



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PAULA ANATÁLIA PEREIRA BREDARIOLI

**Avaliação *in vivo* do potencial de lipossomas
contendo insulina para terapia tópica da doença do
olho seco**

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Avaliação *in vivo* do potencial de lipossomas contendo
insulina para terapia tópica da doença do olho seco**

Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
28/04/2021 para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
cosméticos

Orientado: Paula Anatólia Pereira Bredarioli

Orientador: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado a apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 28/04/2021. A
versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

RESUMO

BREDARIOLI, P. A. P. Avaliação in vivo do potencial de lipossomas contendo insulina para terapia tópica da doença do olho seco. 2021. 067f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A doença do olho seco (DOS) é uma doença multifatorial da superfície ocular que ocasiona diminuição da secreção lacrimal, hiperosmolaridade e inflamação. Estudos recentes mostram que a administração tópica de insulina (INS) aumenta a secreção lacrimal. No entanto, a rápida drenagem do local de aplicação associada à sua conhecida instabilidade em fluidos biológicos diminui a biodisponibilidade local da INS e impõem administrações múltiplas que acarretam baixa adesão ao tratamento. Lipossomas são sistemas de liberação de fármacos biocompatíveis que aumentam a estabilidade e o tempo de residência de fármacos na superfície ocular. Também há indícios de que sua composição lipídica evite a evaporação exacerbada do fluido lacrimal, característico da DOS. Com a hipótese de que a associação da INS à lipossomas aumente a biodisponibilidade ocular da INS e auxilie na proteção das células do epitélio corneano, lesionadas nos casos de DOS, o objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vivo*, o efeito de lipossomas contendo INS (lipossoma-INS) nos principais sinais da DOS: secreção lacrimal diminuída, células epiteliais agredidas, epitélio fino e inflamação. Lipossomas-INS foram preparados e caracterizados em relação ao seu tamanho médio (108 ± 6 nm), índice de polidispersão (Pdl) (0,28), potencial zeta (-5 ± 10 mV), pH ($6,7 \pm 0,1$) e osmolaridade (230 ± 5 mOsm/L), além da eficiência de encapsulação (50%, aproximadamente 0,25 mg/mL). Injetados em ratos *Wistar Hannover*, os lipossomas-INS reduziram a glicemia a níveis semelhantes ao provocado pela injeção de uma dispersão simples de INS (disp-INS), com um retardo nos primeiros 30 min, sugerindo que os lipossomas sustentam a liberação da INS. A avaliação da influência na DOS do lipossoma-INS comparada ao lipossoma branco (sem INS) e a disp-INS foi realizada em ratos *Wistar Hannover* em dois modelos de DOS: induzida por instilação de cloreto de benzalcônio (BAC) e induzida por diabetes após injeção de streptozotocina (STZ). No modelo de DOS induzida por BAC, as formulações foram instiladas diariamente. Observou-se que as características gerais do epitélio da córnea, avaliadas por citologia de impressão, foram semelhantes as apresentadas pelo controle negativo (animal saudável) quando os animais foram tratados com o lipossoma-INS, classificadas como grau 0 na escala de Nelson. O epitélio dos animais tratados com disp-INS e lipossoma branco foi classificado como grau 2 e 1, respectivamente. No entanto, utilizando esse modelo de DOS, não foi possível observar diferenças na secreção lacrimal nem mesmo entre o controle positivo (animal com DOS não tratado) e o controle negativo. A espessura do epitélio da córnea foi significativamente maior nos grupos tratados com lipossoma-INS em relação ao controle positivo. No modelo de DOS induzida por STZ, os animais foram tratados em dias alternados com as formulações. A secreção lacrimal foi significativamente maior nos animais tratados com o lipossoma branco e lipossoma-INS, com volume semelhante ao controle negativo. A expressão na córnea das citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-1 β e TNF- α , foi avaliada por PCR. Não houve alteração significativa na expressão de IL-6 entre os grupos estudados. A avaliação do gene para IL-1 β mostrou que os animais com DOS não tratados expressaram 2,5 vezes mais IL-1 β do que os animais saudáveis. O tratamento com o lipossoma-INS diminuiu essa expressão para níveis estatisticamente semelhantes ao controle negativo, enquanto o tratamento com a disp-INS não os diminuiu. Os níveis de TNF- α , elevados nos animais com DOS, foram reduzidos a níveis semelhantes ao apresentado pelo controle negativo em todos os animais tratados. Apesar dos tratamentos com a disp-INS e lipossoma branco apresentar resultados melhores do que o controle positivo em alguns dos sinais avaliados, o tratamento com o lipossoma-INS foi o único que possibilitou a recuperação dos sinais da DOS a níveis semelhantes ao controle negativo em todos os parâmetros avaliados. Sugere-se, desta forma, que a associação do lipossoma com a INS apresente um efeito sinérgico e é promissora para o tratamento da DOS.

Palavras-chave: secreção lacrimal, citocinas pró-inflamatórias, citologia de impressão, administração tópica, olho seco evaporativo.

ABSTRACT

BREDARIOLI, P. A. P. In vivo evaluation of insulin-loaded liposomes' potential for topical dry eye disease therapy. 2021. 067f. Thesis (Master's degree). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Dry eye disease (DED) is a multifactorial disease of the ocular surface that causes decreased tear secretion, hyperosmolarity, and inflammation. Recent studies show that topical insulin (INS) administration increases tear secretion. However, the rapid drainage of the application site associated with its known instability in biological fluids decreases the INS's local bioavailability and imposes multiple administrations that cause low treatment adherence. Liposomes are biocompatible drug delivery systems that increase the stability and residence time of drugs on the ocular surface. There is also evidence that its lipid composition prevents the tear fluid's exacerbated evaporation, characteristic of DED. With the hypothesis that the association of INS to liposomes increases the INS ocular bioavailability and assists in the protection of corneal epithelium cells damaged in DED, the objective of this work was to evaluate, *in vivo*, the effect of liposomes containing INS (liposome-INS) in the main signs of DED: decreased tear secretion, battered epithelial cells, thin epithelium, and inflammation. Liposome-INS was prepared and characterized in relation to their average size (108 ± 6 nm), polydispersion index (Pdl) (0.28), zeta potential (-5 ± 10 mV), pH ($6.7 \pm 0, 1$) and osmolarity (230 ± 5 mOsm/L), in addition to the encapsulation efficiency (50%, approximately 0.25 mg/mL). Injected into *Wistar Hannover* rats, liposomes-INS reduced blood glucose to levels similar to that caused by the injection of a simple INS dispersion (disp-INS), with a delay in the first 30 min, suggesting that liposomes sustain INS release. The evaluation of the influence of the liposome-INS compared to the blank liposome (without INS) and disp-INS on the DED was carried out in *Wistar Hannover* rats in two DED models: induced by instillation of benzalkonium chloride (BAK) and induced by diabetes after streptozotocin (STZ) injection. In the BAK-induced DED model, the formulations were instilled daily. It was observed that the corneal epithelium's general characteristics, assessed by impression cytology, were similar to those presented by the negative control (healthy animal) for liposome-INS treated animals, classified as grade 0 on the Nelson scale. The epithelium of animals treated with disp-INS and blank liposome was classified as grade 2 and 1, respectively. However, using this DED model, it was impossible to observe differences in tear secretion even between the positive control (animal with untreated DED) and the negative control. The corneal epithelium thickness was significantly greater in the groups treated with liposome-INS compared to the positive control. In the STZ-induced DED model, animals were treated on alternate days with the formulations. Lacrimal secretion was significantly higher in animals treated with blank liposome and liposome-INS, with a volume similar to the negative control. Corneal expression of pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-1 β , and TNF- α , was assessed by PCR. There was no significant change in the expression of IL-6 between the groups studied. The evaluation of the gene for IL-1 β showed that animals with untreated DED expressed 2.5 times more IL-1 β than healthy animals. Treatment with the liposome-INS decreased this expression to levels statistically similar to the negative control, while treatment with disp-INS did not decrease them. The levels of TNF- α , elevated in animals with DED, were reduced to levels similar to that presented by the negative control in all treated animals. Although the treatments with disp-INS and blank liposome show better results than the positive control in some of the evaluated signs, the treatment with the liposome-INS was the only one that made it possible to recover DED signs at levels similar to the negative control in all evaluated parameters. Therefore, it is suggested that the association of the liposome with INS has a synergistic effect and is promising for the treatment of DED.

Keywords: tear secretion, proinflammatory cytokines, impression cytology, topical administration, evaporative dry eye

INTRODUÇÃO

A doença do olho seco (DOS), também conhecida como síndrome do olho seco ou *keratoconjunctivitis sicca*, é uma doença multifatorial da superfície ocular caracterizada pela instabilidade e hiperosmolaridade do filme lacrimal, inflamação, danos da superfície ocular e anormalidades neurosensoriais (JONES et al., 2017; STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012; TORRICELLI et al., 2011). Os principais sintomas são: secura, coceira, sensação de corpo estranho, irritação e sensibilidade a luz (STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012). Várias são as causas da DOS, tais como as doenças autoimunes, diabetes e o uso de medicamentos (COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR, 2014). Independente da causa, disfunções na unidade funcional lacrimal (UFL) são observadas. Essas disfunções causam instabilidade do filme lacrimal que culmina na hiperosmolaridade e conseqüente inflamação da superfície ocular, dando origem aos sintomas do olho seco (STERN; SCHAUMBURG; PFLUGFELDER, 2013; TORRICELLI et al., 2011).

Com base nas alterações que acarreta ao filme lacrimal, a DOS é classificada em duas categorias: estado de deficiência aquosa, do inglês *Aqueous Deficient Dry Eye* (ADDE) e estado evaporativo, do inglês *Evaporative Dry Eye* (EDE). A ADDE é caracterizada pela produção reduzida de lágrimas enquanto a EDE é caracterizada pela evaporação aumentada da camada aquosa do filme lacrimal e é mais prevalente, representando 80 a 90% dos casos.

Independente da categoria, devido a etiologia diversa e a todas as complicações que acarreta, ainda não foi encontrada uma cura para a DOS e o tratamento é paliativo. Quando do tipo EDE, a administração de colírios que reponham os lipídeos não secretados pela glândula de meibômio pode auxiliar na diminuição do fenômeno evaporativo. A ADDE pode ser temporariamente aliviada pela administração tópica de lágrimas artificiais, anti-inflamatórios tópicos e corticosteróides para diminuir o processo inflamatório decorrente da doença. No entanto, as lágrimas artificiais só causam um alívio imediato e são rapidamente drenadas, os anti-inflamatórios podem causar reações adversas em doses elevadas e o uso prolongado de corticoides causa elevação da pressão intraocular e também catarata (COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR, 2014; THULASI; DJALILIAN, 2017). Desta forma, a busca por fármacos que aliviem os sintomas da DOS por períodos prolongados e sem muitos efeitos adversos é intensa.

Uma substância já bastante conhecida que vem sendo estudada na terapêutica da DOS é a insulina (INS). A literatura sugere que a INS tenha um papel relevante na manutenção da homeostasia do olho (ZHANG et al., 2016). Corroborando com essa hipótese está a presença de receptores para INS nas estruturas oculares da córnea, nos tecidos neurais e vasculares da retina e nas glândulas lacrimais (ROCHA et al., 2000). Sendo um fator de crescimento, com vários papéis fisiológicos, sabe-se que a ausência da INS provoca, pelo menos, a hiperglicemia. A hiperglicemia gera alterações na UFL, resultando na produção insuficiente de lágrimas ou no excesso de perda das mesmas, além de anormalidades no piscar e mudanças na composição do filme lacrimal, por isso a DOS é comum em pacientes diabéticos (ZHANG et al., 2016).

A administração ocular de INS com o intuito de controlar a DOS requer, no entanto, formulações adequadas que garantam a biodisponibilidade local desse fármaco. Dependendo das características do meio onde está dispersa, a INS pode estar presente na forma monomérica ou agregada (SHARMA; BAJAJ; KALONIA, 2010), o que influencia na sua absorção celular. Sua elevada massa molecular e instabilidade nos fluidos biológicos resultam na necessidade de administração de doses elevadas e frequentes. Ainda, a via de administração tópica ocular, recomendada e aceita para a terapia da DOS, é repleta de barreiras que afetam diretamente a biodisponibilidade de formulações aplicadas no olho. Uma delas é a drenagem nasolacrimal, que diminui o tempo de residência da formulação no local (KAUR et al., 2004). Assim, para a biodisponibilidade ocular da INS ser adequada e a sua posologia confortável para o paciente, sua incorporação em sistemas de liberação é necessária (CUI et al., 2015; KAUR et al., 2004).

Os lipossomas são sistemas de liberação muito promissores, neste contexto, pois além de terem a finalidade de carrear a INS, podem, devido a sua composição lipídica, auxiliar a diminuir os sintomas da EDE (ALLEN; CULLIS, 2013). Biocompatíveis e biodegradáveis, os lipossomas podem carrear fármacos lipofílicos e hidrofílicos ao mesmo tempo, além de protegê-los contra a degradação (AKBARZADEH et al., 2013; ALLEN; CULLIS, 2013). Estima-se que interação entre os lipossomas e os lipídeos presentes na membrana celular epitelial e na camada lipídica do filme lacrimal possa levar a um aumento do tempo de residência da formulação na superfície da córnea. A INS liberada de maneira sustentada pode interagir com os receptores presentes na córnea ou com aqueles presentes nas

glândulas lacrimais, aumentando sua biodisponibilidade local (ELNAGGAR, 2015; KAUR et al., 2004).

Lipossomas contendo INS (lipossoma-INS) foram desenvolvidos e avaliados *in vitro* em cultura de células de epitélio da córnea humana (PEREIRA, 2017). Sob estímulo inflamatório, foi observado que o tratamento das células com o lipossoma-INS resultou em aumento da expressão de interleucina 6 (IL-6) (PEREIRA, 2017). Este aumento pode ser benéfico para a cicatrização de feridas na córnea resultantes da DOS. Estudos *in vivo* são, no entanto, imprescindíveis para, num ambiente dinâmico, se avaliar a influência da formulação nos principais sintomas da DOS, como redução da secreção lacrimal e alterações nas características das células do epitélio corneano.

Dada a relevância e a incidência cada vez mais crescente da DOS na população mundial, e ainda considerando a falta de estudos concretos a respeito de novas terapias para o tratamento do olho seco, o estudo de formulações inovadoras contendo INS que sejam capazes de trazer além do alívio aos sintomas, um controle da homeostasia e o reparo dos danos na córnea causados pela DOS torna-se de grande relevância. Desta forma, a avaliação *in vivo* dos lipossomas, contendo ou não INS, aplicados topicamente em um modelo animal de DOS foi o objetivo central deste trabalho.

CONCLUSÃO

Os lipossomas-INS desenvolvidos, capazes de encapsular aproximadamente 0,25 mg/mL de INS, preservaram a capacidade da INS em reduzir os níveis de glicose no sangue. Administrados topicamente, os lipossomas-INS estimularam a secreção

lacrimal de animais diabéticos a níveis semelhantes ao do animal saudável. Também diminuíram a expressão da IL-1 β e do TNF- α , conhecidos mediadores pró-inflamatórios na DOS e superexpressos no animal diabético, a níveis estatisticamente semelhantes ao expresso pelos animais sem a doença. Adicionalmente, a administração tópica dos lipossomas-INS em animais com o epitélio corneano danificado por BAC, foi capaz de recuperar as características do epitélio, que apresentaram classificação na escala de Nelson semelhante ao do animal saudável após o tratamento. Independente do modelo de DOS avaliado, o tratamento com a formulação aumentou a espessura do epitélio afinado na DOS. Os tratamentos com os lipossomas brancos e com a disp-INS também foram capazes de melhorar as características do epitélio, aumentar a espessura e secreção lacrimal e diminuir a expressão de citocinas inflamatórias, porém a níveis menores do que o lipossoma-INS, sugerindo que a associação da INS com o lipossoma resulta em efeitos sinérgicos e é potencialmente promissora para o tratamento da DOS.

REFERÊNCIAS

ABIDI, A.; SHUKLA, P.; AHMAD, A. Lifitegrast: A novel drug for treatment of dry eye disease. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 194, 2016.

AGARWAL, R. et al. **Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update***Drug Delivery* Taylor and Francis Ltd, , 3 maio 2016.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome : classification , preparation , and applications. p. 1–9, 2013.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36–48, 2013.

ALVES, M. et al. Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2675–2681, 8 dez. 2005.

ALVES, M. et al. Dry eye disease treatment: A systematic review of published trials and a critical appraisal of therapeutic strategies. **Ocular Surface**, v. 11, n. 3, p. 181–192, 2013.

ALVES, M. DE C. et al. Tear film and ocular surface changes in diabetes mellitus. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 71, n. 6 Suppl, p. 96–103, 2008.

BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte***Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* Faculdade de Ciencias Farmaceuticas (Biblioteca), , 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 31 ago. 2020

BOWMAN, L. M. et al. Development of a Topical Polymeric Mucoadhesive Ocular Delivery System for Azithromycin. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 133–140, abr. 2009.

BRANGE, J. **Galenics of Insulin : the Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1987.

BUKOWIECKI, A. et al. **Wound-healing studies in cornea and skin: Parallels, differences and opportunities***International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 12 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1257>>. Acesso em: 31 jul. 2020

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. **Immune regulation by glucocorticoids***Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri.2017.1>>. Acesso em: 10 fev. 2021

CARNEY, L. G.; MAUGER, T. F.; HILL, R. M. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 30, n. 4, p. 747–54, abr. 1989.

CASTRO, J. S. DE et al. Prevalence and Risk Factors of self-reported dry eye in Brazil using a short symptom questionnaire. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2076, 1 dez. 2018.

CHEN, H.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers: Stability and bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 42, n. 3, p. 263–272, 1 dez. 1996.

COHEN, J. Educational and Psychological Measurement. 1960.

COLLIGRIS, B.; ALKOZI, H. A.; PINTOR, J. Recent developments on dry eye disease treatment compounds. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 28, n. 1, p. 19–30, 2014.

CRUZ-CAZARIM, E. L. C. et al. Prospective insulin-based ophthalmic delivery systems for the treatment of dry eye syndrome and corneal injuries. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 140, p. 1–10, 1 jul. 2019.

CUI, M. et al. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, n. 1–2, p. 277–284, 2015.

DAULL, P. et al. Modulation of Inflammation-Related Genes in the Cornea of a Mouse Model of Dry Eye upon Treatment with Cyclosporine Eye Drops. **Current Eye Research**, v. 44, n. 5, p. 476–485, 4 maio 2019.

DELAMO, E.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systemsA shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 135–143, fev. 2008.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 37, n. 3, p. 588–598, mar. 2011.

ELNAGGAR, Y. S. R. Multifaceted applications of bile salts in pharmacy: An emphasis on nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3955–3971, 2015.

FONSECA, E. C.; ARRUDA, G. V.; ROCHA, E. M. Olho seco: etiopatogenia e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 197–203, 2010.

GARG, A.; ZHANG, X. **Lacrimal gland development: From signaling interactions to regenerative medicine***Developmental Dynamics* John Wiley and Sons Inc., , 1 dez. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.24551>>. Acesso em: 15 jul. 2020

GAUDANA, R. et al. **Ocular drug delivery**.*The AAPS journal*AAPS J, , set. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20437123/>>. Acesso em: 1 mar. 2021

GEORGIEV, D. Photons do collapse in the retina not in the brain cortex: Evidence from visual illusions. **NeuroQuantology**, v. 9, n. 2, p. 206–230, 2 maio 2011.

HRYNYK, M.; NEUFELD, R. J. Insulin and wound healing. **Burns**, v. 40, n. 8, p. 1433–1446, 2014.

JONES, L. et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. **Ocular Surface**, v. 15, n. 3, p. 575–628, 2017.

KAUR, I. P. et al. Vesicular systems in ocular drug delivery: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 1–14, 2004.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159, 1977.

LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 640–653, 15 fev. 2019.

LIN, Z. et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. **Molecular vision**, v. 17, n. January, p. 257–264, 2011.

LUDWIG, A.; REIMANN, H. Eye. In: **Practical Pharmaceutics**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 163–188.

MAKARENKOVA, H. P.; DARTT, D. A. Myoepithelial Cells: Their Origin and Function in Lacrimal Gland Morphogenesis, Homeostasis, and Repair. **Current Molecular Biology Reports**, v. 1, n. 3, p. 115–123, 10 set. 2015.

MARQUES, D. L. et al. Lacrimal osmolarity and ocular surface in experimental model of dry eye caused by toxicity. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 74, n. 2, p. 68–72, 2015.

MESSMER, E. M. Pathophysiology, diagnosis and treatment of dry eye. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 112, n. 5, p. 71–82, 30 jan. 2015a.

MESSMER, E. M. Pathophysiology, diagnosis and treatment of dry eye. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 112, n. 5, p. 71–82, 30 jan. 2015b.

MIZOGUCHI, S. et al. **Ocular surface inflammation impairs structure and function of meibomian gland** *Experimental Eye Research* Academic Press, , 1 out. 2017.

MÓDULO, C. M. et al. Influence of insulin treatment on the lacrimal gland and ocular surface of diabetic rats. **Endocrine**, v. 36, n. 1, p. 161–168, 2009.

NAKAMURA, S. et al. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

NELSON, J. D. Impression cytology. **Cornea**, v. 7, n. 1, p. 71–81, 1988.

PATEL, D. V.; MCGHEE, C. N. J. Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 12, p. 4485–4488, 1 dez. 2005.

PEREIRA, F. Universidade de são paulo. p. 7744, 2017.

ROCHA, E. M. et al. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. **Current eye research**, v. 21, n. 5, p. 833–842, 2000.

RODA, M. et al. **Dry eye disease and tear cytokine levels— a meta-analysis** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 maio 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/9/3111>>. Acesso em: 10 fev. 2021

ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. **Survey of ophthalmology**, v. 45 Suppl 2, n. March, p. S203–S210, 2001.

SAHOO, S.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 144–151, fev. 2008.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I – Barriers and determining factors in ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 70–75, 2017.

SANDRELLI, K. et al. Ocular delivery of moxifloxacin-loaded liposomes Perfil de liberação ocular de lipossomas contendo moxifloxacino. **Arq Bras Oftalmol**, v. 81, n. 6, p. 510–513, 2018.

SHARMA, V. K.; BAJAJ, H.; KALONIA, D. S. Reversible Self-Association of Pharmaceutical Proteins: Characterization and Case Studies. **Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals**, p. 429–455, 2010.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, mar. 2003.

STERN, M. E.; SCHAUMBURG, C. S.; PFLUGFELDER, S. C. Dry eye as a mucosal autoimmune disease. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 19–41, 2013.

STEVENSON, W.; CHAUHAN, S. K.; DANA, R. Dry Eye Disease. **Archives of Ophthalmology**, v. 130, n. 1, p. 90, 1 jan. 2012.

THULASI, P.; DJALILIAN, A. R. Update in Current Diagnostics and Therapeutics of Dry Eye Disease. **Ophthalmology**, v. 124, n. 11, p. S27–S33, 2017.

TOMLINSON, A. et al. Tear Film Osmolarity: Determination of a Referent for Dry Eye Diagnosis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 10, p. 4309, 1 out. 2006.

TORRICELLI, A. A. M. et al. **Ocular surface adverse effects of ambient levels of air pollution**. [s.l: s.n.]. v. 74

TSUBOTA, K. et al. New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. **Ocular Surface**, v. 15, n. 1, p. 65–76, 2017.

VIAU, S. et al. Time course of ocular surface and lacrimal gland changes in a new scopolamine-induced dry eye model. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 246, n. 6, p. 857–867, 2008.

VICARIO-DE-LA-TORRE, M. et al. Design and Characterization of an Ocular Topical Liposomal Preparation to Replenish the Lipids of the Tear Film. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 12, p. 7839–7847, 5 dez. 2014.

WEI, Y.; ASBELL, P. A. The core mechanism of dry eye disease is inflammation. **Eye and Contact Lens**, v. 40, n. 4, p. 248–256, 2014.

WILLOUGHBY, C. E. et al. Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 2–11, 2010.

XIONG, C. et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 49, n. 5, p. 1850–1856, 2008.

YAMADA, M. et al. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. **Current eye research**, v. 17, n. 10, p. 1005–9, out. 1998.

ZAGON, I. S. et al. Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in diabetes mellitus. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 8, p. 1082–1088, 2007.

ZAGON, I. S.; SASSANI, J. W.; MCLAUGHLIN, P. J. Insulin treatment ameliorates impaired corneal reepithelialization in diabetic rats. **Diabetes**, v. 55, n. 4, p. 1141–1147, 1 abr. 2006.

ZHANG, X. et al. Dry Eye Syndrome in Patients with Diabetes Mellitus: Prevalence, Etiology, and Clinical Characteristics. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, p. 1–7, 2016.