



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GIOVANA JOSÉ GARCIA ESTANHO

**COMPARAÇÃO DO TACROLIMUS 0.03% TÓPICO E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS HOMÓLOGO INJETÁVEL NO TRATAMENTO DE
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Presidente Prudente - SP
2021



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GIOVANA JOSÉ GARCIA ESTANHO

**COMPARAÇÃO DO TACROLIMUS 0.03% TÓPICO E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS HOMÓLOGO INJETÁVEL NO TRATAMENTO DE
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora:
Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco
Andrade

Presidente Prudente - SP
2021

636.089
E79c

Estanho, Giovana José Garcia.

Comparação do tacrolimus 0.03% tópico e plasma rico em plaquetas homólogo injetável no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães / Giovana José Garcia Estanho. – Presidente Prudente, 2021.

32f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

1. Tacrolimus 0.03%. 2. Plasma rico em plaqueta homólogo. 3. Ceratoconjuntivite seca. 4. Cães. Título.

GIOVANA JOSÉ GARCIA ESTANHO

**COMPARAÇÃO DO TACROLIMUS 0.03% TÓPICO E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS HOMÓLOGO INJETÁVEL NO TRATAMENTO DE
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 27 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sílvia Maria Caldeira Franco Andrade
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Rosa Maria Barili Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Eduardo Perlmann
Centro Veterinário Pet Care
São Paulo-SP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Nilza, que foi a maior incentivadora e suporte para realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me sustentar diante das dificuldades e obstáculos que surgiram nesse percurso;

Agradeço aos meus pais Domingos e Nilza, por me acolherem em todos os momentos da vida, dando apoio e acreditando em minhas escolhas. Principalmente à minha mãe, que nunca mediu esforços físicos, mentais e econômicos para me ajudar a realizar meus sonhos;

Agradeço à minha irmã Carolina, que compartilhou a vida comigo nesse período de pesquisa e que ajudou físico e emocionalmente para sua realização;

Agradeço à minha orientadora, Dra. Silvia Franco Andrade, que me aceitou em sua equipe oftálmica me permitindo aprender e me apaixonar cada dia mais pela área. Obrigada por encarar esse desafio comigo;

Agradeço à Dra. Cecília Laposy pela orientação do projeto de pesquisa, pelo processamento do material e por toda ajuda que me deu nesse processo;

Agradeço aos meus companheiros de vida Duda, Chico, Flor, Dora, Amora, Dionísio, Xã e Quitos, por todo amor que me dão;

Agradeço ao irmão que a vida me deu, João Victor, que desde a graduação foi meu apoio nos momentos mais difíceis, e que foi fundamental para que eu pudesse realizar esse estudo, me substituindo enquanto precisei trabalhar. Minha gratidão é infinita por você;

Agradeço à Letícia e ao Daniel, que realizaram todos os momentos dessa pesquisa ao meu lado, presentes e prontos para cada passo que avançávamos e que sem vocês, nada disso seria possível;

Agradeço aos membros da equipe oftálmica da UNOESTE, Gismelli, Helena, João Victor, Cláudia, William e Luís Felipe que foram essenciais ajudando para que pudéssemos caminhar com nosso estudo, além de se tornarem amigos especiais;

Agradeço às minhas amigas Élen, Juliana, Jéssica e Ariadne que me ajudaram a passar pelos momentos mais críticos durante o projeto de pesquisa, tornando a vida mais leve e acreditando em mim;

Agradeço a todos os animais que participaram dessa pesquisa, tornando-a possível e aos os tutores que permitiram que seus animais fossem parte da nossa pesquisa, se comprometendo a cumprir com os requisitos do estudo.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento: 001”

“Seja forte e corajoso. Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.
Josué 1:9

RESUMO

Comparação do Tacrolimus 0.03% tópico e Plasma Rico em Plaquetas Homólogo injetável no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães

O objetivo do estudo foi comparar o uso convencional do imunossupressor tacrolimus 0.03% colírio com o plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) injetável, em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS). Foram avaliados 66 olhos, 22 olhos do grupo controle negativo (GCN) provenientes do canil da Unoeste, 22 olhos do grupo tacrolimus (GT) e 22 olhos do grupo plasma rico em plaqueta homólogo (GPRPH), sem predileção racial, etária ou sexual, atendidos pelo serviço de oftalmologia do Hospital Veterinário da Unoeste e diagnosticados com CCS, conforme o Teste Lacrimal de Shirmer-1 (TLS-1) e Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL). O GT recebeu topicamente colírio tacrolimus 0.03%, 1 gota em ambos os olhos, 2x/dia, e o GPRPH aplicação injetável de 0.3 ml de PRPH, 0.1 ml na conjuntiva palpebral inferior, 0.1 ml na superior e 0.1 ml na glândula da terceira pálpebra, 1 vez a cada 30 dias, conforme melhora dos sinais de CCS, totalizando, no máximo, três aplicações. Os animais foram avaliados mensalmente por 6 meses pelos sinais clínicos e testes oftálmicos específicos: Teste Lacrimal de Shirmer-1, Teste de Osmolaridade (TOL), Teste de Meniscometria de Tira (TMT), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal, Teste de Fluoresceína (TF) e Teste de Lissamina Verde (TLV). O GPRPH, dos 11 cães (n=22 olhos) tratados, o número necessário de aplicações que melhoraram os sinais oculares iniciais foram: 36% (4 cães) receberam 3 aplicações, 55% (6 cães) receberam 2 aplicações, e 9% (1 cão) recebeu 1 aplicação. Os sinais oculares de pigmentação, úlcera e neovascularização de córnea, secreção ocular e hiperemia conjuntiva, apresentaram melhora, em ambos os grupos, até o final do estudo. No GT, ao final do estudo, foi observado aumento significativo ($p<0.05$) maior do que o GPRPH nos valores de TLS-1, TMT e contagem das células calciformes. No GPRPH houve uma diminuição significativa ($p<0.05$) maior do que o GT na contagem de linfócitos e neutrófilos da conjuntiva palpebral. No TRFL e TOL houve aumento significativo ($p<0.05$) dos valores até o final, com desempenho igual do GT e GPRPH. No TF e TLV, ao final do estudo todos foram negativos, com negativação mais precoce do GT no TF, e desempenho igual do TLV em ambos os grupos. De uma maneira geral, ambos os grupos foram equivalentes na melhora dos parâmetros TRFL, TOL e TLV. O tacrolimus 0.03% colírio se mostrou mais eficiente no aumento da produção lacrimal e no número de células calciformes do que o PRPH. Entretanto, o PRPH injetável demonstrou ser mais eficiente do que o GT, na diminuição das células inflamatórias conjuntivais. Concluímos que o uso injetável do PRP homólogo, necessita em média de 2 a 3 aplicações mensais, é seguro e exequível a nível ambulatorial, financeiramente mais viável do que o tacrolimus, e pode ser utilizado como uma terapia alternativa mais acessível, ou sugerida como adjuvante ao tratamento convencional com imunossupressores tópicos.

Palavras-chave: Tacrolimus 0.03%, plasma rico em plaquetas homólogo, ceratoconjuntivite seca, cães.

ABSTRACT

Comparison of the topical 0.03% Tacrolimus and Injectable Homologous Platelet-Rich Plasma in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs

The aim of the study was to compare the conventional use of the topical immunosuppressant tacrolimus 0.03% eye drops with the injectable homologous platelet-rich plasma (HPRP) in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS). Sixty-six eyes were evaluated, 22 eyes from the negative control group (NCG) coming from the Unoeste kennel, 22 eyes from the tacrolimus group (TG) and 22 eyes from the homologous platelet-rich plasma group (HPRPG) without breed, age or sexual predilection attended by the ophthalmology sector Veterinary Hospital of the Unoeste and diagnosed with KCS. The TG received topical 0.03% tacrolimus eye drops, 1 drop in both eyes, twice a day, and the HPRPG received an injectable application of 0.3 ml of HPRP, 0.1 ml in the lower palpebral conjunctiva, 0.1 ml in the upper and 0.1 ml in the third eyelid gland, once every 30 days, as signs of KCS improve, totaling a maximum of three applications. The animals were evaluated monthly for 6 months for clinical signs and specific ophthalmic tests: Shirmer's Tear Test-1 (STT-1), Osmolarity Test (OT), Strip meniscometry test (SMT), Tear Film Break-up Test (TBUT), Fluorescein Test (FT) and Lyssamine Green Test (LGT). The HPRPG, of the 11 dogs (n=22 eyes) treated, the required number of applications that improved the initial ocular signs was: 36% (4 dogs) received 3 applications, 55% (6 dogs) received 2 applications, and 9% (1 dog) received 1 application. The ocular signs of pigmentation, corneal ulcer and neovascularization, ocular secretion and conjunctival hyperemia showed improvement in both groups by the end of the study. In the TG, by the end of the study, there was a significant increase ($p < 0.05$) greater than the TG in the values of STT-1, SMT and count of goblet cells of the palpebral conjunctiva. In HPRPG there was a significant decrease ($p < 0.05$) greater than in TG in the count of lymphocytes and neutrophils of the palpebral conjunctiva. In TBUT and TOT there was a significant increase ($p < 0.05$) of values until the end, with equal performance of TG and HPRPG. In the FT and LGT, at the end of the study were all negative, with an earlier negative of the FT on the TG, and equal performance of the LGT in both groups. In general, both groups were equivalent in the improvement of TBUT, OT and LGT parameters. Tacrolimus 0.03% eye drops proved to be more efficient in increasing tear production and the number of goblet cells than HPRP. However, injectable HPRP proved to be more efficient than TG in decreasing conjunctival inflammatory cells. We concluded that the injectable use of homologous PRP requires an average of 2 to 3 monthly applications, is safe and feasible on an ambulatory care level, more financially viable than tacrolimus, and can be used as a more accessible alternative therapy or suggested as an adjuvant to conventional treatment with topical immunosuppressants.

Keywords: Tacrolimus 0.03%, homologous platelet-rich plasma, keratoconjunctivitis sicca, dogs.

LISTA DE SIGLAS

x/dia – vezes por dia

% - Porcentagem

ARVO – Associação de Pesquisa em Visão e Oftalmologia

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCS – Ceratoconjuntivite seca

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

FL – Filme lacrimal

Mm/min – Milímetros por minuto

Mm/5seg – Milímetros por 5 segundos

Mm³ - milímetro cúbico

M0 – Momento zero

M1 – Momento um

M2 – Momento dois

M3 – Momento três

M4 – Momento quatro

M5 – Momento cinco

M6 – Momento seis

mOsmol/L – miliosmoles por litro

TF – Teste de Fluoresceína

TLS – Teste Lacrimal de Schirmer

TLV – Teste de Lissamina Verde

TMT – Teste de Meniscometria de Tira

TOL – Teste de Osmolaridade Lacrimal

TRFL – Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

PRPH – Plasma Rico em Plaqueta Homólogo

Rpm – Rotação por minuto

Seg – Segundos

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista

SUMÁRIO

ARTIGO.....	12
ANEXO - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.....	29

ARTIGO

Comparison of the topical 0.03% tacrolimus and homologous injectable platelet-rich plasma in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs.

Giovana J.G. Estanho² João Victor G.C. Passareli², Cláudia L. Rissi², Isabela V. Donadão³, Aline F. Repik³, Letícia S. Pando⁴, Daniel V. Espinhosa⁴, Gisele A. Nai⁵, Cecília L. Santarém⁶ and Silvia F. Andrade^{7*}

ABSTRACT.- Estanho G.J.G., Passareli J.V.G.C., Rissi C.L., Donadão I.V., Repik A.F., Pando L.S., Espinhosa D.V., Nai G.A., Santarém C.L. & Andrade S.F. Comparison of the topical 0.03% tacrolimus and homologous injectable platelet-rich plasma in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. Comparação do uso de tacrolimus 0,03% tópico e plasma rico em plaqueta injetável no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposos Tavares, Km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil. E-mail: silviafranco@unoeste.br

The aim of the study was to compare the conventional use of the topical immunosuppressant tacrolimus 0.03% eye drops with the injectable homologous platelet-rich plasma (HPRP) in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS). Sixty-six eyes were evaluated, 22 eyes from the negative control group (NCG) coming from the Unoeste kennel, 22 eyes from the tacrolimus group (TG) and 22 eyes from the homologous platelet-rich plasma group (HPRPG) without breed, age or sexual predilection attended by the ophthalmology sector Veterinary Hospital of the Unoeste and diagnosed with KCS. The TG received topical 0.03% tacrolimus eye drops, 1 drop in both eyes, twice a day, and the HPRPG received an injectable application of 0.3 ml of HPRP, 0.1 ml in the lower palpebral conjunctiva, 0.1 ml in the upper and 0.1 ml in the third eyelid gland, once every 30 days, as signs of KCS improve, totaling a maximum of three applications. The animals were evaluated monthly for 6 months for clinical signs and specific ophthalmic tests: Shirmer's Tear Test-1 (STT-1), Osmolarity Test (OT), Strip meniscometry test (SMT), Tear Film Break-up Test (TBUT), Fluorescein Test (FT) and Lyssamine Green Test (LGT). The HPRPG, of the 11 dogs (n=22 eyes) treated, the required number of applications that improved the initial ocular signs was: 36% (4 dogs) received 3 applications, 55% (6 dogs) received 2 applications, and 9% (1 dog) received 1 application. The ocular signs of pigmentation, corneal ulcer and neovascularization, ocular secretion and conjunctival hyperemia showed improvement in both groups by the end of the study. In the TG, by the end of the study, there was a significant increase ($p<0.05$) greater than the TG in the values of STT-1, SMT and count of goblet cells of the palpebral conjunctiva. In HPRPG there was a significant decrease ($p<0.05$) greater than in TG in the count of lymphocytes and neutrophils of the palpebral conjunctiva. In TBUT and TOT there was a significant increase ($p<0.05$) of values until the end, with equal performance of TG and HPRPG. In the FT and LGT, at the end of the study were all negative, with an earlier negative of the FT on the TG, and equal performance of the LGT in both groups. In general, both groups were equivalent in the improvement of TBUT, OT and LGT parameters. Tacrolimus 0.03% eye drops proved to be more efficient in increasing tear production and the number of goblet cells than HPRP. However, injectable HPRP proved to be more efficient than TG in decreasing conjunctival inflammatory cells. We concluded that the injectable use of homologous PRP requires an average of 2 to 3 monthly applications, is safe and feasible on an ambulatory care level, more financially viable than tacrolimus, and can be used as a more accessible alternative therapy or suggested as an adjuvant to conventional treatment with topical immunosuppressants.

INDEX TERMS: Tacrolimus 0.03%, homologous platelet-rich plasma, keratoconjunctivitis sicca, dogs.

¹ Received on

Accepted for publication on.....

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil.

³ Programa de aprimoramento profissional de clínica médica de pequenos animais, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil.

⁵ Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária, bloco D, Presidente Prudente - SP, 19050-920, Brazil.

⁶ Departamento de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil.

⁷ Departamento de Oftalmologia do Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposos Tavares, Km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil. *Corresponding author: silviafranco@unoeste.br

RESUMO

[Comparação do tacrolimus 0.03% tópico e plasma rico em plaquetas homólogo injetável no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães]. O objetivo do estudo foi comparar o uso convencional do imunossupressor tópico tacrolimus 0.03% colírio com o plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) injetável, em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS). Foram avaliados 66 olhos, 22 olhos do grupo controle negativo (GCN) provenientes do canil da Unoeste, 22 olhos do grupo tacrolimus (GT) e 22 olhos do grupo plasma rico em plaqueta homólogo (GPRPH), sem predileção racial, etária ou sexual, atendidos pelo setor de oftalmologia do Hospital Veterinário da Unoeste e diagnosticados com CCS. O GT recebeu colírio tacrolimus 0.03%, 1 gota em ambos os olhos, 2x/dia, e o GPRPH aplicação injetável de 0.3 ml de PRPH, 0.1 ml na conjuntiva palpebral inferior, 0.1 ml na superior e 0.1 ml na glândula da terceira pálpebra, 1 vez a cada 30 dias, conforme melhora dos sinais de CCS, totalizando, no máximo, três aplicações. Os animais foram avaliados mensalmente por 6 meses pelos sinais clínicos e testes oftálmicos específicos: Teste Lacrimal de Shirmer-1 (TLS-1), Teste de Osmolaridade (TOL), Teste de Meniscometria de Tira (TMT), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), Teste de Fluoresceína (TF) e Teste de Lissamina Verde (TLV). O GPRPH, dos 11 cães (n=22 olhos) tratados, o número necessário de aplicações que melhoraram os sinais oculares iniciais foram: 36% (4 cães) receberam 3 aplicações, 55% (6 cães) receberam 2 aplicações, e 9% (1 cão) recebeu 1 aplicação. Os sinais oculares de pigmentação, úlcera e neovascularização de córnea, secreção ocular e hiperemia conjuntiva, apresentaram melhora, em ambos os grupos, até o final do estudo. No GT, ao final do estudo, foi observado um aumento significativo ($p<0.05$) maior do que GT nos valores de TLS-1, TMT e contagem das células calciformes da conjuntiva palpebral. No GPRPH houve uma diminuição significativa ($p<0.05$) maior do que o GT na contagem de linfócitos e neutrófilos da conjuntiva palpebral. No TRFL e TOL houve aumento significativo ($p<0.05$) dos valores até o final, com desempenho igual do GT e GPRPH. No TF e TLV, ao final do estudo todos foram negativos, com negativação mais precoce do GT no TF, e desempenho igual do TLV em ambos os grupos. De uma maneira geral, ambos os grupos foram equivalentes na melhora dos parâmetros TRFL, TOL e TLV. O tacrolimus 0.03% colírio se mostrou mais eficiente no aumento da produção lacrimal e no número de células calciformes do que o PRPH. Entretanto, o PRPH injetável demonstrou ser mais eficiente do que o GT, na diminuição das células inflamatórias conjuntivais. Concluímos que o uso injetável do PRP homólogo, necessita em média de 2 a 3 aplicações mensais, é seguro e exequível a nível ambulatorial, financeiramente mais viável do que o tacrolimus, e pode ser utilizado como uma terapia alternativa mais acessível ou sugerida como adjuvante ao tratamento convencional com imunossupressores tópicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Tacrolimus 0.03%, plasma rico em plaquetas homólogo, ceratoconjuntivite seca, cães.

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), também conhecida como doença do olho seco, é uma síndrome encontrada principalmente em cães e humanos, caracterizada por uma inflamação crônica das glândulas lacrimais, causando uma diminuição da produção de lágrima (CCS quantitativa) e/ou deficiência na qualidade da lágrima (CCS qualitativa) (Ribeiro et al. 2008, Haeussler & Korb 2019). As principais alterações em olhos com ceratoconjuntivite seca são a perda do brilho e transparência da córnea, hiperemia conjuntival, vascularizações, e presença de secreções mucosas ou mucopurulentas. Em casos mais severos, a doença pode causar perda da visão por perda da transparência da córnea e/ou perfurações corneanas (Vatnikov et al. 2020). Etiologicamente, a origem imunomediada é a mais comum de CCS em cães (Dees & Kent 2020).

Os testes para diagnóstico da CCS são: teste lacrimal de Schirmer (TLS), teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), teste de lissamina verde (TLV), teste de rosa bengala (TRB), teste do fenol vermelho (TFV), avaliação das glândulas de meibômio e do filme lacrimal, citologia e histopatologia da conjuntiva (Maggs 2008). Quantitativamente, o teste de meniscometria de tira (TMT), avalia a quantidade de lágrima presente no menisco lacrimal (Rajaei et al. 2018, Nascimento et al. 2019). Porém o TLS-1 é o principal teste diagnóstico da CCS, sendo utilizado de forma rotineira. Valores de 14 a 11mm/min classifica a CCS como discreta, moderada de 10 a 6mm/min e CCS grave de 5 a 0mm/min (Gelatt 2005). Qualitativamente, o teste de osmolaridade da lágrima (TOL) é empregado como marcador de gravidade da doença, sendo mais sensível e específico do que o TRFL (Versura et al. 2010, Lemp et al. 2011). A CCS provoca instabilidade do filme lacrimal, acarretando em hiperosmolaridade lacrimal (Cherry et al. 2017).

O tratamento convencional é baseado na combinação de fármacos de uso tópico, sendo utilizados lágrimas artificiais ou lubrificantes oculares, e inibidores da calcineurina que possuem efeitos lacrimoestimulatório e imunossupressores, como o tacrolimus e a ciclosporina A (Izci et al. 2015, Radziejewski & Balicki 2016). Essas drogas atuam suprimindo a produção de interleucinas-2, prevenindo a formação da cascata inflamatória e o recrutamento de eosinófilos, reduzindo a inflamação por inibição da liberação de histamina e da produção de prostaglandinas (Radziejewski & Balicki 2016, Zhao et al. 2020).

O tacrolimus é um antibiótico macrolídeo isolado do *Streptomyces tsukubaensis* spp, lipofílico, com objetivo de proliferação de células calciformes (Nebbio et al. 2017). A inibição da resposta imune por essa molécula, se dá pela ligação à proteína FKBP, inibindo a fase inicial da ativação de linfócitos tipo T (Whitley & Day 2011). O nível de ação intraocular do tacrolimus pode ser variável e potencializado de acordo com a concentração e veículo de transporte que é utilizado (Molokhia et al. 2013, Zulim et al. 2018).

O plasma rico em plaquetas (PRP), um subproduto derivado do plasma sanguíneo, possui propriedades de reconstituição e reparação tecidual, devido aos fatores de crescimento, citocinas, integrinas e vitamina A que as plaquetas possuem. O PRP é rico em proteínas bioativas que são sintetizadas no sangue, principalmente em atividade dos alfa-grânulos de plaquetas. Possui ação imunomoduladora, simples processo de obtenção, baixo custo e fácil utilização (Alio et al. 2012, Farghali et al. 2021). Em pacientes humanos acometidos com doença do olho seco, o tratamento com PRP injetável é uma terapia eficaz que promove aumento da produção de lágrima, aumento no TRFL, melhora na acuidade visual e diminuição dos sinais oriundos de olho seco (Alio et al. 2017, Avila et al. 2018).

O PRP pode ser de origem autóloga (extraído do próprio indivíduo), homóloga (extraído da mesma espécie) ou heteróloga (extraído de outra espécie), sendo os dois últimos recursos necessários quando não há possibilidade do uso do PRP autólogo (Ferracioli et al. 2018). Sua obtenção se consiste em processo de centrifugação do sangue total coletado do indivíduo doador, com adição de anticoagulantes como trombina ou citrato de sódio. Nesse processo ocorre a sedimentação, deixando as plaquetas suspensas no plasma, e estando concentradas, ocorre a liberação dos fatores de crescimento. O processo de obtenção do PRP leva em média 1 hora (Dusse et al. 2008, Ehrenfest et al. 2009, Sant`anna 2018). A concentração de plaquetas do PRP deve ser de 4 a 7 vezes maior do que a concentração das mesmas no sangue total (Marx 2001).

O presente estudo teve por objetivo avaliar e comparar o tratamento da CCS utilizando um novo tratamento, PRPH injetável na glândula da terceira pálpebra e conjuntivas palpebrais inferior e superior, com o tratamento convencional com o uso de imunossupressor tópico, tacrolimus 0.03% colírio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os cães diagnosticados com CCS foram provenientes da rotina de atendimento do serviço de oftalmologia da clínica médica de pequenos animais, do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) –

Presidente Prudente/SP e os cães do grupo controle negativo foram provenientes do canil da Unoeste. O estudo foi conduzido conforme as normas de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – n. 5726) da UNOESTE e da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology – Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research).

Foram utilizados 33 cães (66 olhos), de ambos os sexos e variadas raças, com idade 7.5 ± 3.6 (1.0 – 15.0 anos), e peso 11.7 ± 10.5 (3.6 - 43 kg). Os animais foram incluídos no experimento em 3 grupos (um grupo controle negativo e dois grupos de tratamento da CCS). Os animais positivos para CCS foram examinados com lâmpada de fenda (Kowa SL-15, Japão), e diagnosticados pelos seguintes parâmetros: sinais clínicos oftálmicos compatíveis (secreção ocular, hiperemia conjuntival, opacidade, neovascularização de córnea e pigmentação de córnea), e pelos testes oculares: Teste Lacrimal de Schirmer-1 sem anestésico (TLS-1) (TLS-1 < 15 mm/min) e/ou Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) (TRFL < 20 segundos), e cadastrados sob um termo de autorização (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE), assinado e consentido pelo tutor do animal e responsáveis pelo projeto.

Grupos

Foram utilizados no presente estudo 3 grupos de cães com 11 animais (22 olhos) em cada grupo. Grupo controle negativo (GCN), e dois grupos de tratamento com cães atendidos no HV positivos para CCS e distribuídos aleatoriamente no Grupo Tacrolimus (GT) e Grupo Plasma Rico em Plaquetas Homólogo (GPRPH). As características do grupo GCN, e forma de tratamento do GT e GPRPH, são descritas a seguir:

- Grupo Controle Negativo (GCN) (n=22 olhos normais): 11 cães saudáveis provenientes do canil da Universidade, idade 4.3 ± 1.9 (1.0 – 7.0) anos, peso 20.4 ± 14.9 (5.0 – 43.0) kg, 9 sem raça definida (SRD), 1 Boxer e 1 Labrador, 6 machos e 5 fêmeas, utilizados para fornecer os valores oculares de normalidade da região do estudo e servir de comparação com os grupos positivos para CCS e tratados.

- GT (n=22 olhos positivos para CCS): 11 cães atendidos no setor de oftalmologia, idade 8.5 ± 2.1 (5.0-11.0) anos, peso 7.5 ± 1.4 (5.2-9.8) kg, 7 Lhasa Apso, 1 Shi Tzu, 1 Yorkshire Terrier e 1 SRD, 5 machos e 6 fêmeas. Após o diagnóstico bilateral de CCS, foi instituído o protocolo: tratamento tópico com colírio de tacrolimus 0.03% (Laboratório Centro Paulista, São Paulo - SP), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos, e lubrificante ocular (Tears® - LABYES), 1 gota 2x/dia, em ambos os olhos, durante 6 meses.

- GPRPH (n=22 olhos positivos para CCS): 11 cães atendidos no setor de oftalmologia, idade 9.7 ± 4.0 (5.0-15.0) anos, peso 7.1 ± 2.4 (3.6-12.1) kg, 6 Lhasa Apso, 2 Shi Tzu, 2 Yorkshire Terrier, 1 Cocker Spaniel e 1 SRD, 4 machos e 7 fêmeas. Após o diagnóstico bilateral de CCS, foi instituído o protocolo: no ambulatório, previamente foi administrado topicamente 1 gota de colírio anestésico (Colírio Anestésico®-Allergan), 3x com intervalo de 5 minutos, em seguida foi administrado, com seringa e agulha de insulina, 0.3 ml de PRPH, sendo: 0.1 ml na glândula da terceira pálpebra, 0.1 ml na conjuntiva palpebral inferior e 0.1 ml na conjuntiva palpebral superior de ambos os olhos (fig. 1). Além disso, foi associado o uso tópico de lubrificante ocular (Tears® - LABYES), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos, durante 6 meses. A frequência da necessidade da administração do PRPH injetável foi baseada na melhora inicial dos sinais clínicos e nos exames oftálmicos TLS-1 e TRFL, utilizando no máximo, até três aplicações. Animais que não apresentaram melhora após a terceira aplicação foram encaminhados para o tratamento convencional com imunossupressor tópico e acompanhados pelo serviço de oftalmologia do HV da UNOESTE.

Quando diagnosticado no momento inicial, infecção bacteriana secundária e inflamação ocular (conjuntivite e/ou ceratite), nos grupos de tratamento GT e GPRPH, foi utilizado colírio antibiótico a base de ciprofloxacina (Ciprovect®-LABYES) (1 gota 3 a 4x/dia), e colírio anti-inflamatório a base de diclofenaco de sódio (Still colírio®-Allergan) (1 gota 3x/dia), durante os 15 primeiros dias.

Processamento do Plasma Rico em Plaquetas Homólogo (PRPH)

A preparação do PRPH foi realizada pelo laboratório de patologia clínica do hospital veterinário da UNOESTE. A obtenção do plasma rico em plaquetas foi fundamentada na técnica descrita por Merlini et al. (2014), e modificada. Foi utilizado apenas um cão doador, hígido (avaliação clínica e exames laboratoriais), sem raça definida, 5 anos, pesando 35 kg, e coletado 20 ml de sangue total pelo sistema a vácuo para cada animal que recebeu a terapia, de maneira estéril, através da punção da veia jugular em tubos estéreis contendo citrato de sódio 3.2%. Na primeira etapa, o sangue foi centrifugado a 200 gravidades (g), graduada em 1.100 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, em uma centrífuga laboratorial (Excelsa®/FANEM). A seguir, foram descartados cerca de 30% do plasma superficial, e o conteúdo remanescente foi transferido para um tubo de Falcon seco e também estéril. Na segunda etapa, a parte remanescente foi centrifugada a 400 g na rotação de 1.900 rpm, por 10 minutos. Nessa etapa, o plasma foi dividido em duas porções, sendo uma delas a porção classificada como plasma rico em plaquetas e a outra porção plasma pobre em plaqueta. Com dois terços do

material sobrenadante descartados (plasma pobre em plaquetas), o terço restante é classificado como plasma rico em plaqueta. Desse material foi obtido um volume total de 0.6 mililitros (ml), e foi aplicado 0.1 ml instantaneamente na glândula da terceira pálpebra e conjuntivas palpebrais inferior e superior de cada olho, totalizando 0.3 ml.

Avaliação dos sinais clínicos

A avaliação dos sinais oftálmicos foi realizada mensalmente, durante 6 meses de tratamento, desde o M0 (momento de diagnóstico da CCS) até o M6 (momento final do tratamento e avaliação da CCS). Os sinais oftálmicos de cada animal, foram avaliados com auxílio da lâmpada de fenda portátil (SL-15, Kowa, Japão) e preenchida uma ficha específica, avaliando a opacidade, pigmentação e neovascularização da córnea, presença de secreção ocular e hiperemia conjuntival. Os escores adotados para a avaliação foram: (0) sem alteração; (1) leve; (2) moderado e (3) severo.

Testes oftálmicos

Os testes específicos foram realizados em todos os momentos de acompanhamento do estudo. Dessa forma, foi adotada a seguinte sequência de realização dos testes oftálmicos: teste de osmolaridade da lágrima (TOL), teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1), teste de meniscometria de tira (TMT), teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), teste de fluoresceína (TF), e teste de lissamina verde (TLV).

Teste de osmolaridade da lágrima (TOL): A osmolaridade lacrimal foi aferida através do osmômetro I-PEN® VET (I-Med pharma^{INC}, USA), após o contato da lágrima com seu chip descartável, no ângulo de 45° graus. Nesse teste é aferida a precisão numérica da concentração de solutos lacrimal, indicando se há instabilidade do filme lacrimal e auxiliando o diagnóstico qualitativo da CCS. Os valores de osmolaridade em olhos normais é 296 a 339 mOsmol/L. (Lamkin et al. 2020).

Teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1): Sem anestésico local, teste quantitativo da lágrima, previamente foi realizada uma limpeza ocular com algodão seco para retirada de sujidades locais e depois introduzindo no saco conjuntival medial 0.5 cm da ponta do papel filtro (Teste de Schirmer®, Ophthalmos, SP), permanecendo por um tempo de 1 minuto e assim que retirado a leitura foi feita imediatamente de acordo com a quantidade umedecida do papel filtro. Foram considerados olhos positivos para CCS aqueles que apresentaram valores de TLS-1 < 15 mm/min (Featherstone & Heinrich 2013).

Teste de meniscometria de tira (TMT): O TMT (I-Tear®, I-MED, Canadá) teste quantitativo da lágrima, semelhante ao TLS. No TMT, a tira descartável de papel é encostada suavemente no menisco lacrimal de cada olho, especificamente, analisando a quantidade de lágrima que percorre a tira, corando-a de azul, por um período de 5 segundos. Os valores para olhos normais de cães estão compreendidos acima de 9 mm/5seg (Rajaei et al. 2018, Nascimento et al. 2019). Os valores de 0 a 7 mm/5seg foram classificados como CCS (Nascimento et al. 2019).

Teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL): Teste qualitativo da lágrima, foi instilada 1 gota de fluoresceína 1% colírio (Fluoresceína Sódica®, Ophthalmos, SP) sobre a córnea, após duas piscadas manuais, as pálpebras foram seguradas, e com auxílio de um cronômetro foi avaliado o tempo de ruptura do filme lacrimal, através da luz de cobalto da lâmpada de fenda portátil. Foram efetuadas duas repetições e a média calculada através desses resultados. Valores de TRFL ≤ 20 segundos foram considerados positivos para CCS (Saito & Kotani 2001).

Teste de fluoresceína (TF): Corante vital que cora o estroma da córnea (Featherstone & Heinrich 2013). Foi instilado 1 gota do colírio de fluoresceína 1% (Fluoresceína Sódica®, Ophthalmos, SP), sobre a córnea e em seguida, o olho foi lavado com solução fisiológica e examinado através da lâmpada de fenda portátil para verificar se houve ou não a presença de úlcera de córnea, utilizando os escores 0 (negativo) e 1(positivo) para classificação.

Teste de lissamina verde (TLV): Corante vital que cora as células desvitalizadas da córnea e conjuntiva ocular, decorrente da ineficiência da proteção lacrimal causada pela CCS (Featherstone & Heinrich 2013). Foi realizado com tiras estéreis contendo a Lissamina (Lissamina Verde®, Ophthalmos, SP) embebidas por 1 gota de solução fisiológica e encostada no saco conjuntival e examinado com lâmpada de fenda portátil se houve ou não a presença da marcação pelo corante, adotando os escores 0 (negativo) e 1 (positivo) para classificação.

Análises citológica e histopatológica

Para análise das células da glândula da terceira pálpebra, realizados no M0, M3 e M6, foram colhidas amostras através da técnica de aspiração por agulha fina. Para a coleta, foi instilado 1 gota de colírio Anestésico® (cloridrato de tetracaína a 1% + cloridrato de fenilefrina a 0.1%, Allergan) para a dessensibilização da glândula do olho coletado. Com a exposição da glândula da terceira pálpebra por auxílio de uma pinça, foram coletadas as

amostras destas glândulas e instiladas 1 gota de adrenalina e 1 gota de Still® colírio (diclofenaco sódico, Allergan). Para a fixação das amostras foi utilizado metanol e a coloração pela técnica de MGG (May-Grunwald-Giemsa). Foram avaliados a quantidade de neutrófilos, linfócitos e escamosa no epitélio. A contagem das células, em cada lâmina, foi feita em 10 campos de grande aumento utilizando a objetiva de 400x, através do microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão).

Para a análise histopatológica da conjuntiva, realizada no M0 e M6 do estudo, foi instilado 1 gota de colírio Anestésico® (cloridrato de tetracaína a 1% + cloridrato de fenilefrina a 0.1%, Allergan) em cada olho e feitos cortes, com auxílio de uma tesoura de conjuntiva (HR, São Paulo, Brasil) de 1,0 milímetro, aproximadamente, da conjuntiva bulbar inferior e colocado sobre fragmento de papel (1x1 cm). Em seguida, foi depositada 1 gota de adrenalina e instilada 1 gota do colírio Still® (diclofenaco sódico, Allergan) na conjuntiva. Os fragmentos coletados foram fixados em formalina e corados pelas técnicas de hematoxilina eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil) e ácido periódico de Schiff (PAS) (Merck, EUA). Na técnica de coloração com HE, foram avaliadas quantidades de neutrófilos, linfócitos, e presença de metaplasia; a técnica de PAS, utilizada para contagem das células calciformes. A contagem das células, em cada lâmina, foi feita em quatro campos distintos utilizando a objetiva de 400x (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão) e para registro de imagens, foi utilizado Leica ICC50HD (Wetzlar, Alemanha).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância bidirecional (ANOVA) para pares de amostras com teste post-hoc de Tukey foram usadas para analisar as variáveis TLS-1, TMT, TRFL, TOL, incluindo a contagem de células calciformes, células escamosas, linfócitos e neutrófilos. Com relação às variáveis TF e TLV, o teste não paramétrico de Friedman foi usado para comparar vários pontos no tempo, enquanto o Kruskal-Wallis teste com o teste post-hoc de Dunn foi usado para comparar as variáveis entre grupos. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0.05$. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico R (R Development Core Team 2020).

RESULTADOS

Os parâmetros e testes oftálmicos, citológicos e histopatológicos dos cães saudáveis do grupo controle negativo estão descritos na tabela 1. Após a coleta do sangue para preparo do PRPH a média inicial da contagem de plaquetas foi 193.643 (70.000 - 257.000/mm³) e após o processo de preparação do PRPH, a média final foi de 1.997.143/mm³ (1.040.000 - 4.297.000/mm³) plaquetas.

O número necessário de aplicações que melhoraram os sinais oculares iniciais no grupo PRPH (n=11 cães/n=22 olhos) foram: 4 cães/8 olhos (36% casos) receberam 3 aplicações, 6 cães/12 olhos (55% casos) receberam 2 aplicações, e somente 1 cão/2 olhos (9% casos) recebeu 1 aplicação. Do total dos olhos (n=22 olhos) que receberam aplicação de PRPH, apenas 1 olho (4.5%) tiveram reação alérgica ao hemoderivado, todos no dia da aplicação, de grau leve, que regrediu com o tratamento com colírio anti-inflamatório a base de diclofenaco sódico (Still® colírio, 1 gota 3x/dia, durante 3 dias). Nenhum cão do grupo PRPH precisou sair do estudo. No grupo de cães tratados com tacrolimus 0,03% colírio, 9% (2 olhos) do mesmo animal, apresentou reação adversa à medicação, impossibilitando a instilação diária do mesmo, sendo, portanto, o cão retirado do estudo e substituído por outro portador de CCS. Esse cão foi encaminhado para o serviço de oftalmologia do HV e recomendado o uso de outro imunossupressor, ciclosporina colírio.

Nos resultados das medianas dos escores de avaliação dos sinais oculares (tabela 2), ambos os grupos de tratamento apresentaram melhora dos sinais clínicos, e remissão total dos sinais no M5. Os sinais de opacificação, secreção e hiperemia do GPRPH, regrediram no M5 do estudo. No grupo GT os sinais de secreção e opacificação apresentaram remissão no M3, enquanto pigmentação e conjuntivite regrediram totalmente no M1. Ainda nesse grupo, a neovascularização apresentou remissão no M5 do tratamento.

No TLS-1 (Figura 2A) e no TMT (Figura 2C) houve aumento significativo ($p < 0.05$) nos valores do M0 ao M6, em ambos os grupos, sendo maior esse aumento, ao final (M6) no GT. No TRFL (Figura 2B) e no TOL (Figura 2D) houve também um aumento significativo ($p < 0.05$) nos valores do M0 ao M6, não havendo diferenças significativas ($p > 0.05$) no M6 entre os grupos.

Os resultados observados do TF estão descritos na Figura 3A e do TLV na figura 3B. Houve uma marcação negativa do TF mais precoce no GT, no M5, enquanto no GPRPH somente no M6. No TLV, o desempenho de ambos os grupos foi similar nos momentos finais do estudo (M5 e M6).

Os resultados da citologia da glândula da terceira pálpebra (neutrófilos, linfócitos e células escamosas) estão descritos na Figura 4. Foi verificado diminuição significativa ($p < 0.05$) do número de neutrófilos, linfócitos e células escamosas em ambos os grupos ao final do estudo (M6) e não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre os grupos durante o estudo.

Os resultados do exame histopatológico da conjuntiva estão descritos na Figura 5. Houve uma diminuição da contagem de linfócitos e neutrófilos, no M6, em todos os grupos, sendo mais significativa ($p < 0.05$) a redução no GPRPH em comparação ao GT. Em relação a quantidade de células calciformes, houve aumento significativo ($p < 0.05$) em ambos os grupos, com maior contagem de células e diferença estatística significativa do GT. Ainda no exame histopatológico, houve diminuição da presença de células metaplásicas em ambos os grupos em relação ao M0, sendo mais considerável no GT (45% no M0, 9% no M6) do que no GPRPH (27% no M0, 14% no M6), porém não houve significância estatística na frequência de células metaplásicas em ambos os grupos ($p > 0.05$). A comparação do GCN com evolução clínica dos grupos de tratamento GT e PRPH no momento inicial (M0) e momento final (M6) estão descritos na Figura 6.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que compara o uso do PRPH injetável à nível ambulatorial de cães diagnosticados com CCS, com o tratamento convencional tópico com tacrolimus 0.03% colírio.

O uso ambulatorial do PRPH requer prática e sincronização do tempo entre o preparo e aplicação, uma vez que o hemoderivado deve ser aplicado instantaneamente (Marx 2001). As vias de aplicações adjacentes aos olhos podem causar desconforto local momentâneo ao paciente mesmo utilizando colírio Anestésico®, bem como as técnicas de contenção, sendo assim, foram realizadas aplicações intervaladas a cada 30 dias.

No presente estudo, apenas um olho de um cão apresentou reação de hipersensibilidade local causada pela aplicação de PRP, o qual foi rapidamente tratado e os sinais de hipersensibilidade controlados. Segundo Marx & Garg (2005), o plasma rico em plaquetas de fonte homóloga e heteróloga, pode causar reações adversas devido às diferenças imunogênicas entre o organismo de cada indivíduo. De acordo com Latalski et al. (2019), que relataram reações adversas ao uso do PRP autólogo, efeitos colaterais podem ocorrer devido à substância adicionada a preparação do plasma rico em plaquetas. Um teste de compatibilidade sanguínea não identifica possibilidade de incompatibilidade do receptor para terapia com PRP de fonte homóloga ou heteróloga, pois o teste identifica apenas se há ou não presença de anticorpos no soro do receptor contra as hemácias do doador (Gomes 2008).

Os efeitos adversos relatados por Shoughy (2017), ao uso tópico do tacrolimus incluem irritação ocular, ardor, vermelhidão e sensação de queimação, podendo ser sinais apenas transitórios. O mesmo foi observado em nosso estudo, em que um cão apresentou reação adversa à medicação, o qual foi prontamente tratado e retirado do estudo por ser de uso contínuo, e segundo o tutor, os sinais foram irritação ocular, ardor e coceira imediatamente após o uso do colírio de tacrolimus 0.03%.

A via subconjuntival de aplicação é uma via eficaz e que pode substituir a instilação diária de colírios (Tanidir et al. 2010). A aplicação de PRP autólogo por essa via em cães com CCS moderada também foi estudada por Vatnikov et al. (2020), que utilizaram aplicações semanais, apenas em conjuntiva palpebral inferior. No presente estudo, as vias utilizadas foram, além da glândula da terceira pálpebra, vias subconjuntivais inferior e superior, na tentativa de estimular as glândulas de meibômio e células calciformes, que são responsáveis pela produção de lipídios e mucina da lágrima, respectivamente (Cherry et al. 2017). Além disso, a escolha da aplicação na conjuntiva palpebral superior foi devido a sua proximidade com a glândula periacrimal.

A média de peso dos cães tratados com PRP foi inferior a dez quilos (Tabela 2), e alguns animais com peso inferior a cinco quilos, o que dificultaria o uso do PRP de origem autóloga (Lin et al. 2018). Entretanto, a eficácia do PRP homólogo, de acordo com Ferracioli et al. (2018), é equivalente ao uso do autólogo na capacidade de reparação tecidual. No processo de obtenção do PRPH, a contagem da concentração média de plaquetas obtida no presente estudo foi acima de um milhão de plaquetas, estando de acordo com Marx (2001) e Fadadu et al. (2019), onde afirmam que a contagem de plaquetas deve ser, em média, cinco vezes maior do que a contagem basal de plaquetas no sangue. Isso é necessário para que o plasma rico em plaqueta tenha eficácia.

Em ambos os grupos, houve melhoras nos sinais clínicos observados na superfície ocular, como diminuição da hiperemia e secreção conjuntival, opacidade e pigmentação da córnea. De forma geral, o GT exibiu remissão mais precoce dos sinais comparado ao GPRPH. Alguns dos sinais clínicos no grupo tratado com tacrolimus, apresentaram melhora logo nos momentos iniciais e outros se estabilizaram somente no M5 do tratamento. Radziejewski & Balicki (2016) observaram em seu estudo, que a remissão completa de todos os

sinais clínicos ocorreu após 2 meses de tratamento com tacrolimus. Sinais clínicos de pigmentação e hiperemia foram os primeiros a obterem resultados. O estudo feito por Berdoulay et al. (2005), mencionou a melhoria de neovascularização e opacificação logo após 15 dias do início do tratamento, o que em nosso estudo ocorreu somente após quatro meses de tratamento.

O GT, obteve a produção lacrimal normalizada no TLS-1 (≥ 15 mm/min) após o primeiro mês de tratamento (Radziejewski & Balicki 2016), e se manteve superior ao GPRPH durante todo o estudo desenvolvido. No TMT, apesar do aumento da produção lacrimal, os grupos não atingiram a média da normalidade. Ao final do estudo, os resultados dos grupos GPRPH e GT no TLS-1 e TMT evidenciaram a diferença da produção lacrimal entre os grupos e o GT obteve o TLS-1 próximo ao do GCN. Entretanto, o GPRPH recebeu no máximo, três aplicações de plasma rico em plaqueta, nos primeiros momentos de tratamento, diferente do grupo tratado com tacrolimus 0.03% que recebeu instilação diária do colírio, duas vezes ao dia durante todo o estudo.

O resultado obtido no primeiro mês de tratamento do grupo PRPH coincide com o estudo feito por Avila et al. (2018), observaram que a resposta do PRP injetável em humanos com doença grave do olho seco tem ação após quatro semanas da primeira aplicação. Os testes que avaliam quantitativamente a produção lacrimal, TLS-1 e TMT, apresentaram melhora logo após o início do tratamento.

Os grupos GT e GPRPH, apesar de não apresentaram proximidade ao GCN, ambos os grupos obtiveram resultado positivo no estímulo das glândulas de meibômio à produção de lipídios, contribuindo para melhora na estabilidade do FL (Villatoro et al. 2015) no TRFL. No grupo tratado com PRPH, houve significância nos momentos finais, exibindo aumento de 61% no TRFL ao final do estudo. Esse resultado supera o observado por Avila et al. (2019) que utilizaram PRP em olho seco, obtendo melhora de 45% apesar de também não atingir o parâmetro da normalidade. No GT com significância mais precoce ao GPRPH, o uso do tacrolimus 0.03%, no presente estudo, mostrou resultado inferior comparado aos observados por Silva et al. (2018) e Zulim et al. (2018), porém o uso do imunossupressor nos estudos mencionados, também não se equiparou com o parâmetro da normalidade.

No estudo em cães com olhos sadios, Lamkin et al. (2020) utilizou o osmômetro I-PEN® VET, o mesmo do nosso estudo, e concluiu que a média de normalidade basal é de 318.55 ± 20.82 , contrastando com o resultado do GCN do atual estudo. Com os tratamentos instituídos, foi observado aumento discreto na osmolaridade, estando dentro do parâmetro do GCN. A literatura realça que o lacrimejamento reflexo pode provocar diminuição na mensuração da osmolaridade da lágrima (Sebbag et al. 2017, Lamkin et al. 2020), sendo assim, o TOL foi o primeiro teste a ser realizado no presente estudo. Na oftalmologia médica Nolfi & Caffery (2017) testaram os osmômetros i-Pen® e TearLab®, verificando que há considerável variação entre eles, sendo o i-Pen® mais sensível à manipulação, estando susceptível às variações maiores em seus resultados. Em nosso estudo, os devidos cuidados foram tomados e apenas um avaliador realizou o teste nos devidos momentos.

As lesões ulcerativas foram presentes, em ambos os grupos, nos olhos dos cães no momento do diagnóstico da CCS, e ainda foram presentes até o M4 no GT e M5 no GPRPH. Esse resultado pode ser atribuído ao fato da maioria dos cães tratados, corresponderem às raças de cães braquicefálicos (Lhasa Apso e Shih Tzu), que devido à sua estrutura orbitária e maior proeminência ocular, os olhos ficam mais expostos ao meio e susceptíveis a traumatismos (Bedford & Jones 2001). Acreditamos que o controle dessas lesões ocorreu melhor no GT, devido ao controle mais eficiente da CCS nesse grupo, com base nos testes e avaliações oftálmicas.

As análises das células inflamatórias evidenciaram diminuição considerável do número total, em ambos os grupos, atribuído aos efeitos imunomoduladores dos agentes estudados. Porém, a quantidade de neutrófilos, linfócitos e células escamosas nos grupos de tratamento ao final do estudo, não se equiparam aos mesmos parâmetros do GCN. Isso pode ser justificado pelo caráter crônico e progressivo do processo inflamatório da CCS, em que o objetivo do tratamento é a redução da inflamação e melhora dos sinais clínicos da doença (Radziejewski & Balicki 2016, Nebbioso et al. 2017).

No atual estudo, a presença de neutrófilos foi observada em maior quantidade no momento inicial, quando comparado à quantidade de linfócitos. Isso contrasta com a literatura, onde Stevenson et al. (2012) e Haeussler & Korb (2019) afirmam que a ceratoconjuntivite seca, é caracterizada por infiltrado inflamatório, principalmente linfócitos, sendo os neutrófilos em menor grau. No momento final, a contagem de neutrófilos no exame citológico do GT foi significativamente menor do que o GPRPH. Esse fato poder ser atribuído ao potencial imunossupressor do tacrolimus, que atua na inibição da calcineurina e da ativação de linfócitos T, reduzindo a resposta inflamatória (Radziejewski & Balicki 2016).

No grupo tratado com PRPH, a histopatologia da conjuntiva bulbar inferior, mostrou ação do hemoderivado na redução do processo inflamatório e infeccioso. De acordo com Badade et al. (2016), o plasma concentrado no PRP apresenta duas a quatro vezes maior concentração de leucócitos do que no sangue total, gerando presença de neutrófilos, linfócitos e monócitos, e por meio da liberação de citocinas e células de defesa,

desempenham função bacteriostática, e de defesa contra fungos e outros microrganismos. O potencial bacteriostático do PRP, com ou sem adição de leucócitos na sua preparação, também foi relatado na revisão sistemática feita por D'Asta et al. (2017).

O exame histopatológico demonstrou aumento na quantidade de células caliciformes ao final do estudo, nos grupos GT e GPRPH. No presente estudo, o uso do tacrolimus resultou em maior densidade das células caliciformes comparado ao grupo GPRPH e também ao GCN. A ação do tacrolimus sobre as células produtoras de mucina também foi observada por Zulim et al. (2018) e Berdoulay et al. (2005). Em um estudo feito por Alio et al. (2012), o exame citológico de olhos tratados com PRP mostrou resultados significativos no aumento da densidade de células caliciformes, e apesar de não ter apresentado significância estatística neste estudo, houve aumento do número dessas células no grupo tratado com PRPH.

CONCLUSÃO

O tacrolimus 0.03% colírio se mostrou mais eficiente no aumento da produção lacrimal e no número de células caliciformes do que o PRPH. Entretanto, o PRPH injetável demonstrou ser mais eficiente do que o GT, na diminuição das células inflamatórias conjuntivais. De uma maneira geral, ambos os grupos foram equivalentes na melhora dos parâmetros TRFL, TOL e TLV. Concluímos que o uso injetável do PRP homólogo, necessita em média de 2 a 3 aplicações mensais, é seguro e exequível a nível ambulatorial, financeiramente mais viável do que o tacrolimus, e pode ser utilizado como uma terapia alternativa mais acessível ou sugerida como adjuvante ao tratamento convencional com imunossuppressores tópicos.

Agradecimentos – Ao o apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Código de Financiamento 001.

Fundos – Os autores agradecem aos laboratórios Labyes e Centro Paulista pelo fornecimento dos colírios utilizados neste estudo.

Conflitos de interesse – Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Alio J.L., Montiel F. A. & Rodriguez A.E. 2012. The role of “eye platelet rich plasma” (E-Prp) for wound healing in ophthalmology. *Current pharmaceutical biotechnology.* 13(7):1257-1265. <<https://doi.org/10.2174/138920112800624355>> <PMid:21740369>
- Alio J.L., Rodriguez A.E., Ferreira-Oliveira R., Wróbel-Dudzińska D. & Abdelghany A.A. 2017. Treatment of dry eye disease with autologous platelet-rich plasma: a prospective, interventional, non-randomized study. *Ophthalmology and Therapy.* 6(2):285-293. < <https://doi.org/10.1007/s40123-017-0100-z>>
- Avila M.Y., Iguá A.M. & Mora A.M. 2018. Randomised, prospective clinical trial of platelet-rich plasma injection in the management of severe dry eye. *British Journal of Ophthalmology.* 103:648-653. <<https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312072>> <PMid:29970389>
- Badade P.S., Mahale S.A., Panjwani A.A., Vaidya P.D. & Warang A.D. 2016. Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin. *Indian Journal of Dental Research.* 27(3):300-304. Disponível em: <<https://www.ijdr.in/text.asp?2016/27/3/300/186231>>
- Bedford P. & Jones G. 2001. *Abnormal appearance in: Small animal ophthalmology: a problem oriented approach.* 3ªed. Saunders, Filadélfia.
- Berdoulay A., English R. & Nadelstein, B. 2005. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology.* 8:225-232. <<https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00390.x>> <PMid:16008701>
- Cherry R.L., Smith J.D. & Ben-Shlomo G. 2017. Canine oral mucosa evaluation as a potential autograft tissue for the treatment of unresponsive keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology.* 21(1):48-51. <<https://doi.org/10.1111/vop.12477>> <PMid: 28470741>

- D'Asta F., Webber M., Bishop J., Halstead F., Moiemmen N., Lord J. & Harrison P. 2017. The Contribution of Leucocytes to the Antimicrobial Activity of Platelet Rich Plasma Preparations: a systematic review, *Platelets*. 29(1):9-20. <<https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1317731>>
- Dees D.D. & Kent M.S. 2020. Efficacy of adjunctive therapy using Vizoovet in improving clinical signs of keratoconjunctivitis sicca in dogs: A pilot study. *Veterinary Ophthalmology*. United States of America. 23:632-639. <<https://doi.org/10.1111/vop.12763>>
- Dodi L.P. 2015. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. *Department of Veterinary Medicine Sciences*. 30(6):341- 347. <<https://doi.org/10.2147/VMRR.S66705>> <PMid:30101119>
- Dusse L.M.S., Macedo A.P., Batschauer A. & Carvalho M.G. 2008. Platelet – Rich Plasma and its application in Dentistry. 40(3):193-197. < <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p313>>
- Ehrenfest D.M.D., Rasmusson L. & Albrektsson T. 2009. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to Leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) *Trends Biotechnology*. 27:158-167. <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>> <PMid:19187989>
- Fadadu P.P., Mazzola A.J., Hunter C.W. & Davis T.T. 2019. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 44:652-659. <<https://doi.org/10.1136/rapm-2018-100356>> <PMid:30992411>
- Farghali H.A., Abdelkader N.A., AbuBakr H.O., Ramadan E.S., Khattab M.S., Salem N.Y. & Emam I.A. 2021. Corneal ulcer in dogs and cats: novel clinical application of regenerative therapy using subconjunctival injection of autologous platelet-rich plasma. *Frontiers Veterinary Science*. 8:641265. <<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.641265>>
- Featherstone H.J. & Heinrich C.L. 2013. Ophthalmic examination and diagnostics - part 1: the eye examination and diagnostic procedures, p.533-613 In: Gelatt K.N. (Ed). *Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Ferracioli E., Laposy C. B.; Nogueira M.R.; Júnior L.A.J., Filho J.C.C., Moreira V., Marques M.E., Nai G. & Ozaki G. 2018. Avaliação das fibras colágenas de feridas dérmicas de coelhos tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 70(4):1179-1186. <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9528>>
- Gellat K.N. 2005. *Veterinary Ophthalmology*. 3th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Pensilvânia. 594p.
- Gomes S.G.R. 2008. Hemocomponentes e principais aplicações na terapia intensiva veterinária, p.91-207 In: Santos M.M. & Fragata F.S. *Emergência e terapia intensiva veterinária em pequenos animais*. 1ª edição. Roca, São Paulo, cap. 16.
- Haeussler D. & Korb C. 2019. Dry eye (keratoconjunctivitis sicca). ACVO Public. <https://www.acvo.org/common-conditions-1/2018/2/2/dry-eye-keratoconjunctivitis-sicca>.
- Izci C., Celik İ., Alkan F., Erol M. & Sur E. 2015. Clinical and light microscopic studies of the conjunctival tissues of dogs with bilateral keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. *The Biological Stain Commission Biotechnic & Histochemistry*. Early online 1-8. <<https://doi.org/10.3109/10520295.2014.930177>>
- Kaswan R.L., Martin C.L. & Chapman W.L. 1984. Keratoconjunctivitis sicca: Histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28 canine cases. *American Journal of Veterinary Research*. 45:112-118. <PMid: 6703444>
- Lamkin I.D., Zimmerman K.L., Smith F.K.M. & Martins B.C. 2020. Osmolarity of basal and reflex tears of normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*. 00:1-7. <<https://doi.org/10.1111/vop.12798>>
- Latalski M., Walczyk A., Fatyga M., Rutz E., Szponder T., Bielecki T. & Danielewicz A. 2019. Allergic reaction to platelet-rich plasma (PRP). *Medicine*. 98(10):e14702. <<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014702>> <PMid: 30855461>
- Lemp M.A., Bron A.J., Baudouin C., Castillo J.M.B.D., Geffen D., Tauber J., Foulks G.N., Pepose J.S. & Sullivan B.D. 2011. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *American Journal of Ophthalmology*. 151(5):792-798. <<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2010.10.032>> <PMid:21310379>

- Lin H.S., Lin S.L. & Chang F.G. 2018. Effects of autologous serum eye drops for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. 44(3):111-117. <<https://doi.org/10.1142/S1682648518500051>>
- Maggs D.J. 2008. Basic diagnostic techniques. In Maggs D.J., Miller P.E. & Ofri, R. *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. 4 ed. Saunders, Missouri, 81-106p.
- Marx R.E. 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is prp and what is not prp? *Implant Dentistry*. 10(4):225-228. <<https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002>> <PMid:11813662>
- Marx R.E. & Garg A.K. 2005. Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. *British Dental Journal*. 199(12):799.
- Merlini N.B., Fonzar J.F., Perches C.S., Sereno M.G., Souza V.L., Estanislau C.A., Rodas N.R., Ranzani J.J.T., Maia L., Padovani C.R. & Brandão C.V.S. 2014. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(6):1742-1750. <<https://doi.org/10.1590/1678-6906>>
- Molokhia S.A., Thomas S.C., Garff K.J., Mandell K.J. & Wirostko B.M. 2013. Anterior eye segment drug delivery systems: current treatments and future challenges. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 29(2):92-105. <<https://doi.org/10.1089/jop.2012.0241>> <PMid:23485091>
- Nascimento F.F., Passareli J.V.G.C., Zulim L.F.C., Estanho G.J.G., Villa M.C. & Andrade S.F. 2019. Teste de meniscometria de tira em cães com olhos normais e com ceratoconjuntivite seca. 42^o Simpósio internacional Moacyr Álvaro (SIMASP) São Paulo, SP. (Resumo)
- Nebbioso M., Regno P.D., Gharbiya M., Sacchetti M., Plateroti R. & Lambiase A. 2017. Analysis of the pathogenic factors and management of dry eye in ocular surface disorders. 18(8):1764. <<https://doi.org/10.3390/ijms18081764>> <PMid:28805710>
- Nolfi J. & Caffery B. 2017. Randomized comparison of in vivo performance of two point-of-care tear film osmometers. *Clinical Ophthalmology*. 11:945-950.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2020. R Software: A Language and Environment for Statistical Computing Vienna. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>
- Radziejewski K. & Balicki I. 2016. Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Veterinaria Hungarica*. 64(3):313-329. <<https://doi.org/10.1556/004.2016.030>> <PMid:27653428>
- Rajaei S.M., Mood M.A., Asadi F., Rajabian M.R. & Aghajanpour L. 2018. Strip meniscometry in dogs, cats, and rabbits. *Veterinary Ophthalmology*. 21(2):210-213. <<https://doi.org/10.1111/vop.12486>> <PMid:28653355>
- Ribeiro A.P., Brito F.L.C., Martins B.C., Mamede F. & Laus J.L. 2008. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. *Ciência Rural*. 38(2):568-575. <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000200048>>
- Saito A. & Kotani T. 2001. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. 1:7-11. <<https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2001.00124.x>> <PMid:11397313>
- Sant'anna R.C.A. 2018. Fibrina rica em plaquetas e leucócitos versus plasma rico em plaquetas: propriedades e aplicação clínica. *Revista Naval de Odontologia*. 45(1):64-70.
- Sebbag L., Park S.A., Kass P.H., Maggs D.J., Attar M. & Murphy C.J. 2017. Assessment of tear film osmolarity using the TearLab™ osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology*. 20(4):357-364. <<https://doi.org/10.1111/vop.12436>>
- Shoughy S.S. 2017. Topical tacrolimus in anterior segment inflammatory disorders. *Eye and Vision*. 4(7). <<https://doi.org/10.1186/s40662-017-0072-z>> <PMid:28286787>
- Silva D.A., Nai G.A., Giuffrida R., Sgrignoli M.R., Santos D.R., Donadão I.V., Nascimento F.F., Dinallo H.R. & Andrade S.F. 2018. Oral omega 3 in different proportions of EPA, DHA, and antioxidants as adjuvant in treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. 81(5):421-8. <<http://dx.doi.org/10.5935/0004-2749.20180081>>
- Slatter D. 2005. *Fundamentos da oftalmologia veterinária*. 3 ed. Roca, São Paulo, 671p.
- Stevenson W., Chauhan S.K. & Dana R. 2012. Dry eye disease: an immunemediated ocular surface disorder. *Archives of Ophthalmology*. 130(1):90-100.

- Tanidir S.T., Yuksel N., Altintas O., Yildiz D.K., Sener E. & Caglar Y. 2010. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *cornea*, 29(6):664–669. <<https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181c29633>> <PMid:20458234>
- Vatnikov Y.A., Erin I.S., Suleimanov S.M., Kulikov E.V., Seleznev S.B., Lutsay V.I., Popova I.A., Strizhakov A.A. & Vilkovsky I.F. 2020. Effect of Autologous Plasma Treatment on the Cornea Regeneration with Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs. *Journal of Animal Health and Production*. 8(1):1-7. <<http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2020/8.1.1.7>>
- Versura P., Nanni P., Bavelloni A., Blalock W.L., Piazzzi M., Roda A. & Campos E.C. 2010. Tear proteomics in evaporative dry eye disease. *Eye*. 24:1396-1402. <<https://doi.org/10.1038/eye.2010.7>> <PMid:20150925>
- Villatoro A.J., Fernández V., Claros S., Rico-Llanos G.A., Becerra J. & Andrades J.A. 2015. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *BioMed Research International*. 2015:1-10. <<https://doi.org/10.1155/2015/527926>> <PMid:25802852>
- Whitley N.T. & Day M.J. 2011. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *Journal of Small Animal Practice*. 52:70-85. <<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01024.x>> <PMid:21265846>
- Zhao M., He F. & Yang Y. 2020. Therapeutic efficacy of tacrolimus in vernal keratoconjunctivitis: a meta-analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Hospital Pharmacy*. 0:1–5. <<https://dx.doi.org/10.1136/ejhpharm-2020-002447>>
- Zulim, L.F.C., Nai G.A., Giuffrida R., Pereira C.S.G., Benguella H., Cruz A.G., Foglia B.T.D., Batista A.S. & Andrade S.F. 2018. Comparison of the efficacy of 0.03% tacrolimus eye drops diluted in olive oil and linseed oil for the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 81(4):293-301. <<https://doi.org/10.5935/0004-2749.20180059>>

Tabela 1. Parâmetros do grupo controle negativo (GCN) (n=22 olhos sadios; n=11 cães saudáveis). Média e desvio padrão (mínimo e máximo) dos parâmetros: teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1), teste de meniscometria de tira (TMT), teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) e teste de osmolaridade de lágrima (TOL). Média e desvio padrão da citologia da glândula da terceira pálpebra e histopatologia conjuntival bulbar inferior.

Testes Oftálmicos	Média e desvio padrão	Mínimo e máximo
TLS (mm/min)	22,3±2,9	(18 - 27)
TMT (mm/5seg)	10,4±3,3	(8 - 18)
TRFL (segundos)	26,8±4,9	(20 - 37)
TOL (mOsmol/L)	299,2±13,9	(288 - 311)
Células	Citologia glândula da terceira pálpebra (Média e desvio padrão)	Histopatologia conjuntiva bulbar inferior (Média e desvio padrão)
Neutrófilos	0 ± 0	02.6 ± 04.4
Linfócitos	0.1 ± 0.4	26.7 ± 24.2
Células caliciformes	N.A*	28.3 ± 16.0
Células escamosas	0.1 ± 0.3	N.A*

* N.A: não avaliado.

Tabela 2. Mediana do escores de avaliação dos sinais oculares dos grupos de tratamento GPRPH e GT nos momentos inicial (M0), e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).

		M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Pigmentação de córnea	GPRPH	1	1	0	0	0	0	0
	GT	1	1	0	0	0	0	0
Neovascularização de córnea	GPRPH	1	1	1	1	1	0	0
	GT	1	1	1	1	1	0	0
Secreção	GPRPH	3	1	1	1	1	0	0
	GT	3	1	1	0	0	0	0
Opacificação de córnea	GPRPH	1	1	1	1	1	0	0
	GT	1	1	1	0	0	0	0
Hiperemia conjuntival	GPRPH	2	1	0	0	1	0	0
	GT	2	1	0	0	0	0	0

Escores de avaliação para pigmentação de córnea, neovascularização de córnea, secreção, opacificação de córnea e hiperemia conjuntival: (0) sem alteração, (1) leve, (2) moderado e (3) severo.

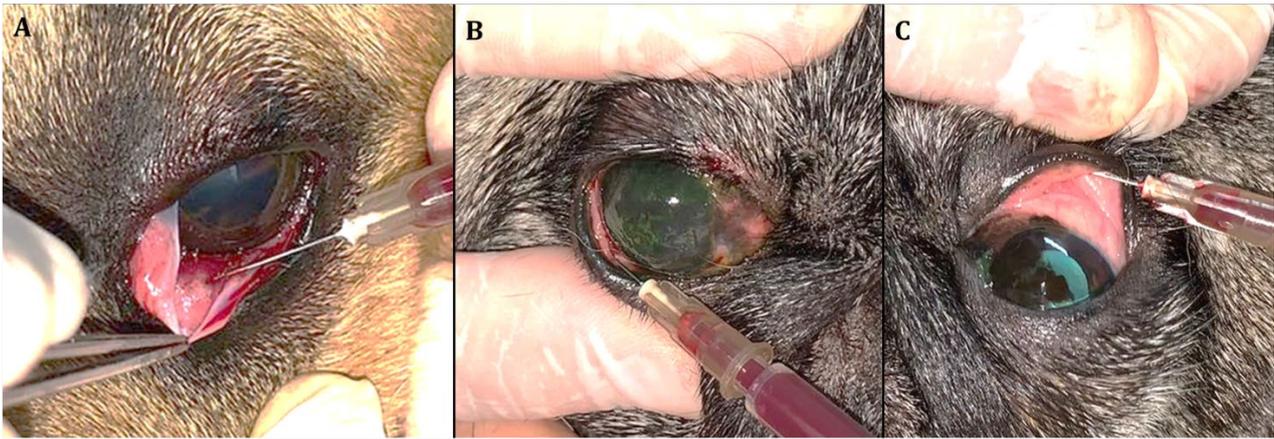


Fig. 1 Pontos de aplicações do PRPH. (A) Glândula da terceira pálpebra, (B) Conjuntiva palpebral inferior, e (C) Conjuntiva palpebral superior.

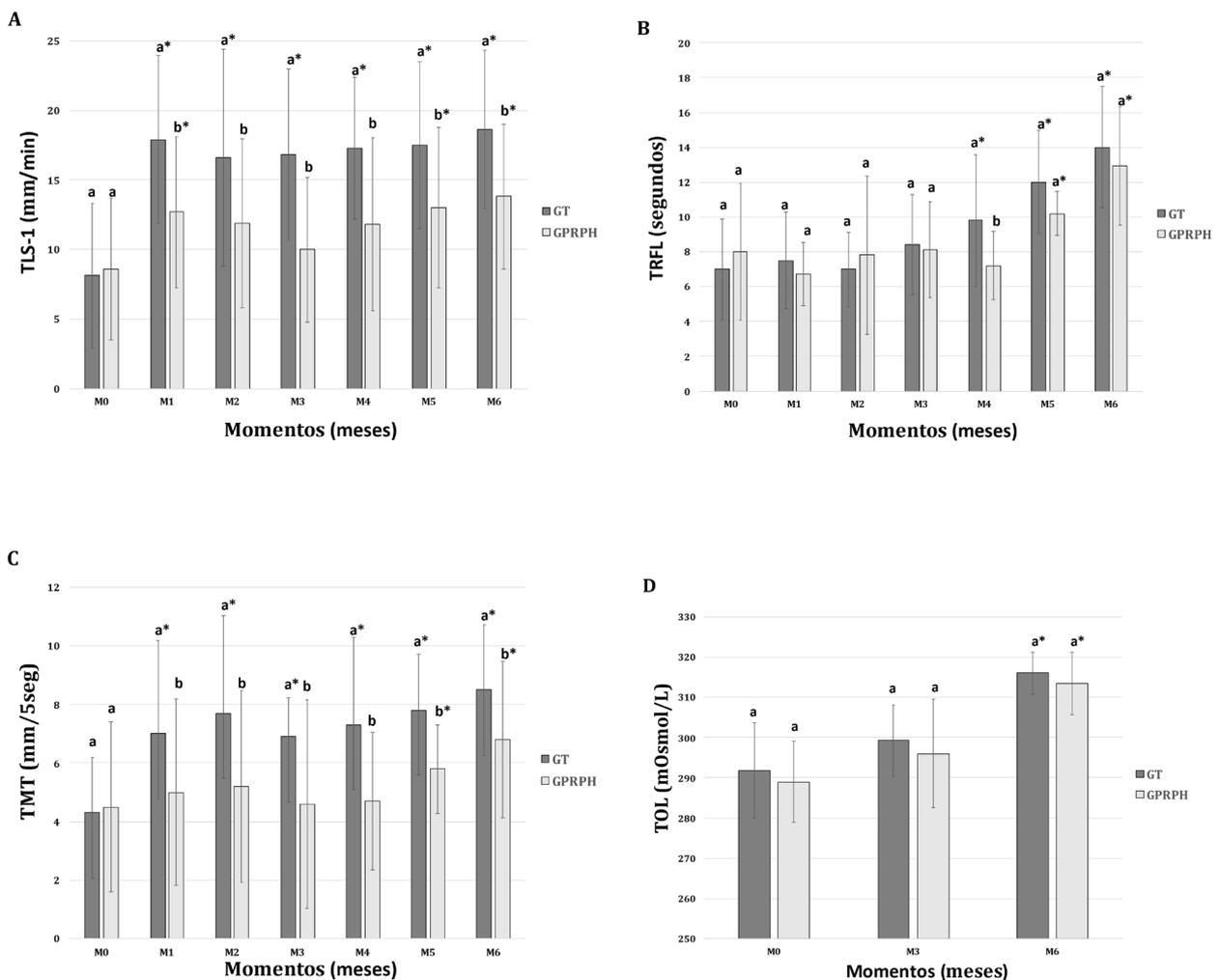


Fig. 2 Média e desvio padrão dos testes oculares: (A) teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1) em mm/min, teste de meniscometria de tira (TMT) em mm/5seg, teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos e teste de osmolaridade de lágrima (TOL) em mOsmol/L, do Grupo Tacrolimus (GT) e do Grupo Plasma Rico em Plaqueta Homólogo (PRPH) nos momentos inicial (M0), e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).

* $p < 0,05$ (teste de Tukey para comparar momentos)

^{a,b} $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis para comparar grupos)

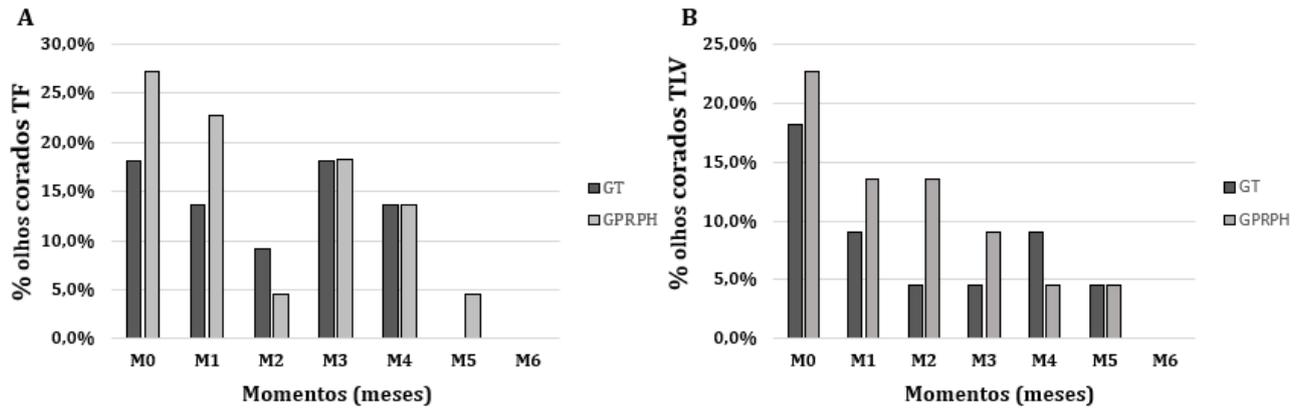


Fig. 3 Percentual de olhos corados: (A) Teste de Fluoresceína (TF), e (B) Teste de Lissamina Verde, em cães com CCS (n=22), do Grupo T (Tacrolimus) e Grupo PRPH (Plasma Rico em Plaquetas Homólogo), nos momentos inicial (M0), e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).

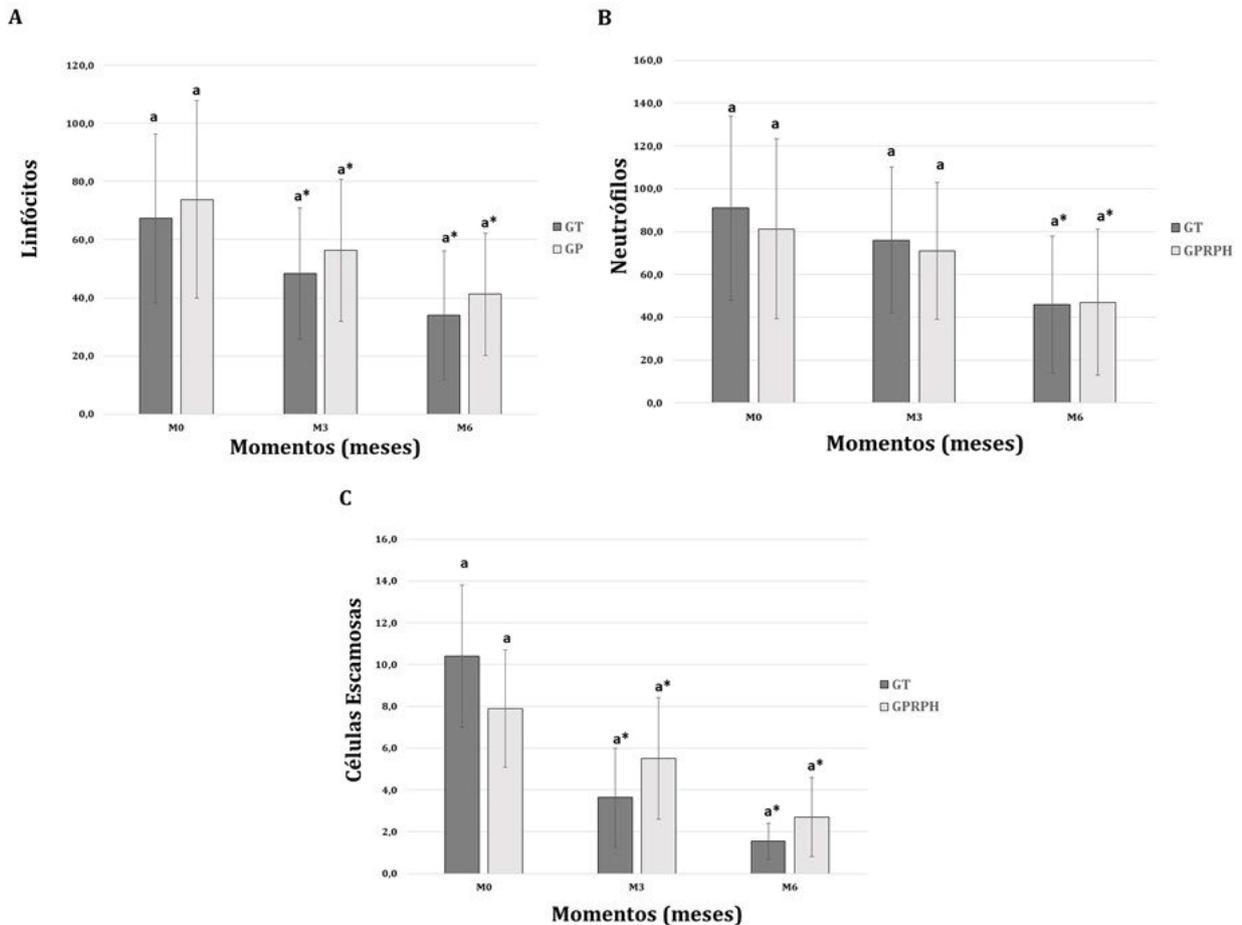


Fig. 4 Média e desvio padrão da contagem de (A) linfócitos, (B) neutrófilos e (C) células escamosas, no exame citológico da glândula da terceira pálpebra realizado nos momentos M0 (início), M3 (3 meses) e M6 (6 meses).

* $p < 0,05$ (teste de Tukey para comparar momentos)

^{a,b} $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis para comparar grupos)

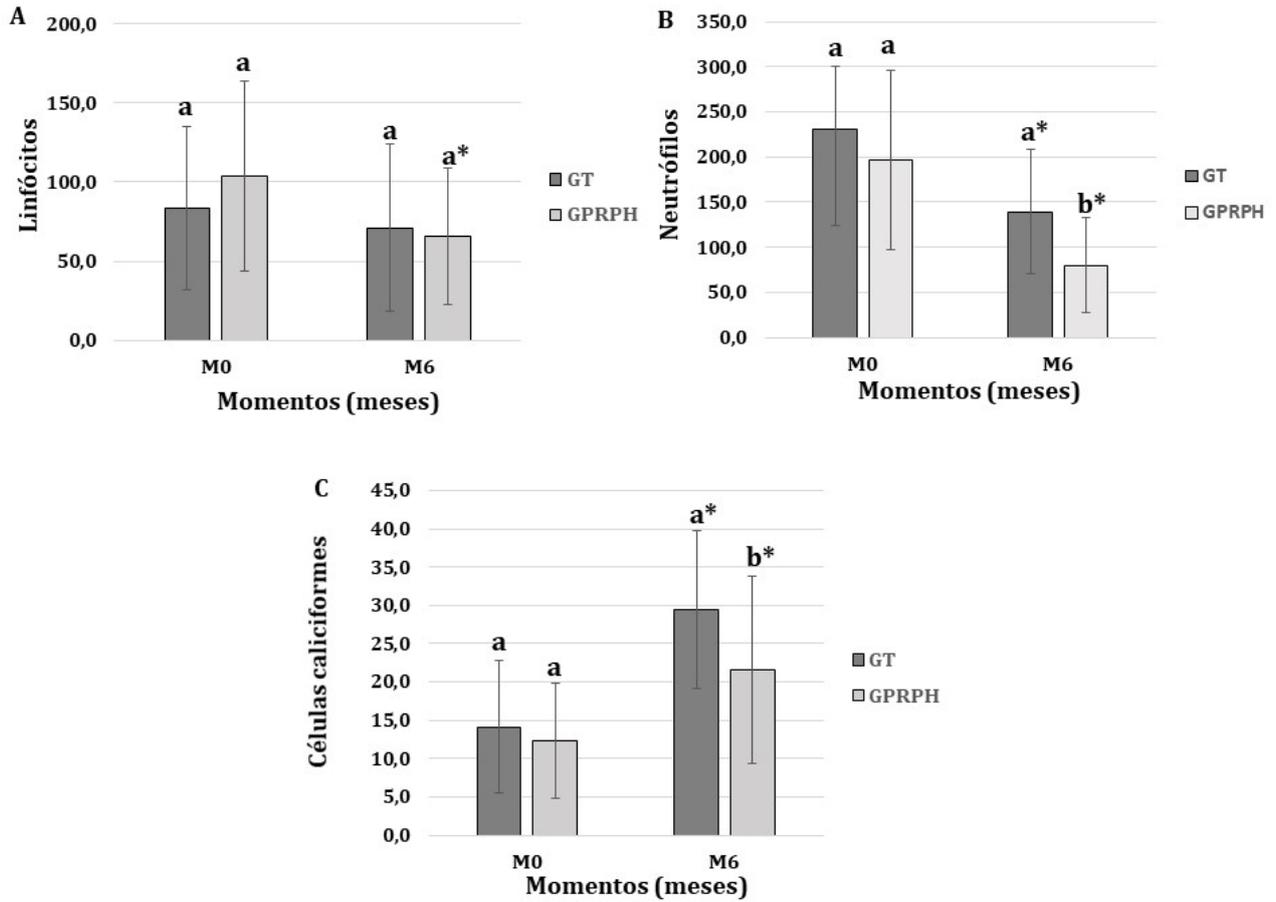


Fig. 5 Média e desvio padrão da contagem de (A) neutrófilos, (B) linfócitos e (C) células calciformes, no exame histopatológico da conjuntiva bulbar inferior, realizado nos momentos M0 (início) e M6 (6 meses).

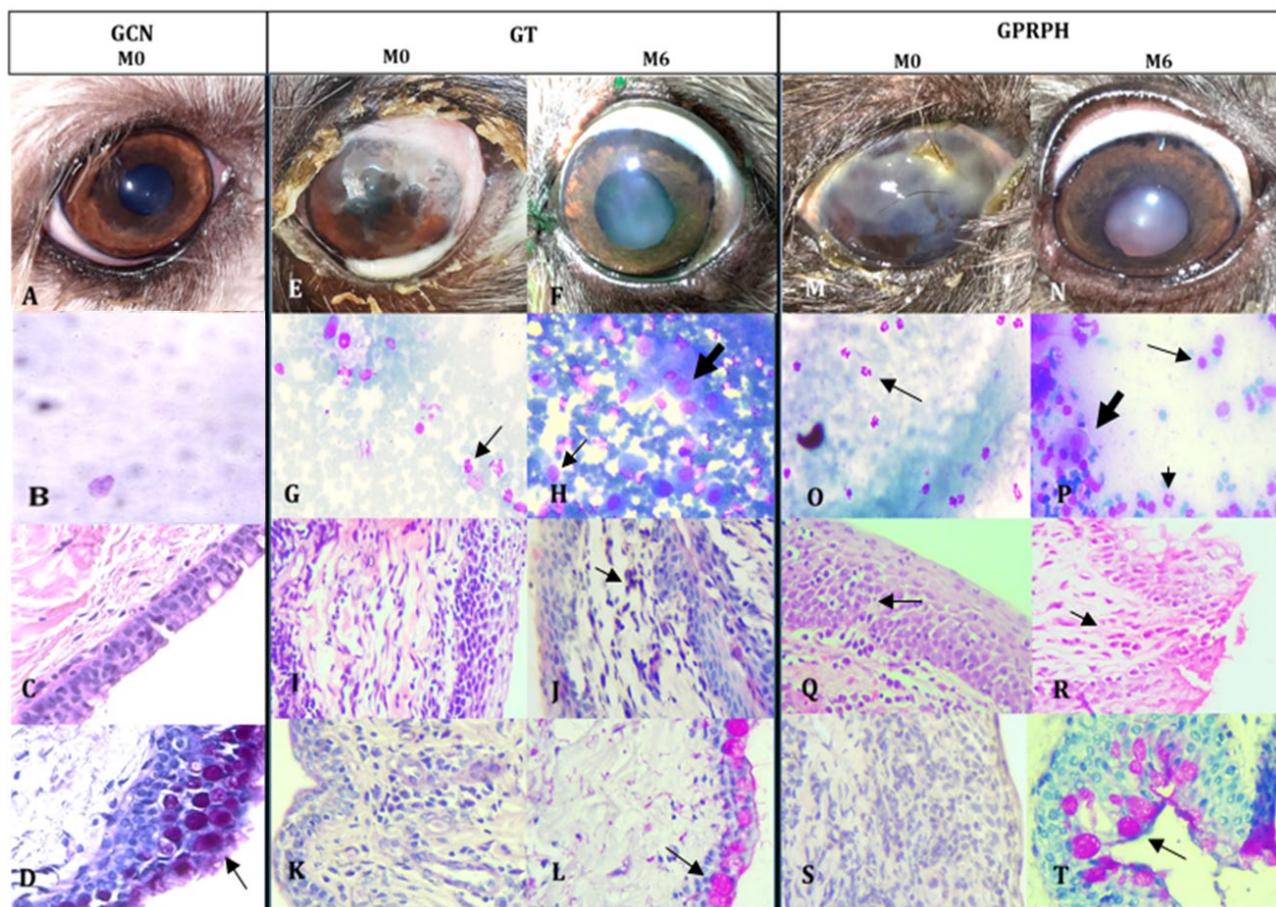


Fig. 6 Comparação do GCN com evolução clínica dos grupos de tratamento GT e PRPH no momento inicial (M0) e momento final (M6). Grupo GCN - olho direito: (A) sem alteração; (B) citologia da glândula da terceira pálpebra de olho sem CCS; (C) histopatologia conjuntival mostrando epitélio sem alterações; (D) exame histopatológico conjuntival mostrando grande número de células caliciformes (seta); Grupo GT - olho esquerdo: (E) M0, secreção mucopurulenta e vascularização da córnea; (F) M6, evolução clínica e melhora nos sinais de CCS; (G) M0, citologia da glândula da terceira pálpebra evidenciando presença de neutrófilos (seta); (H) M6, citologia da glândula da terceira pálpebra com presença de células caliciformes (seta grossa) e linfócitos (seta fina); (I) M0, histologia conjuntival com linfócitos no estroma e edema do epitélio; (J) M6, histologia conjuntival com raros linfócitos no estroma (seta); (K) M0, histologia com ausência de células caliciformes; (L) M6, histologia mostrando presença de células caliciformes em quantidade normal (seta); Grupo PRPH - olho direito: (M) M0, secreção mucopurulenta e pigmentação da córnea; (N) M6, evolução clínica e melhora nos sinais de CCS; (O) citologia da glândula da terceira pálpebra com presença de neutrófilos (seta) em meio a muco; (P) M6, citologia da glândula da terceira pálpebra com presença de célula caliciforme (seta grossa), neutrófilos (cabeça de seta) e linfócitos (seta fina); (Q) M0, histologia mostrando inflamação crônica com edema da conjuntiva e exocitose de linfócitos (seta); (R) M6, histologia conjuntival mostrando presença de raros linfócitos no estroma (seta); (S) M0, histologia evidenciando ausência de células caliciformes; (T) M6, histologia mostrando presença de células caliciformes em quantidade normal (seta). Em B, G, H, O e P: coloração e Giemsa, aumento de 400x. Em C, I, J, Q e R: coloração de Hematoxilina-eosina, aumento de 400x. Em D, K, L, S e T: coloração de PAS, aumento de 400x.

ANEXO - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Escopo

Artigos para "Pesquisa Veterinária Brasileira" (PVB), uma Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária, são submetidos em Word online através do ScholarOne, link <https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>

Os artigos serão publicados apenas em inglês. Os autores podem submeter seus artigos em inglês ou português (por favor, ver Serviços de tradução), seguindo o modelo da revista - disponível nesse link | - e os últimos fascículos publicados.

Para comprovar a qualidade do inglês, um certificado da língua inglesa emitido por instituição credenciada pela Pesq. Vet. Bras. (veja a lista em Serviços de tradução) pode ser feito.

Todos os autores devem se registrar no ORCID (Open Researcher and Contributor ID - <https://orcid.org/register>) e vinculá-lo ao seu perfil ScholarOne. O link pode ser feito editando o perfil do usuário no ScholarOne na opção Associate your existing ORCID iD. Os identificadores ORCID contribuem para a identidade singular dos autores e os processos de interoperação e bibliométricos. Usando o ORCID, os pesquisadores são fácil e corretamente conectados com seus resultados de pesquisa, publicações e afiliações.

A PVB publica Artigos Originais, Revisões Críticas da Literatura (essas últimas, por convite do Editor-Chefe) e Tópicos de Interesse Geral; nenhum tipo comunicação curta, nota ou relatos de caso são aceitos.

Os Artigos Originais devem conter resultados de pesquisas ainda não publicadas e não submetidas a outras revistas.

As Revisões da Literatura devem ser críticas e consistir em assuntos da linha de pesquisa do Autor.

Os Temas de Interesse Geral devem ser de grande importância e baseados na larga experiência dos autores.

As opiniões e conceitos emitidos são da responsabilidade dos autores. O Conselho Editorial da revista, auxiliado pela revisão pelos pares, pode sugerir ou solicitar modificações no texto.

Os direitos do autor dos artigos aceitos são preservados.

Organização e elaboração do manuscrito

Organizar o artigo em TITLE, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSION(S) (os três últimos preferencialmente em capítulos separados), Acknowledgements, Conflict of interest statement, e REFERENCES

O TITLE deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; informe detalhes de identificação científica nos MATERIAL AND METHODS.

Os nomes de autores com vários nomes e sobrenomes devem ser abreviados, por exemplo, simplificar Claudio Severo Lombardo de Barros para Claudio S.L. Barros ou Barros C.S.L. O Autor para correspondência deve ser aquele que garanta o contato com o Conselho Editorial da PVB. Eleve mais uma vez os asteriscos para a chamada às notas de rodapé, para que pareçam maiores.

O cabeçalho do ABSTRACT deve conter os nomes abreviados e invertidos dos autores, o ano, o título e o endereço postal do laboratório ou instituição onde foi realizada a parte principal da pesquisa (compare sempre os autores do artigo e sua listagem no cabeçalho do ABSTRACT para evitar discrepâncias).

A nota de rodapé da primeira página deve conter o endereço profissional completo de cada autor (no idioma do país do autor onde a correspondência deve ser enviada, português, espanhol, inglês, etc.), bem como o e-mail sublinhado do Autor para correspondência.

O ABSTRACT deve ser uma versão explicada em português do ABSTRACT, seguido de "INDEX TERMS", que devem incluir os termos do título, pois não são apenas "Termos Adicionais de Indexação."

O RESUMO deve conter (1) o título [entre colchetes e em negrito] (2) o que foi investigado, indicando (2) os materiais e métodos utilizados, (3) os resultados mais importantes, e (4) a conclusão, seguida por "TERMOS DE INDEXAÇÃO" (que também incluem palavras do título, pois não são apenas "Termos Adicionais de Indexação.")

A INTRODUCTION deve ser curta, com citação da literatura específica, seguida do objetivo da trabalho.

Em MATERIAL AND METHODS forneça todos os dados necessários para repetir o estudo.

Em RESULTS os dados obtidos são apresentados de forma concisa.

Em DISCUSSION, confronte seus resultados com os da literatura. Evite mencionar o desenvolvimento de pesquisas ou planejamentos futuros para evitar o comprometimento da revista em publicar os resultados de trabalhos ainda não realizados.

Baseie suas conclusões (CONCLUSIONS) apenas nos resultados.

Não mencione Agradecimentos (Acknowledgements) no texto ou notas de rodapé, mas após as CONCLUSIONS.

Declare qualquer conflito de interesses ou "nenhum" se for o caso.

Em REFERENCES (referências) devem incluir todas as citações consultadas e apresentadas cronologicamente no texto. Escreva a lista de referências em ordem alfabética e cronológica, começando pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores da respectiva referência, em caixa alta e caixa baixa. Cada autor deve ser separado apenas por uma vírgula, seguida pelo ano, título e os dados da publicação (por extenso, em caso de dúvida sobre abreviatura), conforme www.pvb.com.br.

O estilo da revista deve ser seguido:

Fonte Cambria em pitch 10, espaço simples entre as linhas; página formato A4, com margens de 2cm (superior, inferior, esquerda e direita), texto justificado em uma coluna. Coloque as legendas das Figuras abaixo da lista de referências; não repita as legendas abaixo das imagens das Figuras. Envie figuras e tabelas separadas do texto principal.

ABSTRACT e RESUMO são escritos em apenas um parágrafo e não devem conter referências.

Os manuscritos devem ser concisos e, sempre que possível, escritos no pretérito.

Escreva os nomes científicos completos (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, etc.), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviatura do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).

Nos títulos das Tabelas e Legendas das Figuras, escreva os nomes científicos por extenso.

No texto, chamadas para notas de rodapé são feitas em algarismos arábicos, em ordem crescente ao longo de todo o manuscrito, sem o uso de "Inserir nota final" do Word.

Nota: Não use espaços entre os números e suas unidades para evitar separá-los em duas linhas (p.ex.: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, $P < 0,05$). A abreviatura para número é "n^o" e não "no"; para grau Celsius é "°C" e não "oC".

Tabelas e Figuras devem ser citadas no texto com seus respectivos números em ordem crescente.

Abreviaturas de instituições, quando apresentadas pela primeira vez, devem ser colocadas entre parênteses após o nome completo da instituição.

As citações da literatura no texto são feitas por "autor e ano" (p.ex. Caldas 2005). Cite artigos com dois autores pelos dois nomes (p.ex. Pedrosa & Pimentel 2013). Cite no texto artigos com mais de dois autores pelo primeiro nome do autor seguido de "et al." e o ano (p.ex. Brito et al. 2015). Se a citação de dois artigos for idêntica, faça a distinção acrescentando letras minúsculas após o ano de publicação (p.ex. Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação no texto deve ser cronológica (p.ex. Barbosa et al. 2003, Armien et al. 2004).

Consulte o texto completo de todos os artigos citados; se não for possível ler todo um determinado artigo, cite a referência original no texto do manuscrito como, p.ex., Bancroft (1921), e, então, na Lista de Referências, cite como Bancroft 1921. título. ... Nome do Periódico (Apud Suvarna & Layton 2013). Além disso, inclua, na íntegra, esta referência consultada (Suvarna & Layton 2013) na Lista de Referências.

O uso de "comunicação pessoal" e "dados não publicados deve ser excepcional e citado no texto como Autor e Ano (Barbosa 2016), e na Lista de Referências como p Barbosa 2016. Personal communication (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal, Brazil).

As Legendas das Figuras (p.ex. "Fig.3.") devem ser suficientemente informativo para a compreensão (porque as Figuras são independentes do texto).

Os títulos das tabelas devem ser escritos em negrito, e o cabeçalho (títulos das colunas) deve ser claro (não negrito), escrito em letras maiúsculas e minúsculas, e separados por duas linhas horizontais longas. Não há linhas verticais nem fundo cinza; excepcionalmente podem existir linhas horizontais. As notas de rodapé devem

ser em letras minúsculas ou outros sinais, mas não em números arábicos. As tabelas devem ser submetidas em Word (não como imagens) para permitir correções de acordo com o estilo da revista.

Dados complexos devem ser enviados como gráficos (mas referidos como Figuras) em 2D sem fundo cinza e linhas horizontais. Escreva gráficos, incluindo texto, em Cambria em 10 pitch.

Apresentação das Figuras

Formato e dimensão: As imagens devem estar em formato TIF, canal RGB, comprimento de 85 mm e resolução de 300 dpi (pixel/polegada) para figuras coloridas e 600 dpi (pixel/polegada) para figuras em preto e branco (gráficos e mapas).

Numeração: As figuras devem ser nomeadas separadamente e identificadas apenas por números na ordem em que são citadas no texto (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.). Não use letras, como Fig. 1A, 1B, 1C, etc., para identificar as figuras.

Identificação de estruturas: Caso seja necessário destacar estruturas específicas dentro da imagem, utilizar fonte "Cambria 8 pontos", preto ou branco, ou setas pretas ou brancas dependendo do fundo da figura.

Micrografias: as barras de escala não são obrigatórias.

Legendas: Cada figura deve ter uma legenda autoexplicativa. Deve conter o que está na imagem, seguido de informações adicionais (Exemplo de formato da legenda de figura: Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método histoquímico (HE, PAS, etc.) ou imunohistoquímico (vimentina, etc.). Ao descrever aspectos da imuno-histoquímica, use o termo "marcação imunológica" em vez de "coloração" ou "positivo". Indique onde a "imunolocalização" ocorreu (nuclear, citoplasmática ou membranosa) e em que extensão. As legendas das figuras devem aparecer no manuscrito principal, após referências.

Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na lista de referências. Antes de enviar o artigo, as discrepâncias devem ser corrigidas pelo Autor. O sistema ScholarOne bloqueia automaticamente se tais disparidades existirem.

Exemplos de Referências

Artigos publicados em periódicos:

Martins K.P.F., Fonseca T.R.S., Silva E.S., Munhoz T.C.P., Dias G.H.S., Galiza G.J.N., Oliveira L.G.S. & Boabaid F.M. 2018. Bócio em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 38(6):1030-1037.

Rondelli L.A.S., Silva G.S., Bezerra K.S., Rondelli A.L.H., Lima S.R., Furlan F.H., Pescador C.A. & Colodel E.M. 2017. Doenças de bovinos no Estado de Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). *Pesq. Vet. Bras.* 37(5):432-440.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24.

(Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal "&" é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra "Revista" deve ser abreviada como "Revta" em diferença a "Rev.", do inglês "Review". Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados "pontovírgulas" (;) em lugar de vírgulas.

Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. *Oral Microbiology*. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)

Dissertações e Teses:

Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.

(Notem: (1) Deve-se evitar citações de Dissertações ou Teses; deve-se preferir citar artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.)

Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). *Pesq. Vet. Bras.* 36(Supl.2):50-51. (Resumo)

Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. *Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS*, p.145-146. (Resumo)

(Notem: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra!)