, Aluna do curso de Medicina Veterinária da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Giuliana Gelbcke Kasecker, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná, Brasil.

Resumo

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma enfermidade ocular comum em cães e humanos causada pela deficiência lacrimal, levando a sinais de irritação ocular, hiperemia, secreção mucopurulenta e alterações corneanas. Os tratamentos já estabelecidos para a doença incluem fármacos tópicos que devem ser aplicados com alta frequência ou cirurgias que objetivam a substituição das glândulas lacrimais por glândulas salivares, porém ambos tratamentos possuem desvantagens. O uso de células tronco já vem sendo realizado com sucesso em diversas áreas, porém há poucos estudos avaliando seus efeitos em cães com CCS. A via de administração das células para doenças oculares bem como sua dose e número de aplicações necessárias também não são bem estabelecidas. Objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMad) aplicadas por via tópica e injetável (cinco milhões de células) nos olhos de cães com diagnóstico de CCS. Não foram observados efeitos colaterais e houve efeitos benéficos distintos entre os dois tipos de aplicação, sendo que os animais que as receberam em forma de colírio tiveram melhora significativa nos sinais clínicos ($p <$

33 0,01)e aqueles que receberam injeções periglandulares tiveram aumento significativo no
34 teste de *Break Up Time* (BUTT) ($p < 0,01$), compatíveis com uma evolução favorável
35 para os pacientes.

36 **Abstract**

37 Keratoconjunctivitis *Sicca* (KCS) is a common ocular disease in dogs and humans caused
38 by lacrimal deficiency, leading to signs of ocular irritation, hyperemia, mucopurulent
39 discharge, and corneal abnormalities. The current therapies for this disease include topical
40 preparations that must be applied with high frequency or even surgical procedures that
41 target the replacement of the lacrimal glands by salivary glands, however both have
42 negative implications. Therapies with stem cells have been successful in several areas,
43 but there are few studies evaluating their effects in dogs with KCS. The route of
44 administration of the stem cells, their dose and number of required applications are also
45 not well established. This study aimed to evaluate the effects of mesenchymal stem cells
46 derived from adipose tissue (CTMad) applied by topical and injectable route (five million
47 cells) in patients with KCS. No side effects were observed and distinct beneficial effects
48 were observed between the two types of application. The animals that received them as
49 eye drops had significant improvement in clinical signs and those who received
50 periglandular injections had a significant increase in the values of Break Up Time test
51 (BUTT), compatible with a favorable outcome.

52 **Palavras-chave:** Deficiência lacrimal, terapia celular, enfermidade ocular, CCS.

53 **Keywords:** Lacrimal deficiency, cell therapy, ocular disease, KCS.

54 **Introdução**

55 A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença multifatorial comum em humanos e cães
56 (DEWS, 2007; Gelatt, 2011; Villatoro, 2011), caracterizada pela deficiência lacrimal
57 devido a diminuição de sua produção ou por fatores que levem à sua evaporação precoce
58 (Williams, 2008). Quando há diminuição da lágrima ocorre perda da proteção da córnea
59 (Gussoni e Barros, 2003). Williams (2017) afirmou que em casos severos de CCS a
60 córnea pode apresentar-se opaca, vascularizada, pigmentada e ulcerada. Outros sinais
61 clínicos relatados nestes casos incluem hiperemia conjuntival e secreção ocular

62 mucopurulenta, que são comumente confundidos com conjuntivite e tratados com colírios
63 antibióticos sem sucesso.

64 O diagnóstico da CCS pode ser confirmado através dos testes de *Schirmer* (TS) e *Break*
65 *Up Time* (BUTT), associados aos sinais clínicos característicos (DEWS, 2007).

66 Atualmente são descritos tratamentos conservativos e cirúrgicos para a doença, porém
67 ambos possuem desvantagens (DEWS, 2007). As técnicas cirúrgicas visam a substituição
68 das glândulas lacrimais por glândulas salivares (Angélico, 2011), mas a superprodução
69 de saliva pode ocorrer após a cirurgia levando a epífora com consequente dermatite úmida
70 periocular (Williams, 2017) e ao edema corneano (DEWS, 2007). Já no tratamento tópico
71 recomenda-se o uso de substâncias de uso tópico como lacrimunoestimulantes,
72 substitutos da lágrima e imunomoduladores (Williams, 2008; Gelatt, 2011). Porém, há
73 pacientes que não apresentam resposta satisfatória à terapia, fato que, segundo Zhang *et*
74 *al.* (2014), deve-se principalmente ao pouco tempo de disponibilidade dos fármacos na
75 superfície ocular e à alta frequência com que eles têm que ser administrados, o que em
76 cães exige grande dedicação e disponibilidade dos tutores (Angélico, 2011).

77 A importância da pesquisa de novas terapias que proporcionem melhora efetiva na
78 produção lacrimal sem a necessidade do uso contínuo de fármacos é citada por Angélico
79 *et al.* (2011) e Zhang *et al.* (2014), e reforçada por Williams (2017) que ressalta que
80 estudos com cães são importantes tanto para animais como para humanos que sofrem com
81 a deficiência lacrimal, já que a patogenia da doença é semelhante nestas duas espécies
82 que tendem a sofrer as consequências dos sinais clínicos.

83 Segundo Ali *et al.* (2016), na Medicina Veterinária a terapia com células tronco já é
84 utilizada com sucesso em diversas doenças especialmente em caninos e equinos, e vem
85 sendo estudada em muitas áreas. Hoffman e Dow (2016) ressaltaram que além de ser de
86 grande importância para a saúde animal, a aplicação destas células em animais de
87 companhia é de grande interesse na medicina humana, pois muitas doenças que têm curso
88 parecido entre as espécies, são muito complexas para serem eficazmente estudadas em
89 animais de laboratório.

90 Alguns estudos já foram realizados para avaliar o efeito destas células em cães com a
91 enfermidade. Destacam-se dois experimentos em que houve eficácia na aplicação única
92 de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMad) por via injetável

93 na região ocular periglandular de cães, nos quais foram obtidos resultados positivos pós-
94 aplicação (Villatoro *et al.*, 2015 e Bittencourt *et al.*, 2016). Ramos *et al.* (2015) relataram
95 o uso de células tronco derivadas da membrana amniótica em dois cães com CCS e
96 afirmaram que, apesar de não ter ocorrido melhora significativa nos testes de produção
97 lacrimal, houve redução da secreção ocular nos dois pacientes.

98 A via tópica de administração de fármacos, com aplicação diretamente na córnea e na
99 conjuntiva, é descrita como ideal para o tratamento de doenças da superfície ocular como
100 a ceratoconjuntivite seca por ser simples e segura (Melo e Filho *et al.*, 2010). Entretanto,
101 não existem estudos que avaliem o resultado da aplicação tópica de células tronco na
102 superfície ocular.

103 Diante da boa perspectiva acerca do uso da terapia celular, especialmente em doenças que
104 possuem causa imunomediada como a CCS (Villatoro *et al.*, 2015), da ausência de efeitos
105 colaterais diante da aplicação das células tronco (Ali *et al.*, 2016; Bittencourt *et al.*, 2016)
106 e do sucesso obtido na aplicação de CTMad por via injetável em cães em estudos
107 anteriores, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia da aplicação destas células
108 pela via injetável periglandular e pela via tópica em animais desta espécie portadores de
109 CCS.

110 **Material e métodos**

111 Foram selecionados 12 cães com diagnóstico de CCS para receber as aplicações de
112 CTMad. Os animais passaram por avaliação oftalmológica e hemograma de triagem no
113 Hospital Veterinário da UNISEP-PR em Dois Vizinhos- PR ou na Clínica Escola CEVET
114 – UNICENTRO em Guarapuava – PR. Todos os procedimentos foram conduzidos
115 mediante aprovação do comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do
116 Centro Oeste (UNICENTRO) sob protocolo de número 652017.

117 Como critério para inclusão no estudo, os cães tiveram a CCS crônica confirmada com a
118 avaliação clínica acompanhada do TS e do BUTT. A idade dos animais variou de 4 a 14
119 anos. Participaram três caninos da raça Lhasa Apso, dois da raça Buldogue Inglês, um
120 sem raça definida (SRD), e ainda um participante de cada uma das raças: Beagle, Boxer,
121 Cocker Spaniel Inglês, Pequinês, Pug e Shih-Tzu.

122 Foram realizadas três aplicações de *CTMad* em cada paciente, com intervalo de sete dias.
123 Os cães foram divididos em dois grupos, sendo que cinco animais receberam as células
124 por via tópica e sete por via injetável. Foi indicado que os animais não tivessem qualquer
125 alteração no tratamento ao qual já eram submetidos, sendo que em 10 animais era
126 administrada ciclosporina por via tópica há mais de três meses e em dois animais não era
127 administrado nenhum fármaco, pois os proprietários alegavam que o tratamento
128 convencional era muito oneroso.

129 As *CTMad* eram preparadas em um laboratório especializado (CELLVET® Medicina
130 Veterinária Regenerativa. Brasil), diluídas em solução fisiológica e enviadas via
131 transportadora. O material era transportado em seringas de 1mL em uma caixa
132 refrigerada, de forma que se mantinha viável por até 48 horas. Nenhuma das aplicações
133 foi realizada com mais de 24 horas desde a preparação das soluções.

134 No grupo colírio (GC), que recebeu as células pela via tópica, foi utilizada em cada
135 administração o volume de 0,4mL de solução contendo cinco milhões de *CTMad*, em
136 cada um dos olhos. Este procedimento foi realizado somente com contenção física, e a
137 solução foi instilada diretamente da seringa em que foi preparada.

138 Os animais do grupo injetável (GI) receberam as aplicações injetáveis. Para tanto, foram
139 anestesiados e receberam a solução no mesmo volume e dose do procedimento relatado
140 acima. A anestesia foi realizada nos pacientes com jejum hídrico de quatro horas e
141 alimentar de 12 horas, e eles foram mantidos em fluidoterapia com solução de cloreto de
142 sódio a 0,9% durante o procedimento. Em seguida, aplicava-se propofol por via
143 intravenosa na dose inicial de 6mg/kg, sendo que em alguns animais foi necessário
144 complementar a dose inicial para que entrassem em plano anestésico. Após a indução
145 anestésica, os animais foram intubados e monitorados até o período de completa
146 recuperação no qual se encontravam ativos e com temperatura retal normal. O volume
147 total para cada olho foi dividido para ser aplicado em dois locais. Deste, 0,2mL foi
148 aplicado na região periglandular lacrimal, e 0,2mL na região de glândula de terceira
149 pálpebra, com uma agulha de calibre 13x0,45mm.

150 Os animais foram avaliados a cada aplicação e depois mensalmente, pelo mesmo
151 observador. Foram realizados os testes TS e BUTT, e os sinais clínicos foram pontuados
152 de acordo com o grau de acometimento.

153 A Tab. 1 ilustra a pontuação utilizada na presença de alterações corneanas. Foram
 154 avaliados e classificados, separadamente, os sinais de opacidade, pigmentação e
 155 vascularização presentes na superfície da córnea. As Tab. 2 e 3 demonstram as
 156 pontuações dos sinais de hiperemia e secreção ocular, respectivamente.

157 Tabela 1. Classificação dos sinais clínicos de opacidade, pigmentação e
 158 vascularização de acordo com o grau de acometimento da superfície corneana.

Pontuação	Sinal clínico corneano
0	Ausente
1	Presente na periferia da superfície corneana
2	Presente em até um quarto da superfície corneana
3	Presente em até metade da superfície corneana
4	Presente em até três quartos da superfície corneana
5	Presente em toda a superfície corneana

159 Tabela 2. Classificação do sinal clínico de hiperemia de acordo com sua
 160 intensidade.
 161

Pontuação	Hiperemia conjuntival
0	Ausente
1	Presente
2	Intensa

162 Tabela 3. Classificação do sinal clínico de secreção ocular de acordo com sua
 163 intensidade.
 164

Pontuação	Secreção ocular
0	Ausente
1	Pequena quantidade de secreção no canto medial dos olhos
2	Grande quantidade de secreção em toda a extensão palpebral

165 As tiras para a realização dos testes TS e BUTT foram fornecidas por uma farmácia de
 166 manipulação veterinária (DROGAVET®). Cada fita teste foi utilizada apenas uma vez e
 167 após isto descartada, evitando assim possíveis contaminações.

168 O TS foi realizado através da colocação da fita milimetrada, fornecida em embalagem
 169 estéril, no saco conjuntival em contato com a córnea, durante 1 minuto. Após a retirada
 170 da fita, verificava-se a quantidade umedecida, obtendo-se o valor do teste.

171 Para a realização do BUTT, foi utilizada uma fita impregnada com o corante de
 172 fluoresceína, fornecida em embalagem estéril. Em cada fita, pingou-se uma gota de
 173 solução fisiológica estéril, que após contato com o corante, foi instilada no olho do
 174 paciente. Com o uso da lâmpada de Wood, a fluoresceína foi visualizada sobre a
 175 superfície corneana. Após o examinador provocar uma piscada, com auxílio dos dedos,

176 observa-se que em alguns segundos começam a aparecer pontos enegrecidos na córnea,
177 e o intervalo entre a abertura palpebral e a visualização do primeiro ponto foi considerado
178 o tempo da ruptura do filme lacrimal e resultado do teste.

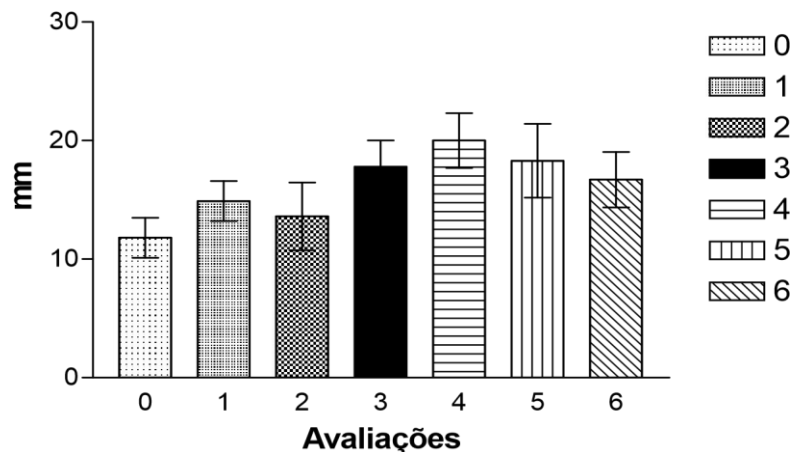
179 Os resultados obtidos em todas as avaliações nos dois grupos foram utilizados para a
180 análise estatística. Utilizou-se o valor numérico nos casos dos testes TS e BUTT e
181 atribuiu-se um valor numérico ao conjunto de sinais clínicos observados. Neste último
182 caso, foram obtidas as médias dos valores de todos os sinais avaliados em ambos os olhos,
183 atribuindo-lhe o nome de escore de alterações oftalmológicas. Todos os resultados
184 passaram no teste de normalidade e foram avaliados estatisticamente através de análise
185 de variância de uma via, seguido do teste post hoc de Dunnett. Os resultados foram
186 considerados significativos quando $p < 0,05$.

187 **Resultados**

188 Nas avaliações iniciais, quanto aos testes oculares, onze animais apresentaram TS abaixo
189 do ideal, estando a maioria menor que 5mm. O animal que apresentou TS acima de 15mm
190 tinha sinais característicos de CCS e ainda, assim como os outros 11 pacientes, apresentou
191 os valores de BUTT abaixo de cinco segundos. Quanto aos sinais clínicos observados
192 inicialmente houve variação, porém, a opacidade e a pigmentação corneanas foram
193 encontradas nos 12 animais e nenhum deles apresentou blefaroespasmos ou ulceração
194 corneana em todo o período. No período das aplicações não foram observados sinais
195 clínicos decorrentes do procedimento em nenhum dos animais.

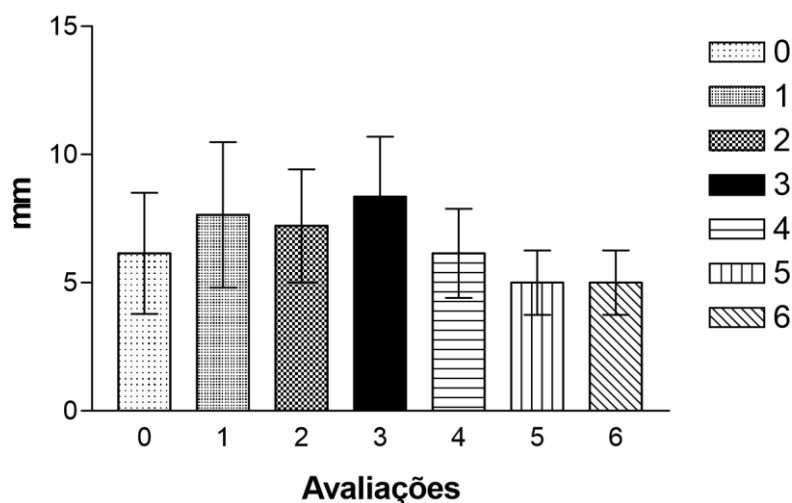
196 As figuras de um a seis ilustram o comportamento das variáveis nos dois grupos,
197 separadamente, sendo que o tempo (eixo horizontal) se refere aos meses, devido ao
198 intervalo das avaliações. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das
199 células e a partir do momento um aos meses avaliados.

200 A média dos resultados obtidos no TS nos animais do GC e do GI em todos os meses de
201 avaliações estão apresentados nas fig. 1 e 2, respectivamente. Este teste não revelou
202 diferenças significativas durante os meses de avaliação em nenhum dos grupos.



203
204
205
206
207
208

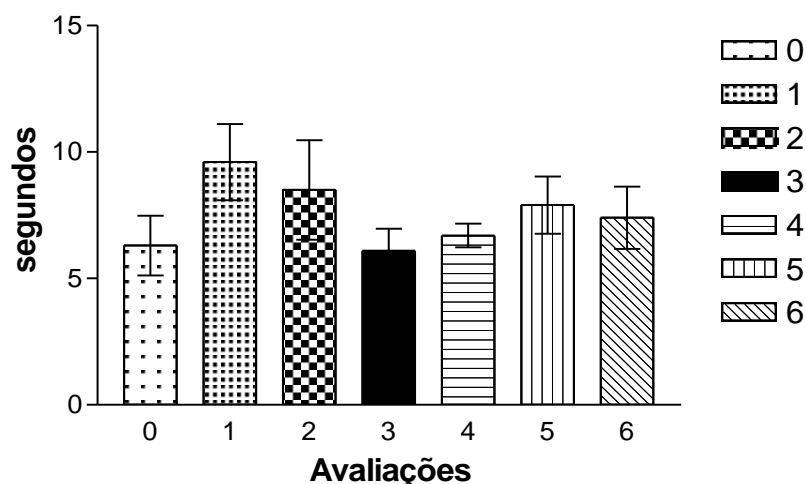
Figura 1. Distribuição das médias e erro padrão dos resultados do teste de *Schirmer* dos animais do grupo colírio ao longo dos seis meses de avaliação. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das células e a partir do momento 1 aos meses avaliados.



209
210
211
212
213
214

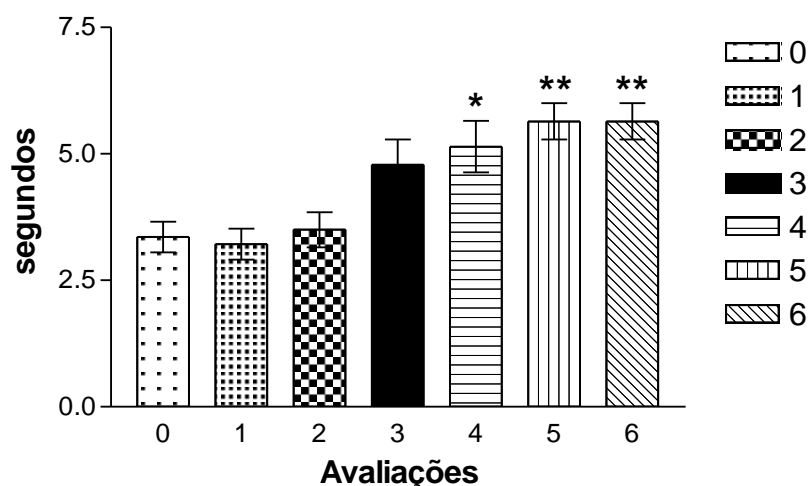
Figura 2. Distribuição das médias e erro padrão dos resultados do teste de *Schirmer* dos animais do grupo injetável ao longo dos seis meses de avaliação. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das células e a partir do momento 1 aos meses avaliados.

215 A média dos resultados obtidos no BUTT nos animais do GC e do GI em todos os meses
216 de avaliação estão apresentados nas fig. 3 e 4 respectivamente. Este teste não demonstrou
217 diferenças significativas no GC, porém no GI, observou-se um aumento significativo a
218 partir do quarto mês.



219
220
221
222
223
224

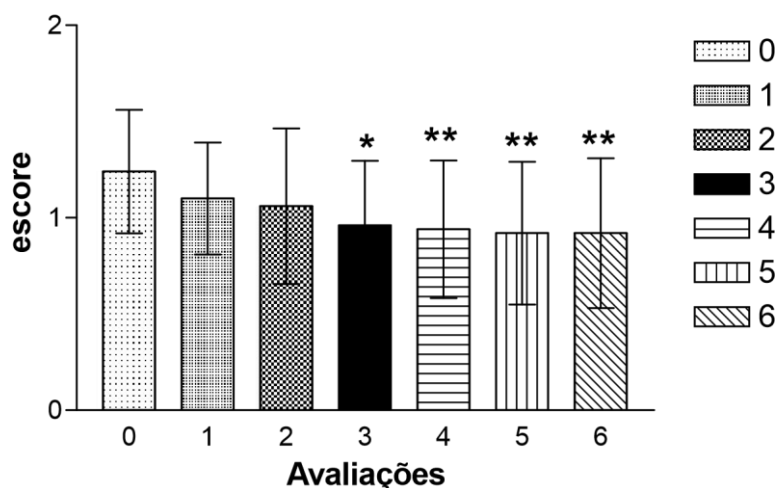
Figura 3. Distribuição das médias e erro padrão dos resultados do teste de *Break Up Time* dos animais do grupo colírio ao longo dos seis meses de avaliação. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das células e a partir do momento 1 aos meses avaliados.



225
226
227
228
229
230

Figura 4. Distribuição das médias e erro padrão dos resultados do teste de *Break Up Time* dos animais do grupo injetável ao longo dos seis meses de avaliação. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das células e a partir do momento 1 aos meses avaliados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

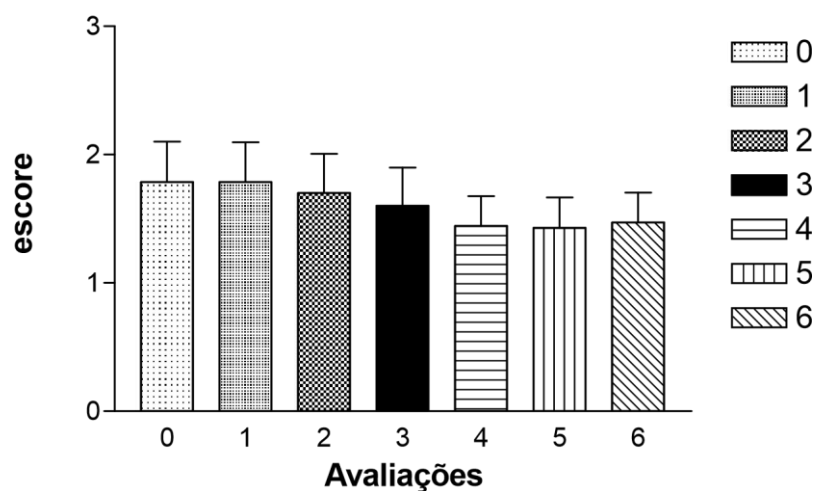
231 As médias e erro padrão dos valores de escore de alterações oftalmológicas nos animais
232 do GC e do GI ao longo dos meses de avaliação estão apresentados nas fig. 5 e 6
233 respectivamente. Estes sinais apresentaram diferenças significativas, com diminuição a
234 partir do terceiro mês de avaliação no GC. No GI estes sinais não variaram
235 significativamente, apesar de demonstrarem uma tendência à redução.



236

237
238
239
240
241
242

Figura 5. Distribuição das médias e erro padrão dos resultados do escore de alterações oftalmológicas dos animais do grupo colírio ao longo dos seis meses de avaliação. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das células e a partir do momento 1 aos meses avaliados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



243

244
245
246
247
248

Figura 6. Distribuição das médias e erro padrão dos resultados do escore de alterações oftalmológicas dos animais do grupo injetável ao longo dos seis meses de avaliação. O momento 0 se refere ao momento anterior a aplicação das células e a partir do momento 1 aos meses avaliados.

Discussão

249 Assim como nos resultados encontrados em outros trabalhos com aplicação de células
250 tronco (Bittencourt *et al.*, 2016; Villatoro *et al.*, 2015), não houve nenhum efeito adverso
251 nos animais que receberam a terapia, mostrando que as CTMad são bem toleradas em
252 cães em aplicações oftálmicas tópicas e por via injetável local na região periglandular.
253 Para Ali *et al.* (2016), apesar dos benefícios que as células tronco têm trazido na terapia
254 de diversas doenças nos animais de companhia, sua aplicação pode ter riscos de
255 contaminação. Com o intuito de evitar a contaminação do material, as células utilizadas

256 no estudo foram preparadas de modo estéril por um laboratório especializado neste
257 serviço, e enviadas em seringas estéreis de onde foram aplicadas diretamente nos olhos
258 dos animais.

259 Segundo Williams (2008) a CCS não tem uma etiologia definida, podendo ser causada
260 pela evaporação lacrimal precoce ou por deficiência em sua produção. Esta deficiência,
261 segundo Villatoro *et al.* (2015) é a causa mais comum de CCS em cães, na qual por uma
262 reação inflamatória imunomediada ocorre destruição das glândulas lacrimais. Baseada
263 nesta informação, reside a hipótese do sucesso da aplicação das CTMad na doença, já que
264 a terapia com células tronco é descrita como promissora em doenças com causa
265 imunomediada.

266 Quanto à causa da evaporação lacrimal precoce que leva a CCS, sabe-se que alguns
267 animais possuem problemas anatômicos que levam ao não fechamento ocular,
268 comprometendo a distribuição da lágrima pela superfície corneana, e outros possuem
269 deficiência na porção lipídica do filme lacrimal (Williams, 2008). Nenhum dos cães deste
270 estudo possuía alterações que impedissem o fechamento ocular adequado, embora dois
271 pacientes do GC e três do GI fossem braquicefálicos, condição que predispõe a este
272 problema. A camada lipídica é a porção mais externa da lágrima, produzida pelas
273 glândulas tarsais ou de meibônio (Williams e Hewitt, 2017), e tem função de evitar sua
274 evaporação precoce (Williams e Hewitt, 2017). Apesar da literatura tratar as glândulas
275 lacrimais de forma generalista quando discute a hipótese de que a ação das células tronco
276 na CCS seja benéfica por impedir uma destruição imunomediada, acredita-se que possa
277 haver uma ação diferenciada destas células nos diferentes componentes do filme lacrimal.
278 Assim, mesmo não podendo precisar a causa exata da CCS em cada paciente que recebeu
279 as CTMad, eles não apresentavam quaisquer problemas anatômicos. As alterações nos
280 valores obtidos pelo BUTT reforçam a possibilidade de que a deficiência na produção
281 lacrimal tenha causa multifatorial, envolvendo déficits nas porções aquosa e/ou lipídica,
282 e neste caso as células poderiam apresentar-se benéficas em ambos os casos pelo seu
283 potencial regenerativo.

284 Se houvesse possibilidade de realizar o exame histológico das glândulas lacrimais e
285 acessórias dos animais antes e após a aplicação das CTMad, talvez este exame elucidasse
286 melhor a situação do tecido nesses dois momentos, mas considerando que este
287 procedimento levaria a uma perda tecidual nestas glândulas que já possuem certa

288 deficiência, e que seria um procedimento invasivo, considerou-se essa possibilidade
289 inviável em animais de companhia. Ramos *et al.* (2015) relataram ter avaliado o aspecto
290 das glândulas lacrimais dos dois cães que receberam as células tronco percebendo
291 melhora no aspecto das mesmas, porém não detalharam em seu estudo como foram
292 realizadas essas avaliações.

293 Exames tão minuciosos como o histológico seriam possíveis de serem realizados se o
294 estudo fosse conduzido com animais de laboratório, porém segundo Hoffman e Dow
295 (2016), afecções muito complexas como esta são difíceis de ser induzidas, com risco de
296 apresentar respostas muito diferentes àquelas obtidas em indivíduos naturalmente
297 doentes. Além disto, o fato de a CCS em cães ser muito semelhante a síndrome de Sjörger
298 que ocorre em humanos, faz com que estudos como este sejam importantes também para
299 demonstrar evidências de sucesso ou de risco da terapia celular para a Medicina Humana.
300 Assim, embora haja algumas dificuldades em estudos clínicos, especialmente quanto à
301 padronização dos sinais dos pacientes e estágios da doença, os resultados obtidos a partir
302 de trabalhos com uso de CTMad em cães que possuem CCS somam-se aos já obtidos,
303 demonstrando as possibilidades de ação destas células. Além disto, mudanças nos sinais
304 clínicos, bem como nos resultados dos testes oculares, nos permitem avaliar a evolução
305 da doença e a melhora diante da aplicação das CTMad de forma eficaz e segura.

306 Todos os animais do GC e cinco animais do GI recebiam tratamento tópico com
307 Ciclosporina A há mais de três meses. Segundo Gelatt (2011) o tratamento convencional
308 para a doença, inclui estimulantes da produção lacrimal e substitutos da lágrima, e Ribeiro
309 *et al.* (2008) descreveram como lacrimunoestimulantes que contém ação anti-inflamatória
310 e imunossupressora a Ciclosporina A, o Tacrolimus e o Pirecrolimus. Por questões éticas,
311 optou-se por manter o uso da Ciclosporina A nos animais que já a utilizavam e foi
312 indicado que os proprietários continuassem a usá-la com a mesma frequência durante
313 todo o estudo. Os tutores dos dois cães que nunca tinham recebido tratamento alegaram
314 não fazer uso de nenhum fármaco tópico durante todo o período de avaliações. Os outros
315 lacrimunoestimulantes não eram utilizados em nenhum dos pacientes. Como não houve
316 mudança no tratamento em que os animais estavam recebendo por no mínimo três meses
317 que antecediam as aplicações, concluiu-se que todas as mudanças observadas foram em
318 decorrência da aplicação das células.

319 O número de células presentes na amostra instilada ou injetada em cada aplicação foi a
320 mesma, cinco milhões de células, dose que é comercialmente distribuída pelo laboratório
321 que preparou e enviou as células, e que também foi utilizada no trabalho de Villatoro *et*
322 *al.* (2015), porém em aplicação única. A escolha do tecido adiposo para obtenção das
323 células tronco alogênicas justifica-se por sua facilidade, já que são coletadas em cirurgias
324 eletivas de indivíduos saudáveis, como afirmado por Patricio *et al.* (2013), e devidamente
325 isoladas e armazenadas pelo laboratório. A aplicação de células obtidas de indivíduos
326 saudáveis também evitou que os pacientes que receberam as células tronco passassem por
327 um procedimento cirúrgico para colheita das mesmas.

328 Apesar do TS não ter tido diferença significativa em seus valores em nenhum dos grupos,
329 houve uma tendência ao aumento no GC, especialmente no terceiro mês. Neste mesmo
330 mês no GI os valores de TS aumentaram, mas voltaram a diminuir a partir do mês
331 seguinte. No trabalho conduzido por Villatoro *et al.* (2015), foi notado um aumento dos
332 valores do TS após a aplicação de CTMad por via periglandular, que se manteve até o
333 final do acompanhamento dos animais, 9 meses após as aplicações. Considerando que
334 quanto aos testes oculares, quanto maiores os valores que obtivermos em animais com
335 CCS, mais perto da normalidade se encontra a produção lacrimal (Williams, 2017), o
336 aumento observado é benéfico e avaliações posteriores dos pacientes são importantes para
337 que efeitos a longo prazo das duas formas de aplicação também sejam avaliados.

338 O BUTT não foi realizado nos trabalhos de Villatoro *et al.* (2015) e Bittencourt *et al.*
339 (2017) que aplicaram CTMad pela mesma via do GI, em cães com CCS. Porém,
340 considerando sua importância em animais que possuem a doença, e visando avaliar
341 separadamente a melhora na qualidade do filme lacrimal, este teste foi realizado em todas
342 as avaliações.

343 O GC teve oscilações nos resultados do BUTT durante as avaliações, contudo não houve
344 mudanças significativas. Apesar de ao final das avaliações nenhum dos pacientes do GI
345 ter valores normais para o BUTT, em torno de 20 segundos, houve um aumento
346 progressivo dos valores do teste neste grupo, significativo a partir do quarto mês das
347 avaliação, mas que já pôde ser observado a partir do terceiro mês. Considerando a
348 importância da camada lipídica e da camada mucínica para a aderência corneana, não
349 evaporação da lágrima e proteção corneana mais efetiva, o aumento do BUTT tem uma
350 grande relevância nos animais diagnosticados com CCS.

351 A diferença mais importante que o GC apresentou foi uma tendência à redução na
352 gravidade dos sinais clínicos. Estes resultados demonstram uma melhora clínica dos
353 pacientes, fator que pode preceder uma melhora efetiva no TS e no BUTT e que
354 proporcionam de forma imediata maior conforto ocular aos pacientes.

355 Os sinais clínicos da CCS variam de acordo com a progressão da doença, mas incluem
356 secreções, que segundo Bittencourt *et al.* (2016) têm que ser removidas várias vezes ao
357 dia para diminuir a irritação da córnea e da conjuntiva, requerendo cuidados constantes.
358 Além disto, humanos com a síndrome de Sjörger, doença semelhante a CCS, relatam
359 ressecamento ocular e irritação constante (DEWS, 2007). Levando em consideração todo
360 o incômodo relatado e a necessidade de cuidados para amenizá-lo, salienta-se que a
361 diminuição do escore de alterações oftalmológicas pode refletir na qualidade de vida ao
362 paciente e justificar o uso das CTMad por via tópica.

363 Mello e Filho *et al.* (2010) citaram como desvantagem do uso de fármacos pela via tópica
364 seu pouco tempo de viabilidade, já que fatores como o reflexo de lacrimejamento e piscar
365 no ato de instilar o colírio, o limitado volume que se mantém no saco conjuntival e a
366 drenagem natural do filme lacrimal podem eliminar rapidamente o que foi administrado.
367 Na aplicação das CTMad por via tópica, podem existir estes fatores interferindo na ação
368 das células, exceto a reação de lacrimejamento, já que os pacientes com CCS possuem
369 uma deficiência neste reflexo. Por outro lado, este autor cita como vantagens desta via a
370 facilidade, a segurança e a eficácia diante das doenças da superfície ocular, já que o colírio
371 tem contato direto com a mesma. Comparada à injetável, a aplicação tópica das CTMad
372 foi mais rápida e fácil, já que foi realizada apenas com contenção física e logo após sua
373 administração o paciente já pôde ser liberado. A solução foi aplicada sobre a superfície
374 corneana, o que gera uma perda inevitável de parte do conteúdo aplicado. Segundo o
375 laboratório que forneceu as células, a diluição das mesmas gerando um volume menor
376 que 0,4ml ainda é inviável, mas acredita-se que com o desenvolvimento de novas técnicas
377 a preparação da solução com uma quantidade eficaz de células em uma gota seja possível,
378 o que facilitaria a distribuição ocular da dose desejada.

379 **Conclusões**

380 O uso de células tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo, pelas vias
381 tópica em forma de colírio e injetável periglandular lacrimal, não causou efeitos adversos
382 em cães com ceratoconjuntivite seca. A aplicação tópica produziu efeitos benéficos

383 diminuindo o escore dos sinais clínicos presentes nos olhos dos animais que a receberam,
384 o que tende a diminuir o incômodo causado por estes sinais. A aplicação injetável causou
385 melhora da qualidade do filme lacrimal quando são levados em consideração os
386 resultados do BUTT, refletindo em melhor proteção corneana. Com a hipótese de que os
387 benefícios observados nas duas vias de aplicação possam ser somados, sugere-se que mais
388 estudos sejam realizados com a aplicação das células pela via tópica e pela via injetável
389 concomitantemente em cães com CCS.

390 **Agradecimentos**

391 Os autores agradecem ao laboratório CELLVET® Medicina Veterinária Regenerativa
392 pelo preparo e envio das células tronco. À DROGAVET® Farmácia de Manipulação
393 Veterinária, pelo preparo e envio dos testes oculares. Ao Hospital Veterinário UNISEP e
394 à Clínica Escola CEVET – UNICENTRO por cederem seu espaço para a execução das
395 aplicações e avaliações. Às clínicas de onde pacientes foram encaminhados para
396 participar do estudo, Menin Centro Veterinário e Vital Clínica Veterinária localizados em
397 Francisco Beltrão-PR, Consultório Veterinário Cãogaroto localizado em Nova Prata do
398 Iguaçu-PR e ainda Clínica Veterinária Mundo animal e Clínica Veterinária Vetclin
399 localizadas em Dois Vizinhos-PR.

400 **Referências**

- 401 ALI, S.; AHMAD, A.; IQBAL, M.N. et al. Opportunities for stem cells therapy in
402 veterinary medicine. *PSM Vet. Res.*, n.01(2), p.60-68, 2016.
- 403 ANGÉLICO, G.T.; RANZANI, J.J.T.; BRANDÃO, C.V.S. et al. Transplante de
404 glândulas salivares menores no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. *Arq. Bras.*
405 *Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.5, p.1087-1092, 2011.
- 406 BITTENCOURT, M.K.W.; BARROS, M.A.; MARTINS, J.F.P. et al. Allogeneic
407 mesenchymal stem cell transplantation in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Cell*
408 *Medicine.*, v.8, p.63-77, 2016.
- 409 DEWS. The definition of dry eye disease: report of the definition and classification
410 subcommittee of the International dry Eye workshop. *Ocul. Surf.*, v.5(2), p.75-92, 2007.
- 411 GELATT, K.N. Surgery of nasolacrimal apparatus and tear systems. In: GELATT, K. N.;
412 GELATT, J.P. *Veterinary ophthalmic surgery*. 2° ed. São Paulo: Roca, 2011. 150p.

- 413 GUSSONI, F.R.A.; BARROS, P.S.M. Epífora no cão: mensuração do pH da lágrima.
414 *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, n.40, p.87-94, 2003.
- 415 HOFFMAN, A.M.; DOW, S.W. Concise review: stem cell trials using companion animal
416 disease models. *Stem Cells*, n.34, p.1709-1729, 2016.
- 417 MELO FILHO, P. A. A.; MAIA, M.; RODRIGUES, E. B.; FARAH, M. E. Farmacologia
418 ocular aplicada no tratamento do vítreo, retina e coróide. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.73(3),
419 p.249-299, 2010.
- 420 PATRICIO, L.F.L.; REBELATTO, C.L.K.; BROFMAN, P.R.S. *et al.* Isolamento e
421 caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. *Arq. Bras. Med. Vet.*
422 *Zootec.*, v.65, n.4, p.946-954, 2013.
- 423 RAMOS, S. D.; CRUZ, R. M. A.; MIGLINO, M. A. *et al.* Células-Tronco de membrana
424 amniótica de cão como terapia alternativa para o tratamento de ceratoconjuntivite seca
425 em cães. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do*
426 *CRMV-SP*, v.13(1), p.87-88, 2015.
- 427 RIBEIRO, A.P.; BRITO, F.L.C.; MARTINS, B.C. *et al.* Qualitative and quantitative tear
428 film abnormalities in dogs. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.568-575, 2008.
- 429 VILLATORO, A. J.; FERNÁNDEZ, V.; CLAROS, S. *et al.* Use of Adipose-Derived
430 Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *BioMed*
431 *Research International*, p.1-10, 2015.
- 432 WILLIAMS, D. Canine keratoconjunctivitis sicca: current concepts in diagnosis and
433 treatment. *Journal of Clinical Ophthalmology and Optometry*, v.2(1), p.101, 2017.
- 434 WILLIAMS, D. L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Vet.*
435 *Clin. Small Animal Practice*, v.38, p.251-268, 2008.
- 436 WILLIAMS, D.; HEWITT, H. Tear ferning in normal dogs and dogs with
437 keratoconjunctivitis sicca. *Open Veterinary Journal*, v.7(3), p.268-272, 2017.
- 438 ZHANG, X.; LIU, Z.; DING, W. *et al.* Efficacy and safety of acupuncture at a single BL1
439 acupoint in the treatment of moderate to severe dry eye disease. Protocol for a
440 randomized, controlled trial. *Medicine*, v.97(22), p.1-7, 2018.

5. CAPÍTULO 2

Teste de *Schirmer* e *Break Up Time* em cães mantidos sob dois diferentes protocolos anestésicos

Autores

Denise Guimarães Oliveira, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná, Brasil.

Maria Ângela Machado Fernandes, Professora do curso de Médica Veterinária da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Mayara Karoline de Castro, Aluna do curso de Medicina Veterinária da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Nemora Naomi Pires, Médica Veterinária do Hospital da União de Ensino do Sudoeste do Paraná (UNISEP), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Rafael Rovaris Pinheiro, Professor do curso de Medicina Veterinária do Hospital Veterinário da UNISEP, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Giuliana Gelbcke Kasecker, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná, Brasil.

Resumo

O filme lacrimal atua como uma importante camada protetora da superfície ocular, protegendo-a contra agentes e substâncias estranhas, sendo que a superfície corneana pode sofrer injúrias diante de uma deficiência na produção da lágrima. Testes oculares são realizados para detectar esta deficiência e podem se encontrar alterados diante de afecções oculares ou por influência da anestesia, pelo não fechamento palpebral que ocorre no animal anestesiado ou ainda pela ação dos próprios fármacos anestésicos. Neste trabalho foram realizados os testes de *Break Up Time* (BUTT) e *Schirmer* (TS) para avaliar a produção lacrimal em cães, antes, durante e após a anestesia, diante de dois protocolos anestésicos. Os animais foram sedados com sulfato de morfina e acepromazina e foram induzidos ao plano anestésico com propofol com manutenção inalatória por isoflurano ou induzidos e mantidos em plano com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina. Foi observado que houve decréscimo na produção lacrimal nos períodos trans e pós-anestésico nos dois protocolos, sem diferenças significativas entre os mesmos. Diante disto, sugere-se que cães que sejam anestesiados com estes fármacos recebam

lubrificantes oculares após indução anestésica até o período pós-operatório, e que resultados obtidos no BUTT e no TS nestes períodos sejam reavaliados após a alta anestésica para evitar um diagnóstico errôneo de CCS (ceratoconjuntivite seca).

Abstract

Tear film plays an important role on the ocular surface protection against harmful agents and foreign substances, and deficiency of its production can lead to corneal surface injuries. Ocular tests are performed to detect deficiencies in the amount or in the quality of tear film and their values may become altered due to ocular conditions or under influence of anesthesia, by palpebral opening that occurs in the anesthetized animal or even by the action of drugs themselves. The Break Up Time (BUTT) and Schirmer (TS) tests were performed to evaluate lacrimal production in dogs, before, during and after anesthesia, under two anesthetic protocols. Patients were sedated with morphine sulfate and acepromazine chlorhydrate and maintained under anesthesia with propofol induction and isoflurane maintenance or ketamine and xylazine induction and maintenance. There was a decrease in the tear production in the trans and post-anesthetic periods with the two protocols, with no significant differences between them. These results suggested that both protocols demand ocular lubrication right after anesthetic induction until the postoperative period. The results obtained in BUTT and TS in dogs under general anesthesia must be reevaluated after recovering to avoid misdiagnosis of KCS (keratoconjunctivitis *sicca*).

Palavras-chave: Produção lacrimal, testes oculares, anestesia, *BUTT*, *TS*.

Keywords: Lacrimal production, eye tests, anesthesia, *BUTT*, *ST*.

Introdução

A lágrima é um importante componente ocular, que atua formando uma camada protetora

na superfície corneana e impedindo que agentes estranhos entrem em contato com a mesma e levem a lesões ou infecções (Mouney et al., 2011). Segundo Cullen et al. (2005), esta proteção e conseqüentemente a saúde ocular são garantidas pela integridade das camadas do filme lacrimal, denominadas segundo sua composição, sendo a interna a camada mucínica, a intermediária a camada aquosa e a externa camada lipídica.

Existem dois testes principais para a avaliação do filme lacrimal que são o Teste de *Schirmer* (TS) e o Teste de *Break Up Time* (BUTT) (DEWS, 2007). O TS avalia a produção porção aquosa da lágrima e o BUTT mensura a estabilidade lacrimal, já que avalia a camada de mucinas, responsável pela aderência da lágrima a córnea, e a lipídica que impede a evaporação da mesma (Cullen et al., 2005). Segundo Williams (2017) a diminuição nos valores destes testes sugere um diagnóstico de ceratoconjuntivite seca (CCS), mas há outros fatores que podem influenciá-los.

Snow et al. (1975) relataram que também ocorre ressecamento ocular em pacientes anestesiados e atribuíram isto ao fato de não haver completo fechamento dos olhos durante o período em que o animal se encontra sob efeito dos fármacos anestésicos. Porém diversos trabalhos já comprovaram que diferentes sedativos e anestésicos, em uso isolado ou associados também podem influenciar a produção lacrimal em animais domésticos, levando ao ressecamento da córnea e ao risco de ulceração. Nestes trabalhos, os autores realizaram a mensuração da lágrima em diferentes períodos após a sedação ou anestesia dos pacientes e obtiveram diferentes resultados para o TS, que variaram dependendo dos fármacos utilizados, embora a maioria tenha causado diminuição nos valores do teste (Dodam et al, 1998; Ghaffari et al., 2010; Mouney, 2011; Di Pietro et al., 2014; Kanda et al., 2016). Além dos riscos do ressecamento para a superfície ocular, outro ponto importante é a interferência da anestesia nos testes lacrimais, já que um decréscimo ocorrerá se estes forem realizados com o animal sob efeito do anestésico ou logo após retornar da anestesia, podendo induzir a um diagnóstico incorreto de ceratoconjuntivite seca (Herring et al., 2000).

Apesar da importância do teste de BUTT para mensurar a estabilidade do filme lacrimal, nenhum dos trabalhos já realizados com cães inclui este teste nas avaliações. Cullen et al. (2005) realizaram um trabalho com felinos avaliando as diferenças no teste de BUTT antes e depois o procedimento anestésico. Apesar de não ter tido diferença estatística, os autores concluíram que os valores do teste foram menores no período pós-operatório e

indicaram mais estudos, com animais de diferentes características e protocolos anestésicos distintos.

Considerando que o TS tem valores reduzidos, e que as diferenças no teste de BUTT não são conhecidas em pacientes caninos que se encontram sob anestesia geral, este trabalho propôs a realização e a comparação destes testes em cães antes, durante e após a anestesia com dois diferentes protocolos anestésicos.

Material e métodos

Foram selecionados para o estudo 20 cães sem alterações ou doenças oculares, que foram submetidos a cirurgias eletivas, no Hospital Veterinário UNISEP. Os cães foram divididos em dois grupos, sendo mantidos sob anestesia inalatória ou sob anestesia dissociativa durante o procedimento cirúrgico e submetidos a testes para avaliação lacrimal nos períodos pré, trans e pós-anestésico. Os procedimentos e fármacos utilizados nestes períodos estão descritos a seguir. O grupo que recebeu anestesia inalatória foi composto por oito fêmeas e dois machos, com idade entre seis meses a 12 anos, sendo de raças variadas. Ao grupo que recebeu anestesia dissociativa pertenciam seis fêmeas e quatro machos de idade entre seis meses a sete anos, de diferentes raças.

Antes do procedimento anestésico, todos os cães passaram por avaliação no Hospital Veterinário e tiveram o hemograma realizado e o protocolo anestésico foi escolhido pelo Médico Veterinário anestesista responsável por cada caso, levando em conta as particularidades de cada animal e da cirurgia a ser realizada. Nenhum dos animais apresentou alterações relevantes no hemograma. Ressalta-se que os animais selecionados passaram por cirurgias eletivas, de orquiectomia ou ovariohisterectomia (osh), que ocorreriam independentemente do estudo oftalmológico.

Aqueles animais que receberam como protocolo pré-anestésico o sulfato de morfina (Morfina, Sulfato de morfina, Hipolabor®, Brasil) na dose de $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ associado à acepromazina (Aceprom 0,2%, Acepromazina, Vetnil®, Brasil) na dose de $0,1\text{mg.kg}^{-1}$ pela via intramuscular, indução anestésica com Propofol (Provive 1%, Propofol, União Química®, Brasil) na dose de 6mg.kg^{-1} e manutenção anestésica com anestesia inalatória com Isoflurano (Isoflurano solução inalatória, Isoflurano, BioChimico®, Brasil) e Propofol em bolus conforme necessidade, foram selecionados para fazer parte do Grupo I (GI). Já para o Grupo II (GII) foram selecionados os animais que tiveram como manutenção a anestesia dissociativa, recebendo como medicações pré-anestésicas (MPA)

o sulfato de morfina (Morfina, Sulfato de morfina, Hipolabor®, Brasil) na dose de $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ associado à acepromazina (Acepram 0,2%, Acepromazina, Vetnil®, Brasil) na dose de $0,1\text{mg.kg}^{-1}$, para indução cloridrato de xilazina (Anasedan, Cloridrato de xilazina, Ceva®, Brasil) na dose de $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ associado ao cloridrato de cetamina (Quetamina injetável, Cloridrato de cetamina, Vetnil®, Brasil) na dose de 10mg.kg^{-1} e manutenção anestésica com cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina conforme necessidade. Estes protocolos estão ilustrados na Fig. 1. Não foi realizada aplicação de nenhum lubrificante ou qualquer fármaco tópico por via ocular nos animais em nenhum dos períodos avaliados.

Grupo	MPA	Indução	Manutenção
GI	Sulfato de Morfina $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ + Acepromazina $0,1\text{mg.kg}^{-1}$	Propofol 6mg.kg^{-1}	Isoflurano + Propofol
GII	Sulfato de Morfina $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ + Acepromazina $0,1\text{mg.kg}^{-1}$	cloridrato de xilazina $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ + cloridrato de cetamina 10mg.kg^{-1}	cloridrato de xilazina+ cloridrato de cetamina

Figura 1. Fármacos e doses utilizados no Grupo I (GI) e Grupo II (GII) como medicação pré-anestésica (MPA), e para indução e manutenção anestésica.

Foram realizados os testes oculares de TS e BUTT em tempos determinados antes, durante e após o procedimento anestésico. Os primeiros testes, que são realizados com o cão sem receber nenhum tipo de medicação, visaram a obtenção dos valores normais do animal, além de selecionar apenas os pacientes sem alterações lacrimais para o estudo. Após 20 a 30 minutos sob efeito da droga de manutenção anestésica foram novamente realizados os testes TS e BUTT, assim como após o término do procedimento cirúrgico e do efeito anestésico. Considerou-se como a alta anestésica o momento em que houve o retorno da temperatura retal normal do animal, assim como de seus reflexos. O tempo de cada procedimento foi variado, porém nenhum deles foi inferior a 20 minutos ou ultrapassou 60 minutos, e o tempo máximo de retorno anestésico foi de três horas.

As tiras para a realização do TS e do BUTT foram fornecidas por uma farmácia de manipulação veterinária. Cada fita teste foi utilizada uma vez em cada olho e após isto foi descartada, evitando-se assim uma contaminação ocular.

O TS foi realizado através da colocação da fita milimetrada, fornecida em embalagem estéril, no saco conjuntival em contato com a córnea, e deixando-a durante 1 minuto. Após a retirada da fita, verificou-se a quantidade umedecida, obtendo-se o valor do teste.

Para a realização do BUTT foi utilizada uma fita impregnada com o corante de fluoresceína, fornecida em embalagem estéril. Em cada fita, pingou-se uma gota de solução fisiológica estéril, que após contato com o corante, foi instilada no olho. Com o uso da lâmpada de Wood, a fluoresceína era visualizada sobre a superfície corneana. Após o examinador provocar uma piscada, com auxílio dos dedos, observava-se que em alguns segundos começavam a aparecer os pontos enegrecidos na córnea, e o intervalo entre a abertura palpebral e a visualização do primeiro ponto foi considerado o tempo da ruptura da lágrima e resultado do teste.

Os resultados obtidos em todas as avaliações nos dois grupos foram utilizados para a realização de análise estatística. Utilizou-se o valor numérico dos testes de Schirmer e BUTT. Todos os resultados passaram no teste de normalidade e foram avaliados estatisticamente através de análise de variância de uma via, seguido do teste post hoc de Tukey. Foram considerados significantes os resultados onde p foi menor ou igual a 0,05.

Resultados

Os testes foram realizados nos dois olhos de cada animal nos três momentos. As médias e erro padrão dos resultados obtidos para o TS no olho direito (OD) e esquerdo (OE) dos pacientes do GI, antes, durante e depois da anestesia estão dispostos na Fig. 2. Houve redução significativa nos valores do teste entre o período pré-anestésico e o trans e pós-anestésico nos dois olhos, o que também ocorreu com os resultados obtidos no BUTT neste mesmo grupo como representado na Fig. 3. Não houve diferença entre os períodos trans e pós-anestésico.

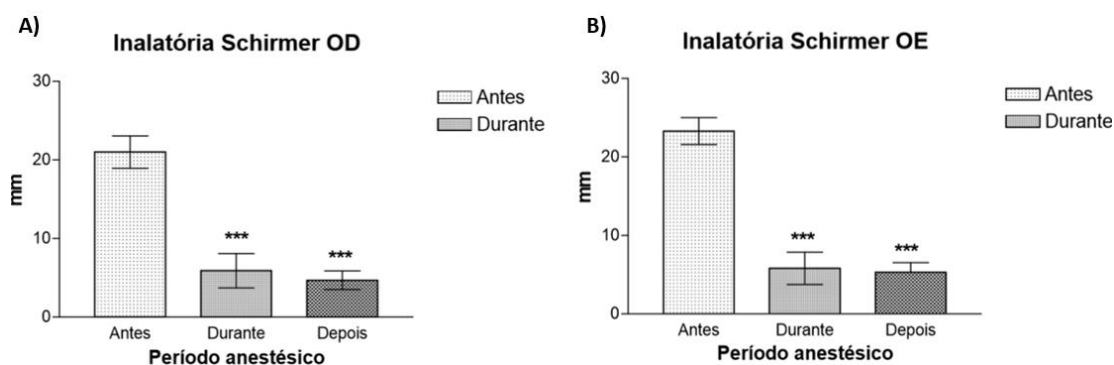


Figura 2. Média e erro padrão dos resultados do TS do olho direito (A) e esquerdo (B) dos animais do GI nos momentos antes, durante e depois da anestesia. Os asteriscos demonstram a diferença entre os períodos trans e pós-anestésicos em relação ao período pré-anestésico. *** $p < 0,001$.

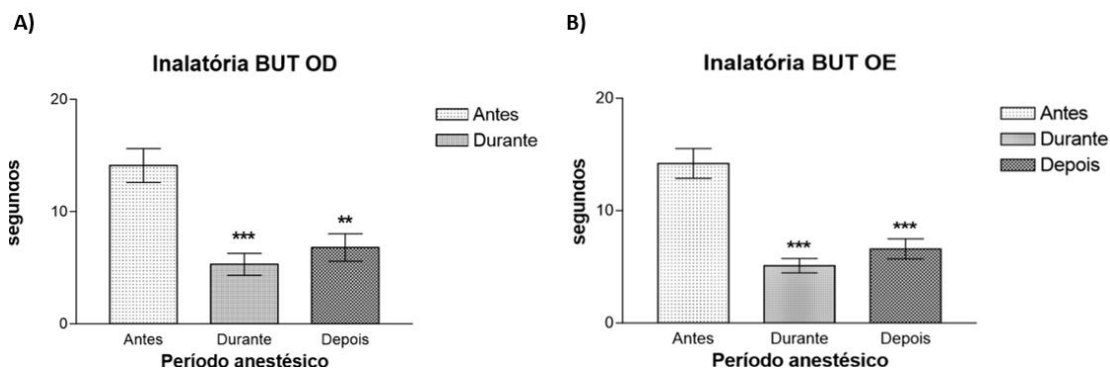


Figura 3. Média e erro padrão dos resultados do BUTT do olho direito (A) e esquerdo (B) dos animais do GI nos momentos antes, durante e depois da anestesia. Os asteriscos demonstram a diferença entre os períodos trans e pós-anestésicos em relação ao período pré-anestésico. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

As médias e erro padrão dos resultados obtidos para o TS no OD e OE dos pacientes do GII, antes, durante e depois da anestesia estão dispostos na Fig. 4. Houve redução significativa nos valores do teste entre o período pré e o trans-anestésico, permanecendo no período pós-anestésico para o OD. Não houve diferença entre os períodos trans e pós anestésico.

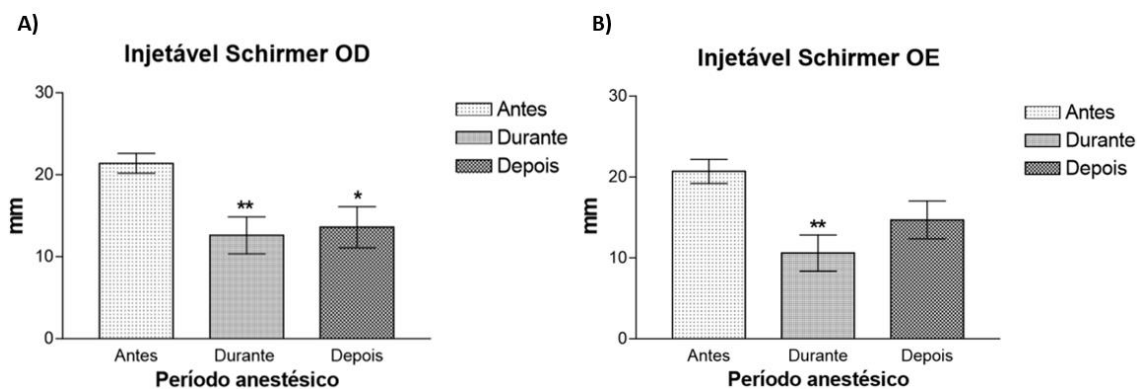


Figura 4. Média e erro padrão dos resultados do TS do olho direito (A) e esquerdo (B) dos animais do GII nos momentos antes, durante e depois da anestesia. Os asteriscos demonstram a diferença entre os períodos trans e pós-anestésicos em relação ao período pré-anestésico. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

As médias e erro padrão dos resultados obtidos para o BUTT no OD e OE dos pacientes do GII, antes, durante e depois da anestesia estão dispostos na Fig. 5. Houve redução significativa nos valores do teste entre o período pré-anestésico e os demais períodos em ambos os olhos. Não houve diferença entre os períodos trans e pós anestésico.

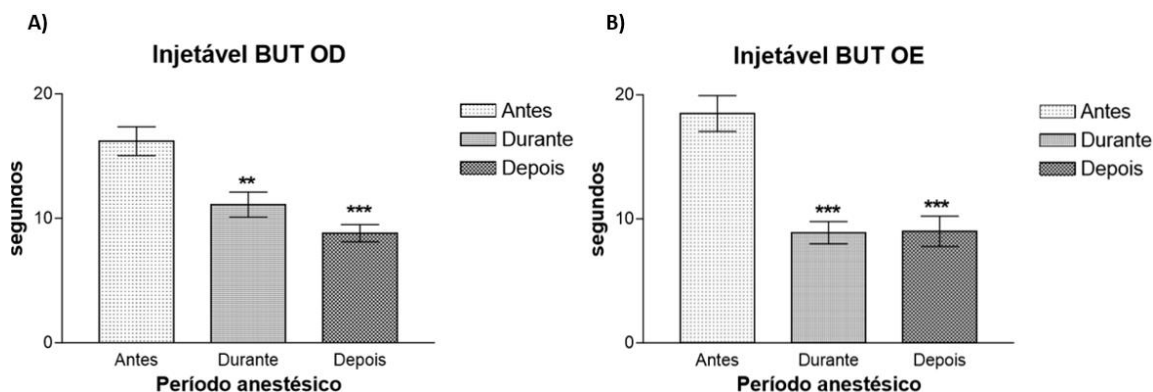


Figura 5. Média e erro padrão dos resultados do BUTT do olho direito (A) e esquerdo (B) dos animais do GII nos momentos antes, durante e depois da anestesia. Os asteriscos demonstram a diferença entre os períodos trans e pós-anestésicos em relação ao período pré-anestésico. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

As médias e erro padrão dos resultados obtidos para o TS e o BUTT nos 20 olhos dos pacientes submetidos aos dois protocolos anestésicos, no período pré-anestésico, estão dispostos na Fig. 6. Não houve diferença significativa nos resultados do TS ou do BUTT entre os grupos neste período.

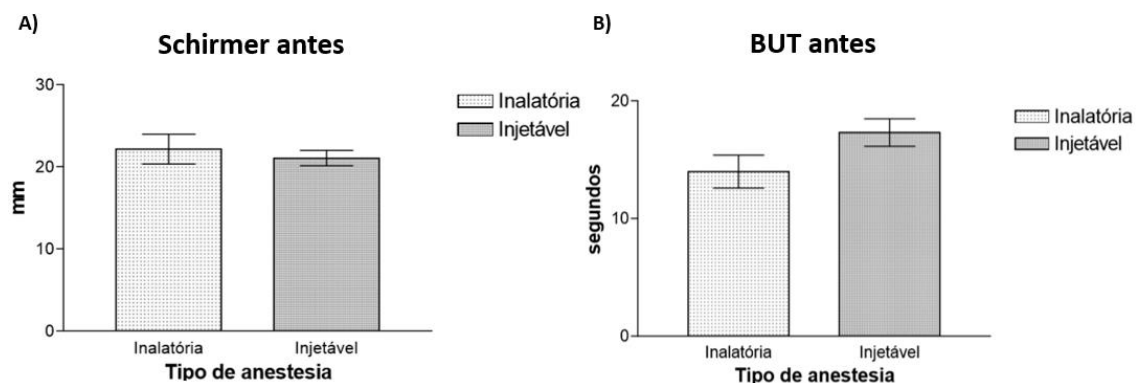


Figura 6. Média e erro padrão dos resultados de TS (A) e BUTT (B) dos animais de GI e GII antes da anestesia.

As médias e erro padrão dos resultados obtidos para o TS e o BUTT nos 20 olhos dos pacientes de cada grupo, durante a anestesia, estão dispostos na Fig. 7. Não houve diferença significativa nos resultados do TS entre os grupos neste período, porém os valores de BUTT no GII foram significativamente maiores.

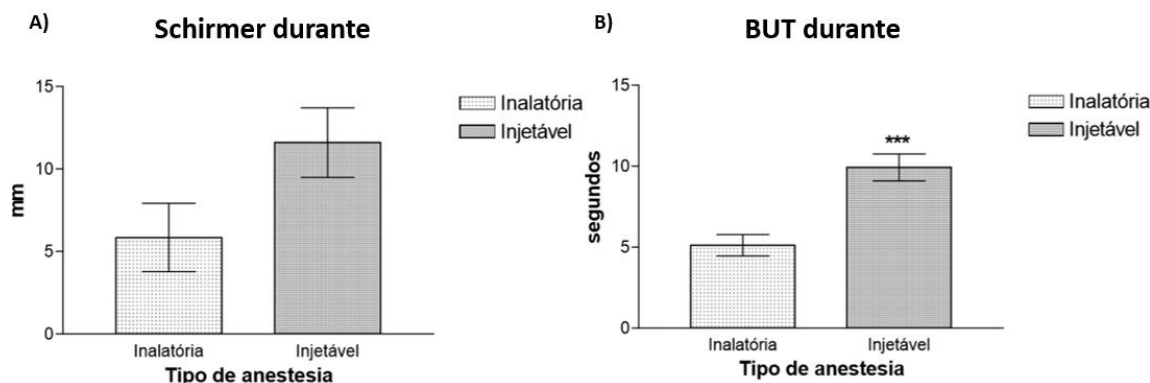


Figura 7. Média dos resultados de TS (A) e BUTT (B) dos animais de GI e GII durante a anestesia. Os asteriscos demonstram a diferença entre os períodos trans e pós-anestésicos em relação ao período pré-anestésico. *** $p < 0,001$.

As médias e erro padrão dos resultados obtidos para o TS e o BUTT nos 20 olhos dos pacientes de cada grupo, após a anestesia, estão dispostos na Fig. 8. Houve diferença significativa nos resultados do TS nos cães do GII, porém o BUTT foi semelhante entre os dois grupos, apenas foi observada uma tendência a valores mais altos no grupo submetido à anestesia injetável.

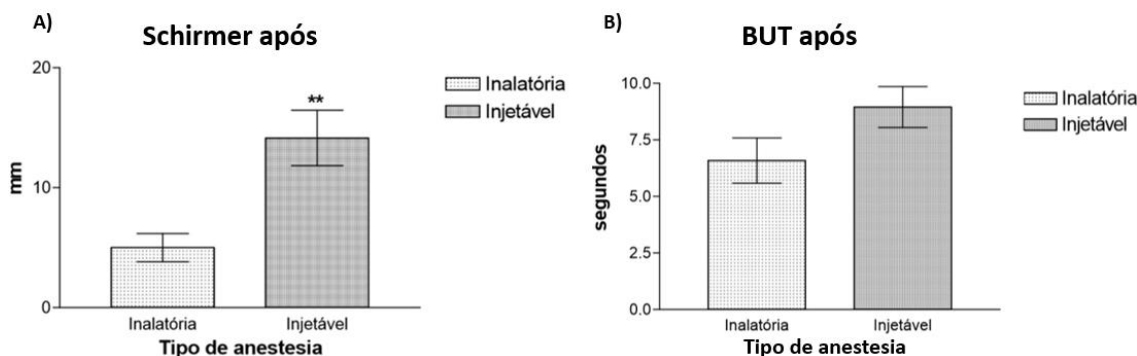


Figura 8. Média dos resultados de TS (A) e BUTT (B) dos animais de GI e GII após a anestesia. Os asteriscos demonstram a diferença entre os períodos trans e pós-anestésicos em relação ao período pré-anestésico. ** $p < 0,01$.

Discussão

Os primeiros testes realizados, antes que os animais recebessem a MPA, tiveram resultados semelhantes entre o GI e o GII e. O TS do GI apresentou valores entre 15 e 30mm e do GII entre 15 e 27mm, o que segundo Williams (2017) caracteriza normalidade na produção lacrimal. Segundo o mesmo autor, animais com o bulbo ocular proeminente podem ter valores reduzidos neste teste, porém os três cães pertencentes à raça que apresenta esta característica tiveram valores acima dos 20mm no TS. Giuliano (2013) relataram como valores normais para o BUTT, 20 segundos, porém caracterizam como

alteração valores abaixo de cinco segundos. Este teste teve resultados entre 11 e 18 segundos no GI e entre 10 e 27 segundos no GII.

Segundo Giuliano (2013), a diminuição da porção aquosa da lágrima durante os procedimentos anestésicos já é conhecida, e é comprovada pela diminuição nos testes de *Schirmer*. Quanto aos valores deste teste, os resultados do presente estudo têm seguido o que é comprovado na literatura por Herring et al. (2000), Shepard et al. (2011); Di Pietro et al. (2014) e Kanda et al. (2016) que também realizaram estudos com cães, evidenciando a influência da anestesia na produção lacrimal, já que foi constatada uma diminuição significativa nos valores obtidos durante e após a anestesia nos animais dos dois grupos. Porém, as médias obtidas do OE dos animais do GII não apresentaram diferença significativa no período pós-anestésico mesmo tendo um decréscimo, resultado semelhante ao que ocorreu no estudo de Cullen et al. (2005) que observaram que os valores de TS em felinos diminuiriam significativamente após a anestesia somente no OD. Isto demonstra que pode haver uma variação nos resultados e que tendências ao aumento ou diminuição devem ser consideradas.

O teste de BUTT teve redução significativa durante e após a anestesia nos dois olhos, nos dois grupos. Estes resultados são diferentes daqueles encontrados por Cullen et al. (2005), já que assim como nos resultados do TS, em seu trabalho só houve redução significativa no BUTT para o OD. As diferenças entre os estudos em relação ao tempo decorrido de anestesia para a mensuração dos valores podem ter interferido e gerado esta diversidade, assim como a diferença entre as espécies estudadas. Outro fator que pode ter interferido nos resultados é foram utilizados diferentes protocolos anestésicos para os 14 felinos, e há muitas ações distintas de medicamentos pré-anestésicos e anestésicos na produção lacrimal.

Em um estudo conduzido por Mouney et al. (2011), os valores obtidos com o TS em pacientes sedados com morfina e acepromazina, demonstrou que estes fármacos não interferiram na quantidade de lágrima, sendo por esta razão as medicações de escolha para o presente estudo. Em contrapartida, as avaliações feitas por Ghaffari et al. (2010) obtiveram valores menores do TS em felinos sedados com acepromazina ou xilazina, ambas em uso isolado e com o dobro da dose utilizada nos cães deste estudo. Mayordomo-Febrer et al. (2016) também obtiveram resultados menores no TS quando utilizaram a morfina associada ao midazolam em caninos. Estes resultados demonstram que o uso

isolado de fármacos ou diferentes associações entre eles podem induzir a reações distintas na produção lacrimal e no ressecamento ocular.

Costa et al. (2015) avaliaram os valores do TS de cães que receberam indução anestésica com propofol e concluíram que este fármaco não possui influência nos valores do teste, e assim na produção lacrimal, porém Pontes et al. (2010) observaram decréscimo nos valores deste teste em cães, após 10 minutos de indução com propofol.

A duração da anestesia com isoflurano é um fator que tem influência produção lacrimal, o que é comprovado por Tudor et al. (2017) que realizaram o TS em cães que receberam MPA com midazolam e butorfanol e indução anestésica com propofol em dose semelhante à do presente estudo. Houve um decréscimo significativo nos valores do teste a partir dos 30 minutos de anestesia, que neste tempo estava em média em 15mm e continuaram a decrescer chegando a 5mm entre 30 e 40 minutos. Os pacientes selecionados foram aqueles submetidos a OSH ou orquiectomia eletiva para o estudo, já que estes são procedimentos realizados com grande rotina no Hospital onde a pesquisa se desenvolveu, e a duração dos mesmos não costuma ser maior do que 40 minutos, o que permitiu uma padronização do tempo em que foram feitos os testes oculares no período trans-anestésico, tendo sido de 20 a 30 minutos após a indução anestésica.

Durante o período anestésico, os valores de TS não diferiram significativamente entre os dois grupos, porém após a anestesia foi relativamente maior nos animais do grupo injetável. O BUTT foi maior no período trans-anestésico no grupo que recebeu anestesia injetável, voltando a ser semelhante entre os grupos após a anestesia. Estes resultados confirmam a hipótese levantada por Cullen et al. (2005) de que diferentes protocolos anestésicos possam interferir de maneiras distintas na produção lacrimal. O bulbo ocular pode assumir posições diferentes em animais anestesiados, tendendo a rotacionar (Costa et al., 2015). Isto ocorreu nos pacientes do GI e não nos pacientes do GII, que tiveram a posição do bulbo centralizada durante o procedimento, porém a rotação não interferiu a execução dos testes, já que uma parte da córnea dos cães do GI podia ser facilmente visualizada. A abertura palpebral causada pelos dois protocolos foi semelhante. Acredita-se que mesmo havendo esta alteração na posição do bulbo, parte da córnea que fica exposta sofre com o ressecamento, já que os valores de BUTT demonstram-se significativamente mais baixos no GI. Por outro lado, a anestesia com cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina faz com que o bulbo fique centralizado, o que poderia

gerar um ressecamento maior ainda, mas o fato deste tipo de anestesia manter o reflexo palpebral pode ser a explicação do GII ter tido um BUTT significativamente maior, já que qualquer estímulo poderia fazer o animal piscar.

Os valores obtidos para o TS e o BUTT no período pós-anestésico para o GI e o GII foram considerados abaixo da normalidade. O intervalo máximo entre estas duas aferições foi de três horas, sendo que o último momento era considerado quando o cão possuía seus reflexos vitais e temperatura retal normais, procedimento de rotina para a alta hospitalar. Considerando que Kanda et al. (2016) encontraram valores de TS reduzidos até cinco horas após a sedação de cães, sugere-se que estudos posteriores avaliem o TS e o BUTT em um tempo maior que três horas nos mesmos protocolos anestésicos avaliados.

Além de reforçar a importância do uso de lubrificantes oculares durante e logo após a anestesia com estes protocolos, assim como já sugerido por Dodam et al. (1998), Ghaffari (2010), Kanda (2016) Mayordomo-Febrer (2017) e Tudor (2017), os resultados obtidos também sugerem que o TS ou o BUTT exigem um tempo maior que três horas após o fim do procedimento cirúrgico para que atinjam os valores normais.

Conclusões

A produção lacrimal sofre um decréscimo significativo em cães que passam pelos protocolos anestésicos avaliados neste estudo, utilizando-se como MPA a associação de sulfato morfina e acepromazina, seja quando induzidos com propofol e mantidos na anestesia inalatória com isoflurano ou quando induzidos e mantidos com cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina. Esta diminuição se mantém no período pós-anestésico imediato, sugerindo que até este período os pacientes recebam lubrificantes oculares e ainda que resultados obtidos no TS e no teste de BUTT neste período não sejam levados em consideração para o diagnóstico de CCS.

Agradecimentos

Os autores agradecem à DROGAVET® Farmácia de Manipulação Veterinária, pelo preparo e envio dos testes oculares. Ao Hospital Veterinário UNISEP por permitir que as avaliações fossem realizadas.

Referências

COSTA, D.; LEIVA, M.; MOLL, X. *et al.* Alfaxalone versus propofol in dogs: a randomised trial to assess effects on peri-induction tear production, intraocular pressure and globe position. *Veterinary Record*, v.163(3), p.73-77, 2015.

CULLEN, C. L.; LIM, C.; SYKES, J. Tear film breakup times in Young healthy cats before and after anesthesia. *Veterinary Ophthalmology*, v.8(3), p.159-165, 2005.

DODAM, J. R.; BRANSON, K. R.; MARTIN, D. D. Effects of intramuscular sedative and opioid combinations on tear production in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.1(1), p.57-59, 1998.

DEWS. The definition of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the International dry Eye workshop. *Ocul. Surf.*, v.5(2), p.75-92, 2007.

DIPIETRO, S.; MACRI, F.; BONARRIGO, T. *et al.* Effects of a medetomidine-ketamine combination on Schirmer tear test I results of clinically normal cats. *American Journal of Veterinary Research*, v.77(3), p.310-314, 2016.

GHAFFARI, S. M.; MALMASI, A.; BOKAIE, S. Effect of acepromazine or xylazine on tear production as measured by Schirmer tear test in normal cats. *American Journal of Veterinary Ophthalmology*, v.13(1), p.1-3, 2010.

GIULIANO, E. A. Disease and surgery of the canine lacrimal secretory system. In: GELATT, K. N.; GILGER, B.C., KERN, T.J. *Veterinary ophthalmology*. 5° ed. São Paulo: Roca, 2013. 912-925p.

HERRING, I. P; PICKETT, J. P.; CHAMPAGNE, E. S.; MARINI, M. Evaluation of aqueous tear production in dogs following general anesthesia. *Journal of the American animal hospital association.*, v.36, p.427-430, 2000.

KANDA, T.; ISHIHARA, S.; OKA, M. *et al.* Temporal effects of intramuscular administration of medetomidine hydrochloride or xylazine hydrochloride to healthy dogs on tear flow measured by use of a Schirmer tear test I. *American Journal of Veterinary Research*, v.77(4), p.346-350, 2016.

MAYORDOMO-FEBRER, A.; RUBIO, M.; MARTINEZ-GASSENT, M.; LÓPEZ-MURCIA, M. M. Effects of morphine-alfaxalone-midazolam premedication, alfaxalone induction and sevoflurane maintenance on intraocular pressure and tear production in dogs. *Veterinary Record*, v.180(19), p.1-5, 2016.

MOUNEY, M. C.; ACCOLA, P. J.; CREMER, J. *et al.* Effects of acepromazine maleate or morphine on tear production before, during, and after sevoflurane anesthesia in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.72(11), p.1427-1430, 2011.

PONTES, K. C de S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B. *et al.* A comparison of the

effects of Propofol and Thiopental on tear production in dogs. *Rev. Ceres*, v.57(6), p.757-761, 2010.

SNOW, J. C.; KRIPKE, B. J.; NORTON, M. L. *et al.* Corneal injuries during general anesthesia. *Anesthesia and Analgesia*, v.54(4), p.465-467, 1975.

TUDOR, R.; COSTEA, R.; DEGAN, A.; PREDOI, G. Correlation between duration of gas anesthesia with isoflurane and the reduction of tear production in geriatric patients. *Scientific Works. C Series.*, v.63(1), p.136-139, 2016.

SHEPARD, M. K.; ACCOLA, P. J.; LOPEZ, L. A. *et al.* Effect of duration and type of anesthetic on tear production in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.72(5), p.608-612, 2011.

WILLIAMS, D. Canine keratoconjunctivitis sicca: current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Ophthalmology and Optometry*, v.2(1), p.101, 2017.