



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**JOÃO VICTOR GOULART CONSONI PASSARELI**

**TERAPIA CELULAR REGENERATIVA INJETÁVEL NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Presidente Prudente - SP  
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRUAÇÃO  
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**JOÃO VICTOR GOULART CONSONI PASSARELI**

**TERAPIA CELULAR REGENERATIVA INJETÁVEL NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Defesa da Tese apresentada a Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado – Área de concentração: Ciência Animal

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

Presidente Prudente - SP  
2024

636.089  
P286t

Passareli, João Victor Goulart Consoni.

Terapia celular regenerativa injetável no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães / João Victor Goulart Consoni Passareli. – Presidente Prudente, 2024.

88f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

Orientador: Silvia Maria Caldeira Franco Andrade.

1. Cão. 2. Olho seco. 3. Mesenquimal. 4. Ácido graxo tacrolimos. I. Título.

**JOÃO VICTOR GOULART CONSONI PASSARELI**

**TERAPIA CELULAR REGENERATIVA INJETÁVEL NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

Defesa da Tese apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado - Área de Concentração: Ciência Animal

Presidente Prudente, 18 de abril de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Adriana Falco de Brito  
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai  
Universidade do Oeste Paulista  
Presidente Prudente – SP

---

Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Universidade de Brasília – UNB  
Brasília - DF

---

Profa. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza  
Universidade Estadual de Londrina – UEL  
Londrina - PR

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus que sempre esteve presente, me sustentando e me dando forças para que eu pudesse concluir mais esse projeto na minha vida.*

*Aos meus pais Edvan e Maria Aparecida, minha irmã Mariana e meus sobrinhos Joaquim e José Miguel que são minha fortaleza, sempre me apoiando nas minhas escolhas e que não medem esforços para que eu possa estar sempre evoluindo e realizando os meus sonhos. Essa conquista é por vocês, pois são vocês em que eu me inspiro eu sou grato por saber que eu posso contar sempre com vocês. Obrigado por existirem na minha vida. Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a minha querida orientadora Profa. Dra. Silvia Franco Andrade por todo esse tempo de parceria, revelando que além de uma excelente profissional posso considerar como uma segunda mãe. E que não mediu esforços para que tudo ocorresse da melhor forma, com seus conselhos e sugestões que foram determinantes para o resultado alcançado.*

*Aos meu amigo e parceiro de projeto William fez com que essa jornada fosse mais leve e agradável, me ajudando da melhor forma com palavras, conselhos e carinho quando precisei gratidão eterna.*

*As amigas de projeto Giovana e Gismeli que me ajudaram na elaboração e durante toda a pesquisa.*

*Ao pessoal da iniciação científica Layla, Giovana, Leticia e Daniel que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.*

*A Ana pela ajuda no preparo das células tronco que sempre esteve disposta em me ajudar, ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Unoeste que sempre estavam dispostos a me ajudar quando precisei.*

*A Professora Dr<sup>a</sup> Cecília por sempre estar disposta a colaborar no meu aprendizado, sempre estando presente durante a minha vida, me ajudando e esclarecendo todas as dúvidas que tive na graduação, mestrado e no doutorado que colaborou para que esse trabalho pudesse ser realizado.*

*A professora Gisele Nai responsável pelo laboratório de patologia da Universidade do Oeste paulista e aos funcionários que auxiliaram no processo de elaboração das lâminas.*

*Ao meu cunhado Marcelo que sempre me ajudou dando apoio desde o cursinho, vestibular, faculdade e mestrado e não podia ser diferente no doutorado, gratidão por ser essa pessoa especial comigo.*

*As minhas avós Elzira (in-memoriam) e Maria por toda preocupação e cuidado comigo durante toda a minha vida e por sempre mostrarem interesse sobre a pesquisa mesmo sabendo que não iam entender a maioria das coisas.*

*A Lourdes que sempre esteve de braços abertos e que com suas palavras me auxilia na minha evolução e me mostrando que era só um momento ruim e que logo estaria tudo bem muito obrigado.*

*Ao Carlos Henrique que eu tenho o privilégio de ter em minha vida e que foi uma das pessoas que mais ficou me cobrando e incentivando para a conclusão. Pois foi ele que sempre esteve do meu lado me escutando, dando conselho e ajudando a resolver os problemas que surgiram. Gratidão eterna, você sempre estará guardado em meu coração eu te amo.*

*E por fim agradeço aos proprietários e aos animais que participaram da pesquisa.*

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

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

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.( São Francisco de Assis)*

## RESUMO

### **Terapia celular regenerativa injetável no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães**

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença inflamatória, principalmente imunomediada, que acomete as glândulas lacrimais e a superfície ocular, podendo ser uni ou bilateral, provocando a diminuição da porção aquosa do filme lacrimal e/ou excessiva evaporação. O objetivo do estudo foi comparar a eficácia dos tratamentos de medicina regenerativa injetável, em cães diagnosticados com CCS, utilizando células-tronco mesenquimal (CTM) e plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) com o tratamento tópico convencional com o imunossupressor tacrolimus 0,03%, além do uso de CTM associado ou não com ômega 3 oral. Foram avaliados durante 6 meses, 50 cães com CCS bilateral, que foram distribuídos em 2 estudos: estudo 1 com 30 cães, distribuídos em 3 grupos: Grupo tacrolimus 0,03% (GT) tópico, Grupo CTM (GCTM) injetável e Grupo PRPH (GPRPH) injetável; e estudo 2 com 20 cães distribuídos em 2 grupos: Grupo CTM (GCTM) injetável e Grupo CTM injetável associado ao uso de ômega 3 oral (GCTMO). Os grupos que utilizaram os tratamentos GCTM, GCTMO e GPRPH foram injetados 1 vez ao mês na glândula da terceira pálpebra (0,1 ml), conjuntiva palpebral superior (0,1 ml) e inferior (0,1 ml), totalizando até 3 aplicações, conforme a necessidade com base na melhora dos exames oftálmicos e GCTMO teve a suplementação diária do ômega 3 e o GT fez uso do colírio 2 vezes ao dia, em todos os grupos utilizou o lubrificante artificial 2 vezes ao dia. Foram feitos exames oftálmicos uma vez ao mês Teste Lacrimal de Schirmer 1 (TLS-1), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) e coleta de citologia aspirativa no M0, M3 e M6 e biopsia da conjuntiva do M0 e M6. Os estudos foram aprovados pelo CEUA n. 6412 (estudo 1) e n. 6484 (estudo 2). Todos os grupos apresentaram melhora na produção lacrimal, na qualidade do filme lacrimal e na saúde da superfície ocular, além da diminuição do processo inflamatório e aumento das células calciformes. O grupo com CTM demonstrou uma melhor eficácia em comparação aos grupos GT e GPRPH, sendo que a suplementação com ômega 3 levou a um aumento da eficácia da CTM injetável. Os estudos destacam a eficácia no tratamento da CCS em cães com a medicina regenerativa injetável mensal com CTM e PRPH, sendo uma alternativa ao tratamento convencional com o imunossupressor

tacrolimus 0,03% tópico com instilação diária e contínua, e que pode ser inviável em algumas situações como em cães agressivos ou não cooperativos, tutores idosos ou com trabalho com horários que não possibilitam a instilação diária dos colírios, ou ainda em cães alérgicos ou refratários ao colírio imunossupressor.

**Palavra-chave:** Olho Seco. Mesenquimal. Ácido Graxo Tacrolimos. Cães.

## **ABSTRACT**

### **Injectable regenerative cell therapy in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs**

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) is an inflammatory disease, mainly immune-mediated, that affects the lacrimal glands and the ocular surface, which can be unilateral or bilateral, causing a decrease in the aqueous portion of the tear film and/or excessive evaporation. The objective of the study was to compare the effectiveness of injectable regenerative medicine treatments in dogs diagnosed with KCS, using mesenchymal stem cells (MSC) and homologous platelet-rich plasma (HPRP) with conventional topical treatment with the immunosuppressant tacrolimus 0.03%, in addition to the use of MSC associated or not with oral omega 3. Fifty dogs with bilateral KCS were evaluated over a period of 6 months, which were divided into 2 studies: study 1 with 30 dogs, distributed into 3 groups: Topical 0.03% tacrolimus (GT) Group, injectable MSC (GMSC) Group and HPRP Group (GHPRP) injectable; and study 2 with 20 dogs divided into 2 groups: injectable MSC Group (GMSC) and injectable MSC Group associated with the use of oral omega 3 (GMSCO). The groups that used the GMSC, GMSCO and GHPRP treatments were injected once a month into the gland of the third eyelid (0.1 ml), upper palpebral conjunctiva (0.1 ml) and lower (0.1 ml), totaling up to 3 applications, as needed based on improvement in ophthalmic exams and GMSCO had daily omega 3 supplementation and GT used eye drops twice a day, in all groups they used artificial lubricant twice a day. Ophthalmic exams were performed once a month Schirmer Tear Test 1 (STT-1), Tear Breakup Film Rupture Test (TBUT) and collection of aspiration cytology in M0, M3 and M6 and biopsy of the conjunctiva of M0 and M6. The studies were approved by CEUA n. 6412 (study 1) and n. 6484 (study 2). All groups showed improvements in tear production, tear film quality and ocular surface health, in addition to a reduction in the inflammatory process and an increase in goblet cells. The MSC group demonstrated better efficacy compared to the T and GHPRP groups, with omega 3 supplementation leading to an increase in the effectiveness of injectable MSC. The studies highlight the effectiveness in the treatment of KCS in dogs with monthly injectable regenerative medicine with MSC and HPRP, being an alternative to conventional treatment with the immunosuppressant tacrolimus 0.03% topical with

daily and continuous instillation, and which may be unfeasible in some situations such as aggressive or uncooperative dogs, elderly owners or those with work schedules that do not allow daily instillation of eye drops, or even in dogs allergic or refractory to immunosuppressive eye drops.

**Keywords:** Keratoconjunctivitis sicca. Mesenchymal. Tacrolimo. Fatty Acid . Dogs.

## LISTA DE SIGLAS (artigo 1 e artigo 2)

x/dia	– vezes por dia
%	– Porcentagem
ARVO	– Association for Research in Vision and Ophtalmology
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
Mm <sup>3</sup>	– milímetro cúbico
M0	– Momento zero
M1	– Momento um
M2	– Momento dois
M3	– Momento três
M4	– Momento quatro
M5	– Momento cinco
M6	– Momento seis
TF	– Teste de Fluoresceína
TLS	– Teste Lacrimal de Schirmer
TLV	– Teste de Lissamina Verde
TRFL	– Teste de Ruptura do Filme Lacrimal
CTM	– Células tronco Mesenquimal
CTMO	– Células tronco Mesenquimal Ômega
PRPH	– Plasma Rico em Plaqueta Homologo
T	– Tacrolimus
Rpm	– Rotação por minuto
Seg	– Segundos
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO 1 (REVISTA VETERINARY OPHTHALMOLOGY).....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO 2 (REVISTA VETERINARY WORLD).....</b>	<b>39</b>
	<b>ANEXO 1 - CERTIFICADO CEUA ARTIGO 1.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO 2 - CERTIFICADO CEUA ARTIGO 2.....</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXO 3 – NORMAS DA REVISTA VETERINARY OPHTHALMOLOGY.....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO 4 – NORMAS DA REVISTA VETERINARY WORLD.....</b>	<b>78</b>

## 1 ARTIGO 1 (REVISTA VETERINARY OPHTHALMOLOGY)

### **Comparação entre tacrolimus, células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães**

#### **Resumo**

**Introdução e Objetivo:** A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença inflamatória crônica que provoca a diminuição da porção aquosa do filme lacrimal e/ou excessiva evaporação. O objetivo do estudo foi comparar a eficácia do tratamento de medicina celular regenerativa injetável, células tronco mesenquimal (CTM) e do plasma rico em plaquetas homologado (PRPH), com o tratamento convencional de imunossupressor tópico tacrolimus 0,03% (T), em cães com CCS.

**Materiais e Métodos:** Foram avaliados 30 cães, por 6 meses, divididos em 3 grupos, com 10 animais cada, GCTM, GPRPH e GT. O GT foi utilizado o colírio a 0,03%, 2x/dia, o GCTM e o GPRPH, foram utilizados por via injetável na glândula da terceira pálpebra, na conjuntiva palpebral superior e inferior, 0,1 ml em cada localização. Foram realizados os exames oftálmicos, 1 vez ao mês, Teste Lacrimal de Schirmer 1 (TLS-1), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) e Teste de Fluoresceína (TF). Citologia aspirativa da Glândula da terceira pálpebra na admissão do animal no projeto, no 3 e 6 meses e a biópsia da conjuntiva na admissão e no 6 mês.

**Resultados:** Os grupos apresentaram melhora, na produção, qualidade do filme lacrimal e da superfície ocular. A média e desvio padrão dos valores do TLS do GCTM foi  $16,2 \pm 4,6$  mm/min, do GPRPH foi  $11,8 \pm 5,0$  mm/min e do GT  $18,1 \pm 6,0$  mm/min. No TRFL, o GCTM apresentou média e desvio padrão de  $15,7 \pm 3,9$  s, o GPRPH foi de  $8,70 \pm 2,81$  s e o GT foi  $9,39 \pm 2,99$  s. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no TLS-1 nos grupos GT e GCTM ao final do estudo, sendo que o aumento foi maior com o GT. No TRFL houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CTM com GT e GCTM, sendo maior os valores aferidos do GCTM. Na citologia aspirativa mostrou que a melhora do processo inflamatório após os tratamentos no GCTM ocorreu mais precoce, seguida do GT e por último o GPRPH. No histopatológico revelou que o grupo que apresentou um aumento das células calcificadas foi o GCTM, seguido do GT e o GPRH.

**Conclusão:** Conclui-se que o tratamento com medicina regenerativa celular, com CTM e PRPH injetável com aplicação mensal, é eficaz, sendo a CTM com eficácia superior ao PPRPH, e ambos promovendo diminuição da inflamação, melhora na quantidade e qualidade da lágrima, como ocorre no tratamento convencional com tacrolimus tópico diário, podendo ser uma alternativa viável no tratamento da CCS em cães que não possam fazer o tratamento tradicional com imunossupressor contínuo.

**Palavras-chave:** Injetável, Síndrome do olho seco, Medicina regenerativa, Terapia Celular, Células Caliciformes, Glândula Lacrimal

## 1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença inflamatória crônica, que ocorre devido a deficiência de produção da porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa) e/ou pela evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa) devido a produção inadequada da camada lipídica, que afeta estruturas da córnea e conjuntiva podendo evoluir para destruição tecidual e cegueira [1, 2, 3]. A CCS é uma das doenças mais diagnosticadas na oftalmologia veterinária, sendo uma oftalmopatia grave e progressiva [4, 5]. É a maior causa de morbidade ocular no homem e no cão [6, 7]. De maior incidência é a imunomediada, mas outras etiologias também podem causar a diminuição da produção lacrimal como predisposição racial, hipotireoidismo, paralisia do nervo facial, medicamentos, excisão cirúrgica da glândula da terceira pálpebra, cinomose e leishmaniose, entre outras [4-8].

O tratamento atualmente preconizado para CCS é o uso de imunossupressores tópicos (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus) associados com substitutos da lágrima. Outras drogas podem ser utilizadas como anti-inflamatórios não esteroides e esteroides (se não houver úlceras), controle de infecções secundárias com o uso de antibióticos, além de outros fármacos como a pilocarpina (droga parassimpatomimética lacrimomimética) e acetilcisteína (mucolítico) [7, 9, 10].

A medicina celular regenerativa vem crescendo no tratamento de doenças crônicas degenerativas ou que envolvam um déficit cicatricial dos tecidos, utilizando por exemplo células tronco mesenquimais (CTM) ou plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) [11, 12, 13]. A medicina celular regenerativa é um processo de substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos para restaurar as funções normais. Esse campo é muito promissor, em relação à regeneração de tecidos e órgãos danificados no organismo, pela troca de tecidos danificados e/ou simulando os mecanismos corpóreos de reparo para curar o que anteriormente era irreparável [14].

As células tronco (hematopoiéticas e mesenquimais) são extraídas de tecido adiposo [15], mucosa oral, conjuntiva, cérebro, retina, células embrionárias, epitélio ciliar, olhos de recém-nascido, cordão umbilical [16] e principalmente provenientes da medula óssea [11, 16, 17, 18, 19]. As células tronco têm capacidade de se diferenciar em uma variedade de tipos de células como osteogênicas, adipogênicas, condrogênicas, miogênicas e muitas outras células secretoras [15,18] dependendo das condições fisiológicas ou experimentais [17]. Sua utilização é viável devido ao fato de poder cultivar e isolar essas células tronco, mantendo sua potencialidade [11, 15, 18, 19]. Existem estudos que mostram o uso de células-tronco no tratamento de doenças oculares degenerativas [15,17,18,19].

A utilização dessas células tronco em doenças imunomediadas é devido a sua capacidade regenerativa que restaura os tecidos destruídos pela ação dos autoanticorpos e por sua ação imunomoduladora causado pela liberação de moléculas bioativas. Essas moléculas são imunossupressoras, especialmente para linfócitos T helper CD4, linfócitos B, inibindo assim a liberação de interleucinas como a IL-6 presentes na ceratoconjuntivite seca (CCS) [11, 15,19] além de estimular a angiogênese e a mitose celular, inibir a apoptose e a liberação de mediadores pró inflamatórios [11]. Em um estudo os autores revelaram que o uso de células-tronco mesenquimais tópicas no saco conjuntival foi uma terapia promissora, demonstrando melhora nos sinais clínicos e melhora quantitativa e qualitativa da lágrima, além do aumento das células caliciformes e redução na inflamação causada pela ceratoconjuntivite seca em cães [20].

Outra terapia celular importante é o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e o plasma rico em fatores de crescimento (PRFC) tem sido sugerido para o tratamento nos casos de olho seco

classificados de moderado a severo [21]. O PRP consiste num derivado sanguíneo que possui alta concentração de plaquetas obtidas através de um simples processo, que requer mínima manipulação e sem necessidade de acréscimo de alguma outra substância [12], possuindo ação imunomoduladora, baixo custo e resultados significativos no tratamento para tal enfermidade em seres humanos [12, 22].

O PRP é um hemoderivado rico em fatores de crescimento e proteínas bioativas que estão presentes e são sintetizadas no sangue, principalmente em atividade dos alfa-grânulos de plaquetas com ação a nível de regeneração tecidual [12]. Alguns estudos apontam sucesso no tratamento oftalmológico em humanos com doença da superfície ocular e síndrome do olho seco severa com diferentes etiologias, persistentes defeitos epiteliais e úlceras de córnea com a utilização do plasma rico em plaquetas [21, 23]. Um estudo mostrou melhora também na superfície ocular e na acuidade visual em 368 pacientes com olho seco classificados de moderado a grave utilizando apenas PRP em forma de colírio [12].

O objetivo do estudo foi comparar a eficácia do tratamento no ambulatório de medicina celular regenerativa injetável, células-tronco mesenquimal (CTM) e do plasma rico em plaquetas homologado (PRPH), com o tratamento convencional de imunossupressor tópico tacrolimus 0,03% (T), em cães com CCS.

## **Materiais e Métodos**

### **Aprovação ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Comissão de Uso Animal (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE - Protocolo nº 6412) (Anexo 1) e conduzido conforme as normas do CEUA e da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology – Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research).

### **Período de Estudo e Local**

O estudo foi realizado de setembro de 2020 a fevereiro de 2023 Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE em Presidente Prudente – SP.

## Animais

Foram avaliados 30 cães diagnosticados com CCS durante um período de tratamento de seis meses, sem distinção racial, faixa etária ou sexo. Os cães foram incluídos no estudo mediante observação de sinais clínicos oftálmicos utilizando lâmpada de fenda (Kowa SL-15, Japão), que incluíram secreção ocular, conjuntivite, opacidade corneana e pigmentação, além de critérios como  $TLS \leq 15$  mm/min e/ou  $TRFL \leq 20$  segundos. Os critérios de exclusão do estudo foram cães com  $TLS \leq 5$  mm/min, comportamento agressivo ou hiperativo, presença de patologias pré-existentes ou histórico de tumores. Todos os animais entraram após consentimento formal dos proprietários através de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## Grupos

Os cães foram separados aleatoriamente em 3 grupos com 10 animais cada:

Grupo T: Tacrolimus 0,03% colírio (Laboratório Centro Paulista Laboratório, São Paulo, Brasil), 1 gota, 2x/dia, tópico, em ambos os olhos, durante 6 meses e Tears<sup>®</sup> colírio (Laboratório Labyes, São Paulo, Brasil), 1 gota, 2x/dia, tópico, em ambos os olhos, durante 6 meses.

Grupo PRPH: Aplicação injetável de 0,3 ml de plasma rico em plaquetas, 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, sendo uma única aplicação a cada 30 dias sendo até 3 aplicações e Tears<sup>®</sup> colírio (Laboratório Labyes, São Paulo, Brasil), 1 gota, 2x/dia, tópico, em ambos os olhos, durante 6 meses. A metodologia para a obtenção do plasma rico em plaquetas é fundamentada na seguinte técnica [20], utilizou apenas um cão doador e era coletado 20 ml de sangue total pelo sistema a vácuo, de maneira estéril, através da punção da veia jugular em tubos estéreis contendo citrato de sódio 3,2%. A técnica consiste em dois processos de centrifugação. 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 comum (Sislab/Basic<sup>®</sup>). A seguir, descartou 30% do plasma superficial com objetivo de utilizar um plasma com uma maior concentração de plaquetas na segunda etapa da centrifugação, portanto o conteúdo remanescente era transferido para um tubo de *Falcon* seco e estéril.

Na segunda etapa, a parte remanescente era centrifugada a 400 g numa rotação de 1.500 rpm, por 10 minutos. Nessa etapa, o plasma foi dividido em duas porções, sendo uma delas a porção de plasma pobre em plaquetas e a outra parte o plasma rico em plaquetas. Dois terços do material sobrenadante era descartados (plasma pobre em plaquetas) e um terço restante foi classificado como plasma rico em plaqueta. Desse material foi obtido um volume de 0,6 mililitros (ml), que foi aplicado instantaneamente na glândula da terceira pálpebra e conjuntiva palpebral superior e inferior.

Grupo CTM: Os animais receberam as células tronco mesenquimais em ambos os olhos, onde foi a aplicação injetável de 0,3 ml de célula tronco mesenquimal ( $1 \times 10^6$ ) com agulha calibre 25 mm  $\times$  7 mm (Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil), 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, sendo uma única aplicação a cada 30 dias, durante 3 meses, e Tears<sup>®</sup> colírio (Labyes, São Paulo, Brasil), 1 gota, 2x/dia, tópico, em ambos os olhos, durante 6 meses.

Quando diagnosticado infecção secundária e/ou inflamação ocular (conjuntivite e/ou ceratite) foi utilizado colírio antibiótico a base de ciprofloxacina (Ciprovet<sup>®</sup> - Labyes) (1 gota 4x/dia), e em caso de inflamação ocular colírio anti-inflamatório a base de diclofenaco de sódio (Still colírio<sup>®</sup> - Allergan) (1 gota 3x/dia) durante 15 dias.

### **Processamento das Células-tronco Mesenquimal (CTM)**

Para o processamento das CTM seguiu o protocolo da Regenera, o criotubo contendo a CTM, que estava armazenado em botijão de nitrogênio a  $-196^{\circ}\text{C}$ , foi descongelado por 2 minutos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após, transferido imediatamente o conteúdo do criotubo para a solução de descongelamento centrifugado em baixa rotação (1100 rpm; força centrífuga relativa (FCR) = 216g) (Centrifuga Marca Fanem, Modelo 206BL) durante 5 minutos. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e adicionado à solução de lavagem 1. Foi homogeneizado delicadamente até que o precipitado se dissolvesse. Centrifugou novamente a 216g, 1100 RPM durante 5 minutos. Após a centrifugação, desprezou o sobrenadante e adicionou à solução de lavagem 2. Homogeneizou delicadamente até que o precipitado se dissolva. Centrifugou novamente a 216g, 1100 RPM durante 5

minutos. Desprezou o sobrenadante e adicionou 600µl de soro fisiológico para aplicação. Homogeneizou delicadamente com a pipeta de Pasteur até que o precipitado se dissolvesse. As células não podem permanecer mais de 10 minutos na solução fisiológica, pois após este tempo elas ficam enviáveis para uso, então a aplicação era imediata após o término do preparo.

### **Avaliação dos sinais clínicos**

As avaliações dos sinais oftálmicos foram realizadas 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 pigmentação e neovascularização da córnea, presença de secreção ocular, hiperemia conjuntival e úlcera de córnea. Os escores adotados para a avaliação foram: (0) sem alteração; (1) leve; (2) moderado e (3) severo [5].

### **Testes oftálmicos**

Teste Lacrimal de Schirmer-1 TLS-1, sem anestésico, foi realizado 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<sup>®</sup>, 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 [5].

Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), foi instilada 1 gota de fluoresceína 1% colírio (Fludiat<sup>®</sup>, Oftalmopharma) 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, com observação de pequenas manchas. Foram efetuadas duas repetições e a média calculada através desses resultados. Valores de TRFL ≤ 20 segundos foram considerados positivos para CCS [5].

Teste de Fluoresceína (TF) utilizando um corante vital a base de fluoresceína sódica que marca o estroma da córnea. Foi instilado 1 gota do colírio de fluoresceína 1% (Fludiag<sup>®</sup> (Oftalmopharma<sup>®</sup>)) 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.

### **Análises citológica**

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 calibre 0,45x13 e seringa 3ml. Para a coleta, foi instilado 1 gota de colírio Anestalcon<sup>®</sup> (cloridrato de proximetacaína 5mg/ml - Alcon) para o GCTM e GPRPHO, para a dessensibilização na glândula do olho coletado. Com a exposição da glândula da terceira pálpebra com auxílio de uma pinça oftálmica, foram coletadas as amostras destas glândulas após foi instilado 1 gota de Still<sup>®</sup> colírio (diclofenaco sódico, Allergan). O conteúdo colhido foi inserido em lâmina de vidro e realizado o esfregaço. 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 células glandulares. A contagem das células, em cada lâmina, foi realizada em 5 campos de grande aumento, utilizando a objetiva de 40x, através do microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão).

### **Análise histopatológica**

Para a análise histopatológica da conjuntiva, realizada no M0 e M6 do estudo, foi instilado 1 gota de colírio Anestalcon<sup>®</sup> (cloridrato de proximetacaína 5mg/ml - Alcon) em cada olho e realizados cortes, com auxílio de uma tesoura de conjuntiva (HR, São Paulo, Brasil) de 1,0 milímetro, aproximadamente, da conjuntiva palpebral inferior medial e colocado sobre fragmento de papel (1x1 cm). Em seguida, foi instilada 1 gota do colírio Still<sup>®</sup> (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, leucócitos polimorfonucleares e

mononucleares, e a técnica de PAS, foi utilizada para contagem das células caliciformes. A contagem das células, em cada lâmina, foi realizada em 5 campos de grande aumento utilizando a objetiva de 40x (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão) e para exame de microscopia de luz e 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 e TRFL, incluindo células caliciformes, linfócitos e neutrófilos. Com relação à variável TF, o teste não paramétrico de Friedman foi usado para comparar vários momentos 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**

No GPRPH, em relação à média inicial da contagem de plaquetas foi 249.154 (160.000 - 350.000/mm<sup>3</sup>) e após o processo de preparação, a média final foi de 1.124.192/mm<sup>3</sup> (459.000 - 1.771.000/mm<sup>3</sup>) plaquetas.

Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no TLS-1 (Figura 2a) e nos grupos GT e GCTM de M1 a M6, e no GPRPH somente nos momentos M1, M5 e M6. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos GT e GCTM em relação ao GPRPH de M1 a M6, e entre os grupos também houve diferença estatística entre o GCTM e os grupos GT e GPRPH, sendo o que GCTM apresentou valores maiores. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no TRFL (Figura 2b) do M1 ao M6 do GCTM. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os grupos GT e GPRPH de M1 a M6 com exceção do M4, onde o GPRPH apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ).

O número de aplicações dos grupos GCTM e GPRPH para melhorar os sinais da CCS, no GCTM (10 cães) foram 3 aplicações (20%/2 cão), 2 aplicações (50%/5 cães), e uma aplicação (30%/3

cães) e no GPRPH (10 cães) foram 3 aplicações (30%/3 cães), 2 aplicações (60%/6 cães), e uma aplicação (10%/1 cão). Com relação à reação adversa da aplicação das células-tronco mesenquimal, em ambos os grupos, do total de 20 cães, 1 animal do GPRPH (10%) teve reação adversa a aplicação e do GCTM não teve reação, já em relação ao GT por ser via tópica não foi feita a relação e comparação das aplicações.

Nos resultados das medianas do escores de avaliação dos sinais oculares (Tabela 1), apenas o GCTM apresentou melhora dos sinais clínicos e remissão total dos sinais no M3, já o GT e GPRPH apresentou melhora no M5. A pigmentação da córnea nos grupos GT e GPRPH apresentaram melhoras no M2, já o GCTM no M3, a neovascularização da córnea no GCTM houve remissão a partir o M1, enquanto que no GT e GPRPH foi no M5. A secreção no GCTM apresentou remissão total a partir do M1 enquanto que nos GT foi no M3 e GPRPH a remissão total da secreção foi no M5 em ambos os grupo foi um grau severo no M0. A hiperemia conjuntival apresentou remissão total no GCTM no M1, GT no M2 e o GPRPH teve uma melhora no M2 mas voltou a apresentar um grau leve no M4..

Os resultados observados do TF estão descritos na Figura 3, sendo que não houve mais marcação por fluoresceína no GCTM a partir do M4, no GT foi no M5 e o GPRPH no M6. Nos resultados do TF (Figura 3), todos os grupos apresentaram inicialmente olhos corados positivamente no M0, sendo que o GCTM foi o primeiro a não ter mais marcação.

No exame histopatológico da conjuntiva palpebral inferior. Observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos em relação ao M3 ao M6 em todos os grupos, sendo que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o GT e o GPRP nesses momentos, porém o grupo CTM essa redução foi mais acentuada quando comparada com GT e GPRP. Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número de células caliciformes em todos os grupos do M3 ao M6, não havendo diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre GT e GCTM nesses momentos, porém esse aumento foi menor com GPRP (Figura 4).

Na Figura 5 estão demonstrados os resultados observados em lâminas oriundas da citologia aspirativa da glândula da terceira pálpebra. Na Fig. 5a (GT), Fig. 5b (GCTM) e Fig. 5c (GPRPH) no M0, há um grande número linfócitos na submucosa da conjuntiva palpebral. Na Fig. 6d (GT), Fig. 6e (GCTM) e Fig. 6f (GPRPH) no M3, há um moderado número de linfócitos e raras células glandulares. Já no M6 na Fig. 6g (GT), Fig. 6h (GCTM) e Fig. 6i (GPRPH) são visualizadas um pequeno número de linfócitos e neutrófilos e raras células glandulares.

Na Fig. 6 estão demonstradas biopsias do estudo histopatológico da conjuntiva palpebral inferior, no momento inicial (M0) e 6 meses pós-tratamento (M6). As lâminas de biopsia (coradas com HE) a Fig. 7a (GT), Fig. 7b (GCTM) e Fig. 7c (GPRPH) no M0, apresenta um infiltrado inflamatório em mucosas. Na Fig. 7d (GT), Fig. 7e (GCTM) e Fig. 7f (GPRPH) apresentam ausência de infiltrado inflamatório no M6. Nas Fig. 7g, Fig. 7h e Fig. 7i as lâminas de biopsia (coradas com PAS), apresentam ausência de células caliciformes, com presença de infiltrado inflamatório em submucosa no M0; já nas Fig. 7j, Fig. 7k e Fig. 7l há a presença elevada de células caliciformes (M6).

Os três grupos apresentaram melhora clínica ao final da pesquisa no M6. Em ambos os grupos se observou a redução de secreção ocular, hiperemia conjuntival e a cicatrização de úlcera de córnea. No GCTM houve uma melhora importante na pigmentação da córnea no M6.

## DISCUSSÃO

O uso dos tratamentos injetáveis melhorou significativamente os sinais clínicos e quantidade e qualidade da lágrima, o que levando à redução dos processos inflamatórios e subsequente agressão tecidual à superfície ocular e às glândulas lacrimais, corroborando com o trabalho que comparou o uso de Tacrolimus tópico e o tratamento com o PRPH injetável em cães com ceratoconjuntivite seca [24].

A atividade biológica das CTM tem como função a capacidade de auto renovação, diferenciando em distintos tipos de células com capacidade de influenciar e estimular a ação celular de outros tecidos, tendo atividade parácrina devido a secreção de moléculas bioativas com propriedades antiapoptótica, angiogênica, antifibrótica, anti-inflamatória e imunomoduladora, que estimula e recrutam células tronco de outros tecidos, permitindo um efeito restaurador endógeno [11,25].

Em um estudo mostrou melhoras significantes, os sinais clínicos oculares foram observados em 44 olhos após tratamento com CTM tópica, desde o início até o final do tratamento com CTM, a ocorrência de secreção conjuntival, conjuntivite, neovascularização corneana e a pigmentação da córnea. No M0, 8 olhos foram positivos no FT, indicando a presença de úlceras de córnea, mas ao final do estudo, M6, todas foram negativas [20]. Corroborando com o nosso trabalho.

Para o uso ambulatorial do PRPH é necessário prática e sincronização entre o tempo de preparo e a aplicação, pois o hemoderivado deve ser aplicado instantaneamente. Os métodos de aplicação adjacentes aos olhos podem causar desconforto local momentâneo ao paciente, mesmo quando se utiliza colírio anestésico. Portanto, as aplicações foram realizadas com intervalo de 30 dias [26].

No nosso estudo, apenas um animal teve reação de hipersensibilidade local causada pela aplicação do PRPH, apresentando hiperemia, edema e quemose, que foi rapidamente tratado com compressas de gelo durante 15 minutos e os sinais de hipersensibilidade controlados. Fontes de PRP homólogas e heterólogas podem causar reações adversas devido a diferenças imunogênicas entre organismos individuais [27]. As reações adversas com o uso de PRP autólogo, podem ocorrer também por causa da substância adicionada na preparação [28]. O teste de compatibilidade sanguínea não identifica a incompatibilidade do receptor para terapia com PRP de fonte homóloga ou heteróloga, pois identifica apenas se há presença de anticorpos contra as hemácias do doador [29].

Os efeitos adversos relatados sobre o uso tópico de tacrolimus incluem irritação ocular, ardor, vermelhidão e sensação de queimação, que podem ser apenas sinais transitórios. Isso foi observado em nosso estudo, no qual um cão apresentou reação adversa ao medicamento apresentando hiperemia, edema e quemose, que foi prontamente tratado e retirado do estudo. Esses sinais, irritação ocular, ardor e coceira imediatamente após o uso do colírio de tacrolimus 0,03% estão de acordo com relatos da literatura [25, 30].

O método de aplicação subconjuntival é uma via eficaz para substituir a instilação diária de colírios [31]. A aplicação de PRP autólogo por esta via em cães com CCS moderada também foi

estudado, que utilizaram aplicações semanais apenas para conjuntiva da pálpebra inferior [30]. Os espaços subconjuntivais inferior e superior também foram utilizados neste estudo para estimular as glândulas meibomianas e as células calciformes, responsáveis pela produção de lipídios lacrimais e mucina, respectivamente [32]. Além disso, a escolha da aplicação na conjuntiva da pálpebra superior baseou-se na sua proximidade com a glândula perilacrimal.

No processo de obtenção do PRPH, a concentração média de plaquetas obtida no presente estudo ficou acima de um milhão de plaquetas, o que está de acordo com um estudo que a contagem de plaquetas deveria ser, em média, cinco vezes maior que a contagem de plaquetas sanguíneas basais. Isto é necessário para garantir a eficácia do PRP [26, 33].

Houve melhora nos sinais clínicos observados na superfície ocular em todos os grupos, como diminuição da hiperemia, secreção conjuntival, opacidade e pigmentação da córnea. No geral, o GCTM exibiu remissão dos sinais mais precocemente do que os GT e GPRPH. Alguns sinais clínicos do grupo tratado com tacrolimus apresentaram melhora precoce, enquanto outros estabilizaram apenas em M5. Em um estudo observaram a remissão completa de todos os sinais clínicos após dois meses de tratamento com tacrolimus [34], já nosso estudo foi com 3 meses no GCTM. Os sinais clínicos de pigmentação e hiperemia foram os primeiros a melhorar. Em outro estudo relataram a melhora da neovascularização e opacificação apenas 15 dias após o início do tratamento [7], o que em nosso estudo ocorreu após 2 meses de tratamento.

O GT normalizou a produção lacrimal no TLS ( $\geq 15$  mm/min) após o primeiro mês de tratamento e permaneceu superior ao GPRPH durante todo o estudo, já em relação ao GCTM ele ficou abaixo no M2 e após voltou a ficar acima em todos os momentos [35,36,37]. O uso de tacrolimus 0,03% no presente estudo apresentou resultado inferior aos observados, porém, o uso de imunossuppressores nos estudos citados acima também não atingiu os parâmetros de normalidade [35,36]. Porém no nosso estudo todos os grupos obtiveram uma melhora da qualidade da lágrima, que pode estar de acordo com a melhoras dos sinais clínicos e resolução mais precoce das úlceras de córnea [7,10,12].

Houve diminuição considerável no número total de células inflamatórias em todos os grupos, devido aos efeitos imunomoduladores dos agentes estudados, isso ocorre pela natureza crônica e progressiva da etiopatogenia da CCS, onde o objetivo do tratamento é reduzir a inflamação e melhorar dos sinais clínicos da doença.

Estanho et al. [24] comparou em seu estudo o uso do tratamento convencional com o imunossupressor Tacrolimus 0,03% comparado ao uso de PRPH injetável no tratamento da ceratoconjuntivite seca mostrou diminuição significativa de neutrófilos e linfócitos em ambos os grupos, mas sem diferença estatística entre os grupos; no momento final (M6) a contagem de neutrófilos no GT foi menor do que no GPRPH devido ao potencial imunossupressor do tacrolimus que atua na inibição da calcineurina e ativação de linfócitos T, reduzindo o processo inflamatório. Já em nosso trabalho houve a diminuição de neutrófilos em relação ao M3 ao M6 em todos os grupos, sendo que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o GT e o GPRP nesses momentos, porém no GCTM essa redução foi mais acentuada quando comparada com GT e GPRPH.

Sgrignolli et al [20] em seu estudo utilizou as células tronco mesenquimal, por via tópica, e obteve diminuição significativa de neutrófilos e linfócitos e aumento na contagem de células calciformes o que corrobora com o grupo que utilizou as células-tronco mesenquimal injetável onde houve uma diminuição significativa da inflamação e aumento da contagem das células calciformes o que confirma as funções autócrina e parácrina das células tronco [21 e 27].

Em nosso estudo a análise das células inflamatórias mostrou diminuição do processo inflamatório em todos os grupos, o que está de acordo com trabalhos que compararam o tratamento convencional com o uso de medicina regenerativa [26, 28 e 34].

Os três grupos de tratamento da CCS em cães foram eficazes na melhoria dos sinais clínicos e cicatrização das úlceras de córnea. Em relação à quantidade de lágrima a eficácia foi melhor o GT e GCTM e o desempenho foi menor do GPRPH. Em relação à qualidade da lágrima a eficácia melhor foi do GCTM e o desempenho foi inferior em GT e GPRPH. O estudo mostrou que os tratamentos

com o uso de medicina regenerativa, CTM e PRPH, com aplicações injetáveis mensais variaram de 1 a 3 aplicações para normalização dos sinais clínicos.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que o tratamento com medicina regenerativa celular, com CTM e PRPH injetável com aplicação mensal, é eficaz, sendo que a CTM tem eficácia superior ao PPRPH. Ambas as terapias regenerativas promovem diminuição da inflamação, melhora na quantidade e qualidade da lágrima, como ocorre no tratamento convencional com tacrolimus tópico diário, podendo ser uma alternativa viável no tratamento da CCS em cães que não possam fazer o tratamento tradicional com imunossupressor tópico diário contínuo.

**Agradecimentos** – O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001. Ao apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

**Fundos** – Os autores agradecem aos laboratórios Avert Saúde Animal, Labyes, Centro Paulista e Regenera Biotecnologia, pelo fornecimento dos materiais utilizados neste estudo.

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

## **Referências**

- 1 Pinheiro Jr MN, Santos PM, Santos RCR, Barros JN, Passos LF, Neto JC. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjögren. *Arq Bras Oftalmol.* 2007 Aug;70(4):649-655.
- 2 Herrera D. *Oftalmologia clínica em animais de companhia.* 1ª ed. São Paulo: Med.vet. Livros; 2008. p. 117-122.
- 3 Ribeiro AP, Brito FLC, Martins BC, Mamedel F, Laus JL. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. *Cienc Rural.* 2008;38(2):568-575.
- 4 Gelatt KN. *Oftalmologia felina.* In: *Manual de Oftalmologia Veterinária.* São Paulo: Manole; 2003. p. 901-905.

- 5 Pigatto JAT, Pereira FQ, Almeida ACVR, Redaeli R, Faganello CS, Franzen AA. Ceratoconjuntivite seca em cães e gatos. *Acta Sci Vet.* 2007;35(2):250-251.
- 6 Nell B, Walde I, Billich A, Vit P, Meingassner JG. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study. *Vet Ophthalmol.* 2005 Jan;8(1):39-46.
- 7 Berdolay YA, English RV, Naldelstein B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol.* 2005;8(4):225-232.
- 8 Saito A, Watanabe Y, Kotani T. Morphologic changes of the anterior corneal epithelium caused by third eyelid removal in dogs. *Vet Ophthalmol.* 2004;7(2):113-119.
- 9 Izei C, Celik I, Alkan F, et al. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Am J Vet Res.* 2002;63(5):688-694.
- 10 Andrade SF. Terapêutica Oftálmica. In: Andrade SF, ed. *Manual de Terapêutica Veterinária.* 3ª ed. São Paulo: Roca; 2008. p. 179-189.
- 11 Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213:341-347.
- 12 Alio JL, Arnalich FM, Rodriguez AE. The role of “Eye Platelet Rich Plasma” (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1257-65.
- 13 Voga M, Neza A, Vengust M, Majdic G. Stem cell in veterinary medicine - current state and treatment options. *Front Vet Sci.* 2020;7:278.
- 14 Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(47):14452-14459.
- 15 Villatoro AJ, et al. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int.* ;2015:1-10.
- 16 Siqueira RC. Terapia celular nas doenças oftalmológicas. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31:120-127.
- 17 Fonseca SA. Efeitos clínicos e histopatológicos da aplicação autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e de cães. [Master's thesis]. Brasília, DF: Universidade de Brasília; 2011.

- 18 Beyazyldiz E, et al. Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells Int.* 2014;1-9.
- 19 Lee MJ. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Mol Ther.* 2015;23(1):139-146.
- 20 Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, Sgrignoli DAM, Nai GA, da Silva MG, et al. Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$  in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* 2019;39:101525.
- 21 Plandolit SL, Morales MC, Freire V, Grau AE, Durán JA. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea.* 2011;30(12):1312-1317.
- 22 Mora JS, Waite C, Gilbert CE, Breidenstein B, Sloper JJ. *British Journal of Ophthalmology.* 2018;102(1):9-13.
- 23 Cheatham CL, et al. n-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6):1458S-66S.
- 24 Merlini NB, Fonzar JF, Perches CS, Sereno MG, Souza VL, Estanislau CA, et al. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2014;66(6):1742-1750.
- 25 Estanho GJG, Passareli JVG, Pando LDS, Vieira DE, Nai GA, Santarém CL, et al. Comparison of topical 0.03% tacrolimus and homologous injectable platelet-rich plasma in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Vet World.* 2023:134-143.
- 26 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
- 27 Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, Sgrignoli DAM, Nai GA, da Silva MG, et al. Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$  in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* 2019;39:101525.
- 28 Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-228.
- 29 Marx RE, Garg AK. Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. *Br Dent J.* 2005;199(12):799.

- 30 Shoughy SS. Topical tacrolimus in anterior segment inflammatory disorders. *Eye Vis.* 2017;4(7).
- 31 Gomes SGR. Hemocomponentes e principais aplicações na terapia intensiva veterinária. In: Santos MM, Fragata FS, editors. *Emergência e terapia intensiva veterinária em pequenos animais*. 1ª edição. São Paulo: Roca; 2008. p. 91-207.
- 32 Tanidir ST, Yuksel N, Altintas O, Yildiz DK, Sener E, Caglar Y. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea.* 2010;29(6):664-669.
- 33 Vatnikov YA, Erin IS, Suleimanov SM, Kulikov EV, Seleznev SB, Lutsay VI, et al. Effect of Autologous Plasma Treatment on the Cornea Regeneration with Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs. *J Anim Health Prod.* 2020;8(1):1-7.
- 34 Cherry RL, Smith JD, Ben-Shlomo G. Canine oral mucosa evaluation as a potential autograft tissue for the treatment of unresponsive keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol.* 2017;21(1):48-51.
- 35 Fadadu PP, Mazzola AJ, Hunter CW, Davis TT. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. *Reg Anesth Pain Med.* 2019;44:652-659.
- 36 36. 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.
- 37 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.

Tabela 1. Mediana do escores de avaliação\* dos sinais clínicos dos grupos de tratamento GT, GCTM e GPRPH.

Sinais Clínicos	Grupos	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Pigmentação da córnea	GT	1	1	0	0	0	0	0
	GCTM	1	1	1	0	0	0	0
	GPRPH	1	1	0	0	0	0	0
Neovascularização da córnea	GT	1	1	1	1	1	0	0
	GCTM	1	0	0	0	0	0	0
	GPRPH	1	1	1	1	1	0	0
Secreção	GT	3	1	1	0	0	0	0
	GCTM	1	0	0	0	0	0	0
	GPRPH	3	1	1	1	1	0	0
Hiperemia conjuntival	GT	2	1	0	0	0	0	0
	GCTM	1	0	0	0	0	0	0
	GPRPH	2	1	0	0	1	0	0

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

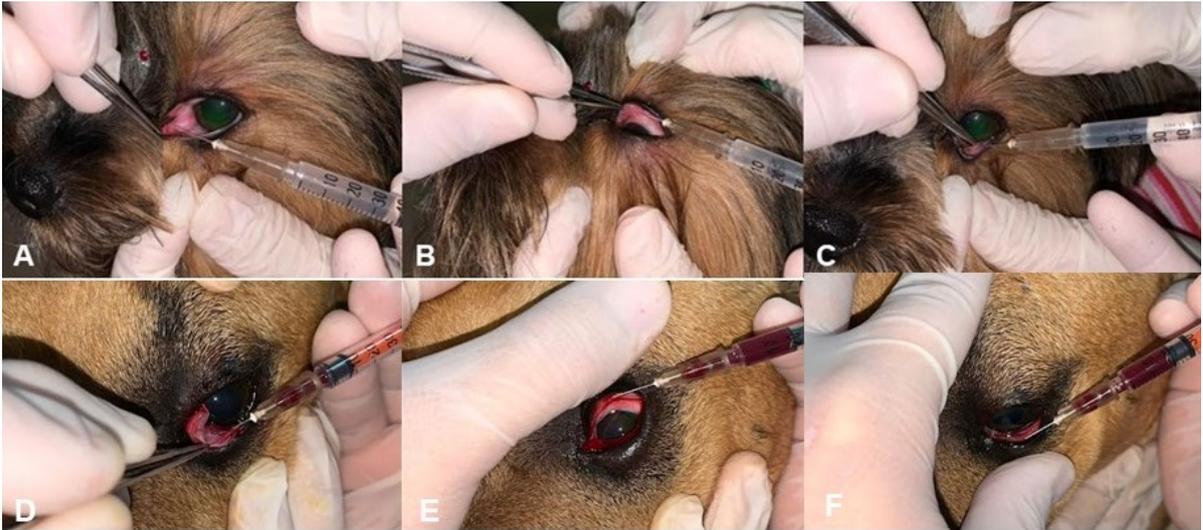


Figura 1. Pontos de aplicações do CTM e PRPH. A – Glândula da terceira pálpebra, B – Conjuntiva palpebral superior, C – Conjuntiva palpebral inferior, D – Glândula da terceira pálpebra, E – Conjuntiva palpebral superior e F – Conjuntiva palpebral inferior.

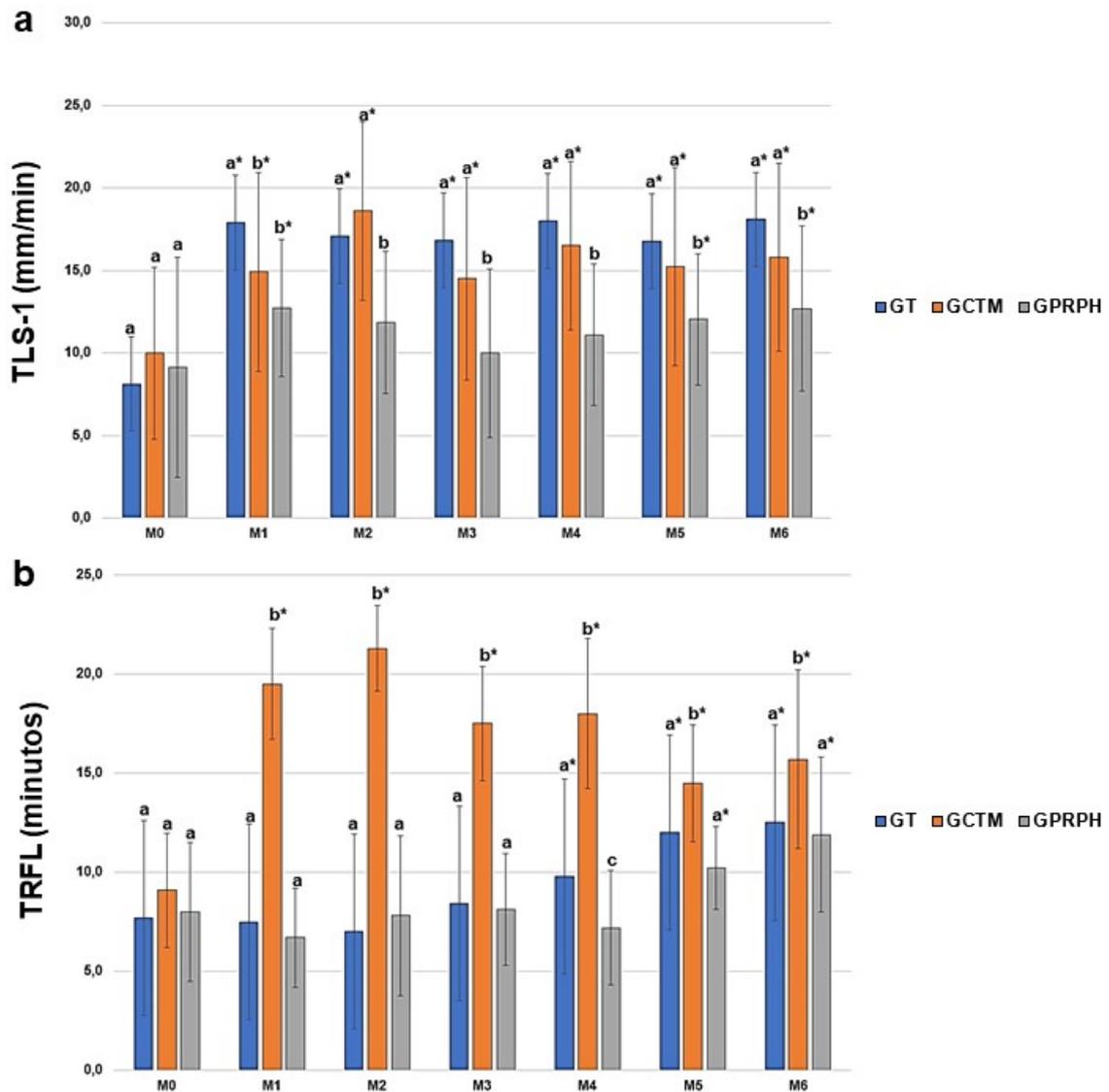


Figura 2. Média e desvio padrão dos testes oculares: (A) teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1) em mm/min, (B) teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos dos grupos Tacrolimus 0,03% (GT) Células tronco Mesenquimal (GCTM) e do grupo Plasma Rico em Plaquetas Homologo (GPRPH) nos momentos inicial (M0), e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).

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

<sup>a,b</sup>  $p < 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis para comparar grupos)

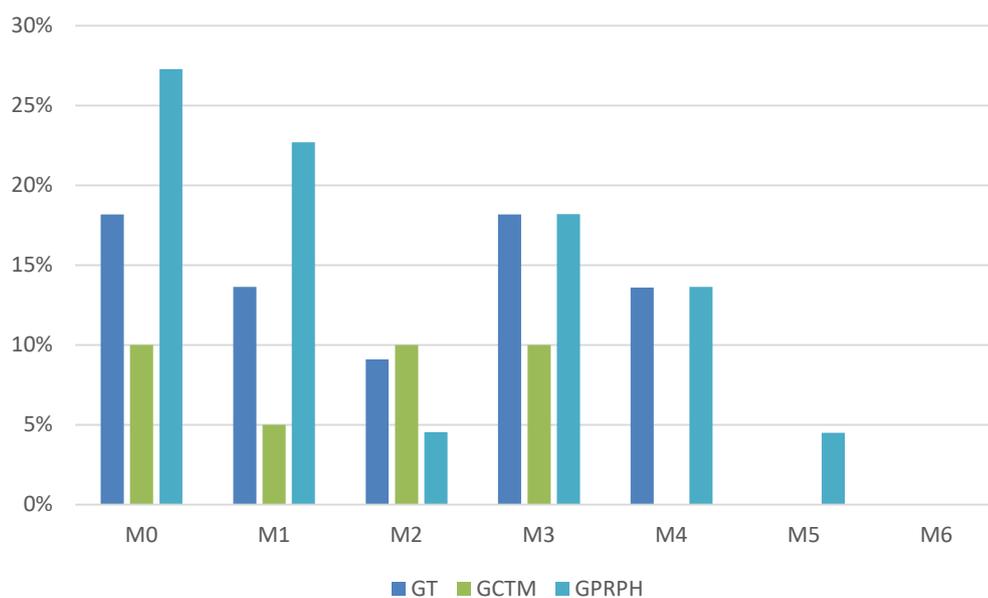


Figura 3. Percentual de cães com CCS (n=30) nos grupos Tacrolimus (GT), Células tronco Mesenquimal (GCTM) e Plasma Rico em Plaquetas Homologo (GPRPH) que tiveram os olhos corados no teste de fluoresceína (TF) nos momentos M0 a M6.

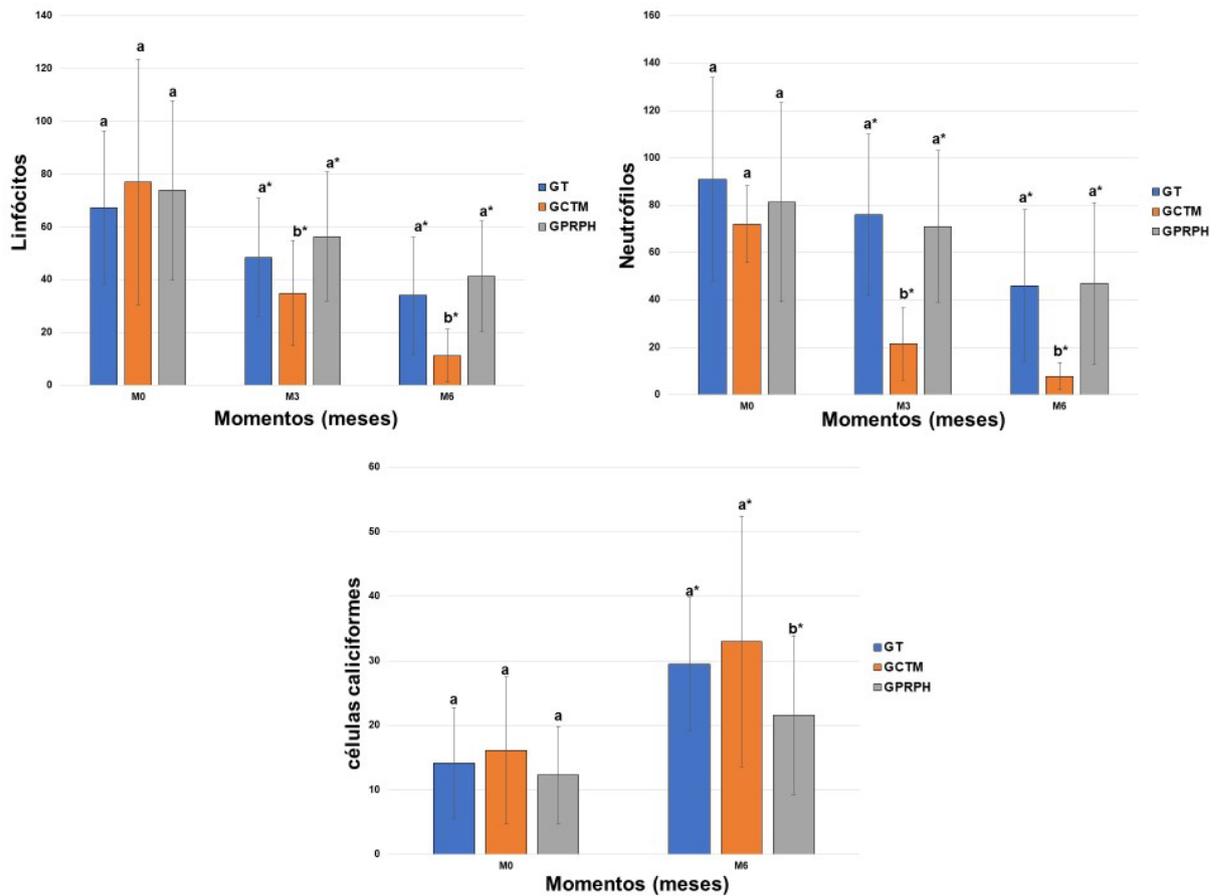
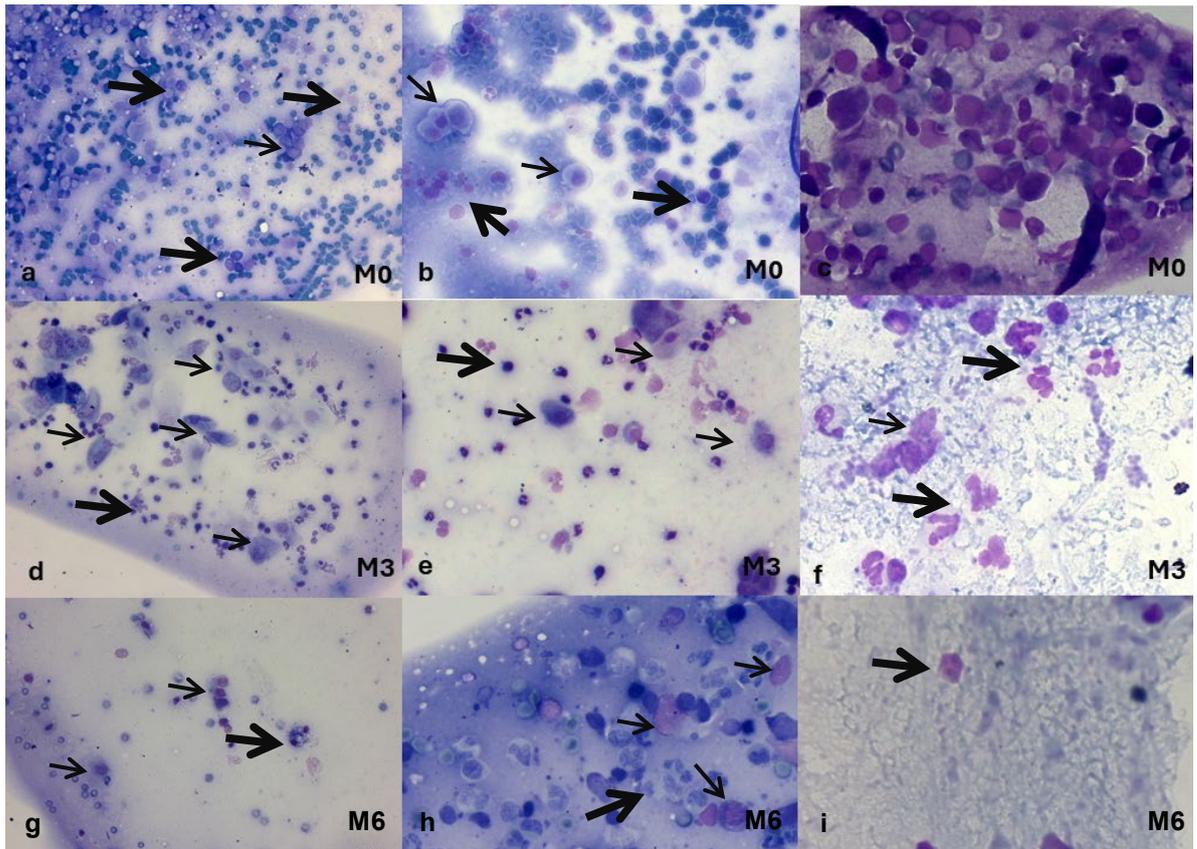


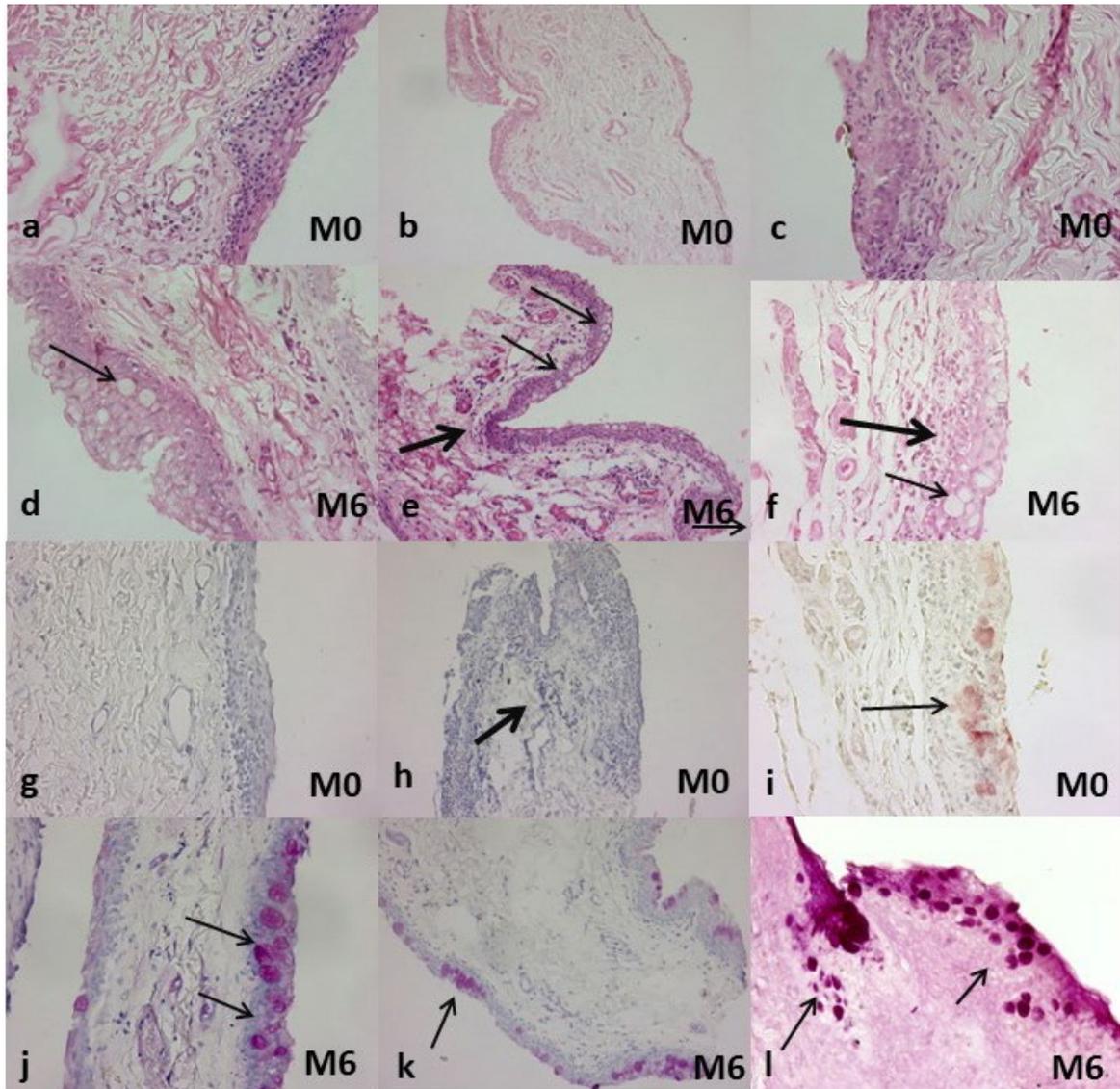
Figura 4. Média e desvio padrão da contagem de (A) linfócitos, (B) neutrófilos e (C) células calcificornes, no exame histopatológico da conjuntiva bulbar inferior, realizado nos momentos M0 (início) e M6 (6 meses).

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

<sup>a,b</sup>  $p < 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis para comparar grupos)



**Figura 5.** Fotomicroscopia da citologia aspirativa da glândula da 3ª pálpebra: a) Grupo Tacrolimus: pequeno número de neutrófilos e moderado número de linfócitos. b) Grupo Células tronco: pequeno número de neutrófilos e moderado número de linfócitos. c) Grupo PRPH: grande número de linfócitos. d) Grupo Tacrolimus: grande número de neutrófilos e pequeno número de linfócitos. e) Grupo Células tronco: moderado número de neutrófilos e pequeno número de linfócitos. f) M3 PRPH: pequeno número linfócitos e pequeno número de neutrófilos. g) Grupo Tacrolimus: pequeno número de neutrófilos e raros linfócitos. h) Grupo Células tronco: moderado número de neutrófilos e pequeno número de linfócitos. i) Grupo PRPH: raros linfócitos. Coloração de Giemsa, aumento de 100x. setas grossas: linfócito.



**Figura 6.** Fotomicroscopia da biópsia de conjuntiva: a) Grupo Tacrolimus: ausência de células caliciformes. b) Grupo Células tronco: ausência de células caliciformes. c) Grupo PRPH: ausência de células caliciformes. d) Grupo Tacrolimus: pequeno número de células caliciformes. e) Grupo Células tronco: grande número de células caliciformes. f) Grupo PRPH: pequeno número de células caliciformes. g) Grupo Tacrolimus: ausência de células caliciformes. h) Grupo Células tronco ausência de células caliciformes e moderado número de linfócitos. i) Grupo PRPH: pequeno número de células caliciformes. j) Grupo Tacrolimus: grande número de células caliciformes. k) Grupo Células tronco: grande número de células caliciformes. l) Grupo PRPH: grande número de células caliciformes. A, B, C, D, E e F: Hematoxilina-eosina, aumento de 100x; G, H, I e J: Coloração de PAS, aumento de 100x.

## 2 ARTIGO 2 (REVISTA VETERINARY WORLD)

### Uso de células tronco mesenquimal injetável associado ou não com ômega 3 oral no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães

#### Resumo

**Introdução e Objetivo:** A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença inflamatória crônica que afeta tanto a produção quanto a qualidade do filme lacrimal, causando danos à superfície ocular, conjuntiva e glândulas lacrimais, podendo levar à cegueira. A célula tronco mesenquimal (CTM) é uma terapia celular regenerativa com ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras, assim como o ômega 3 ( $\omega$ -3) que é um ácido graxo essencial que também possui ação anti-inflamatória e imunomoduladora natural. O objetivo do estudo foi comparar o tratamento da CCS em cães com aplicações injetáveis de CTM, suplementado ou não com  $\omega$ -3 oral e verificar qual tratamento apresentou maior eficácia.

**Materiais e Métodos:** Foram avaliados 20 cães com CCS bilateral (40 olhos), divididos em 2 grupos de tratamento com 20 olhos cada: Grupo Células-tronco Mesenquimal (GCTM) e Grupo Células-tronco Mesenquimal + Ômega 3 (GCTMO). Os animais foram avaliados os sinais clínicos por meio do Teste Lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), Teste de Fluoresceína (TF). E análise citológica da glândula da terceira pálpebra e histopatológica mucosa palpebral.

**Resultados:** Em ambos os grupos de tratamento, os sinais oculares apresentaram melhora até o final do estudo, assim como a resolução das úlceras de córneas. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no TLS-1 e TRFL em ambos os grupos de M0 a M6, sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos no TLS-1, mas no TRFL houve aumento mais significativo ( $p < 0,05$ ) no GCTMO comparado ao GCTM. Na citologia aspirativa mostrou que ocorreu diminuição do processo inflamatório do M0 para M6 sendo no grupo suplementado com ômega3 a melhora foi mais precoce e maior, já na biopsio observou que ambos os grupos mostraram um aumento das células caliciformes no M6 em relação ao M0 e no grupo que recebeu o  $\omega$ -3 a melhora foi mais significante.

**Conclusão:** Conclui-se que ambos os grupos de tratamento da CCS em cães foram eficazes na melhora dos sinais clínicos, na porção quantitativa e qualitativa da lágrima e na resolução das úlceras

de córnea. Porém, o GCTMO foi mais eficaz na melhora da qualidade da lágrima em relação ao GCTM, o que mostra a importância da associação da suplementação oral de ômega 3 para potencializar a ação anti-inflamatória e imunomoduladora da terapia celular regenerativa com CTM injetável no tratamento da CCS em cães.

**Palavras-chave:** cães, síndrome do olho seco, ácido graxo, células, ômega 3.

## 1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma oftalmopatia que afeta principalmente cães e humanos, de caráter inflamatório crônico das glândulas lacrimais leva ao desequilíbrio do filme lacrimal, ocorrendo a deficiência de produção da porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa) e/ou pela evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa) devido produção inadequada da camada lipídica, sendo em cães é imunomediada com maior incidência [1].

Desencadeada por uma infiltração de células T, ocorre a liberação de citocinas inflamatórias e conseqüentemente a inflamação da glândula lacrimal. O resultando na instabilidade do filme lacrimal, hiperosmolaridade da lágrima e diminuição na quantidade de lágrima produzida [2]. O tratamento convencional é baseado em uma combinação de fármacos de uso tópico, sendo utilizados lágrimas artificiais e inibidores da calcineurina que possuem efeitos lacrimoestimulatório e imunomoduladores, como a ciclosporina A e Tacrolimus [3,4]. Essas drogas atuam restaurando a saúde da córnea interferindo na transcrição de interleucinas-2 e reduzindo a inflamação [3,5].

Algumas tecnologias estão sendo estudadas na medicina humana como alternativa de tratamento para CCS e é comum o uso da forma injetável de drogas no tratamento de doenças crônicas, estimulando a proliferação celular e assim a regeneração tecidual [6,7]. O uso de células tronco (CT) no tratamento de doenças oculares degenerativas [8,9,10,11,12]. Sendo extraídas de tecido adiposo, mucosa oral, conjuntiva, cérebro, retina, células embrionárias, epitélio ciliar, olhos de recém-nascido, cordão umbilical [13,14] e principalmente provenientes da medula óssea [9,10,11,14,15].

As células tronco mononucleares são classificadas como multipotenciais, hematopoiéticas e/ou pluripotentes sendo as células tronco mesenquimais (CTM) [9]. Se diferenciando em vários tipos

de células como osteogênicas, adipogênicas, condrogênicas, miogênicas e muitas outras células secretoras [9, 10]. Sua utilização é viável devido ao fato de poder cultivar e isolar essas células tronco e mantendo sua potencialidade [10, 11,15].

A utilização dessas células tronco em doenças imunomediadas é devido a sua capacidade regenerativa que restaura os tecidos destruídos pela ação dos autoanticorpos e por sua ação imunomoduladora causado pela liberação de moléculas bioativas. Essas moléculas são imunossupressoras, especialmente para linfócitos T helper CD4, linfócitos B, inibindo assim a liberação de interleucinas como a IL-6 presentes na ceratoconjuntivite seca (CCS) [11, 16], além de estimular a angiogênese e a mitose celular, inibir a apoptose e a liberação de mediadores pró inflamatórios [17].

Um estudo mostrou que o uso de CTM tópicas no saco conjuntival é uma terapia com bons resultados, como melhora nos sinais clínicos e melhora quantitativa e qualitativa da lágrima em 68,2% de cães com CCS, além do aumento das células caliciformes e redução na inflamação causada pela ceratoconjuntivite seca. Porém, 6 meses após o início do tratamento com CTM tópico 1x/semana durante 1 mês, houve retorno da secreção ocular e conjuntivite em 31,8% dos cães, que posteriormente foram direcionados ao tratamento convencional com 0,03% de uso tópico tacrolimus e lubrificante ocular [13].

O óleo de peixe (OP) é uma fonte importante de  $\omega$ -3, além de possuir elementos essenciais tais como selênio, iodo e vitaminas A, B, D e E. É obtido de peixes de água fria (ex: salmão, atum e arenque [18]; o  $\omega$ -3 apresenta como vantagem possuir o ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) pré-formados. O EPA tem um importante papel anti-inflamatório, enquanto o DHA tem importante função no funcionamento e desenvolvimento da retina e cérebro. Além do EPA e DHA, o  $\omega$ -3 é precursor de mediadores lipídicos como resolvinas e protectinas, que possuem ação anti-inflamatória e imunomoduladora [19].

Estudos [20, 21, 22] mostraram bons resultados no controle do olho seco com a utilização de ácido s graxos essenciais (AGE),  $\omega$ -3 e ômega-6 ( $\omega$ -6), devido à sua capacidade de produzir

mediadores anti-inflamatórios. O uso dos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, por via oral, demonstrou ser uma terapêutica alternativa para portadores das variadas formas de deficiência lacrimal como em pacientes com síndrome de Sjögren, ou em pacientes com CCS [23,24].

Os principais AGP da família  $\omega$ -3 são os ácidos  $\alpha$ -linolênico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), sendo o EPA e DHA os principais AGPs  $\omega$ -3 que apresentam efeitos terapêuticos em cães, gatos e seres humanos. O ALA é precursor do EPA e DHA. As enzimas  $\Delta$ -6-desaturase, elongase e  $\Delta$ -5-desaturase são responsáveis pela conversão do ALA em EPA e a elongase e  $\Delta$ -4-desaturase pela conversão do EPA em DHA [25]. Os cães e os humanos podem converter o ALA em DHA, mas a taxa de conversão é baixa (<10%), portanto, a ingestão de EPA e DHA é necessária para se atingir concentrações adequadas de AGPs  $\omega$ -3 [26].

Este é o primeiro estudo que compara o uso do injetável à nível ambulatorial de cães diagnosticados com CCS, com o CTM injetável associado à suplementação oral de  $\omega$ -3, no intuito de melhorar ou potencializar a terapia celular regenerativa.

O objetivo deste projeto foi comparar o tratamento com o uso de células tronco mesenquimais heterólogas injetável, suplementado ou não com ômega 3 oral, no tratamento da CCS em cães.

## **Materiais e Métodos**

### **Aprovação ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Comissão de Uso Animal (CEUA) (Anexo 2) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE - Protocolo nº 6484) e conduzido conforme as normas do CEUA e da Association for Research in Vision and Ophthalmology – Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research (ARVO).

### **Período de Estudo e Local**

O estudo foi realizado de fevereiro de 2021 a outubro de 2023 toda a pesquisa foi realizada no Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE em Presidente Prudente – SP.

O estudo avaliou 20 cães (40 olhos), diagnosticados com CCS não houve predileção racial, de idade ou de sexo que foram atendidos e avaliados no período de seis meses no setor de oftalmologia do HV da Unoeste. A participação dos animais no estudo foi autorizada através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por seus respectivos proprietários e responsáveis pelo projeto. Os animais foram incluídos no experimento com base na observação de sinais clínicos oftálmicos utilizando uma lâmpada de fenda (Kowa SL-15, Japão), que incluíram avaliação de secreção ocular, conjuntivite, opacidade corneana e pigmentação, bem como  $TLS \leq 15$  mm/min e/ou  $TRFL \leq 20$  segundos. Os critérios de exclusão de animais foram definidos com  $TLS \leq 5$  mm/min, comportamento agressivo ou hiperatividade, patologia pré-existente, presença ou histórico de tumores.

## Grupos

Os cães foram separados aleatoriamente em 2 grupos com 10 animais cada:

Grupo CTM (20 olhos positivos CCS): 10 cães (5 machos e 5 fêmeas), idade de  $8,5 \pm 2,1$  ( $5,0 - 11,0$ ) anos, pesando  $7,5 \pm 1,4$  ( $5,2 - 9,8$ ) kg, cinco Shih Tzu, dois York Shire, um Pug, um sem raça definida e um Bulldog inglês. Os animais receberam a aplicação das células tronco mesenquimais em ambos os olhos, onde foi injetado 0,3 ml de célula tronco mesenquimal ( $1 \times 10^6$ ) com agulha calibre 25 mm  $\times$  7 mm (Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil), 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, sendo uma única aplicação a cada 30 dias, durante três meses. Fizeram o uso de Tears<sup>®</sup> colírio (Labyes, São Paulo, Brasil), 1 gota, 2x/dia, tópico, em ambos os olhos, durante 6 meses. Todas as CTM foram testadas para confirmar a sua capacidade para se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e linhagens de indução adequada sob condições de meio. Foram avaliadas para a expressão do CD44, CD73, CD90 e CD29 e a ausência do marcador hematopoiético CD45, através do ensaio de citometria de fluxo. As células também foram avaliadas quanto à presença de agentes patogênicos e contaminantes (por exemplo, bactérias, fungos, vírus, micoplasma e endotoxina). As CTM foram fornecidas em frascos criotubos pela Regenera<sup>®</sup> (Campinas-SP), com doses unitárias ( $2 \times 10^6$  CTM) por animal juntamente com um Kit de Descongelamento, composto por solução de

descongelamento, solução de lavagem 1 e 2 e as 4 pipetas Pasteur que serão necessárias no procedimento de preparo das CTM. O transporte foi realizado em caixa de isopor térmico contendo gelo seco. Ao chegar ao Hospital Veterinário, os frascos foram acondicionados em botijão de nitrogênio líquido (-180°C).

Grupo CTMO (20 olhos positivos CCS): 10 cães (quatro machos e seis fêmeas), idade de  $9,7 \pm 2,1$  (5,0 – 12,0) anos, pesando  $7,1 \pm 1,4$  (3,6 – 12,5) kg, quatro Shih Tzu, dois York Shire, dois Lhasa Apso, um sem raça definida e um Pequines. Os animais receberam as células tronco mesenquimais em ambos os olhos, onde foi feita a aplicação injetável de 0,3 ml de célula tronco mesenquimal ( $1 \times 10^6$ ) com agulha calibre 25 mm  $\times$  7 mm (Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil), 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, sendo uma única aplicação a cada 30 dias, durante 3 meses, e Tears<sup>®</sup> colírio (Labyes, São Paulo, Brasil), 1 gota, 2x/dia, tópico, em ambos os olhos, durante 6 meses, e administração oral de ômega 3 (Ograx<sup>®</sup>-3 500/Laboratório Avert, 1 cápsula de 500 mg/7kg/dia ou Ograx<sup>®</sup>-3 1000/Laboratório Avert, 1 cápsula de 1000 mg/14kg/dia), durante 6 meses.

Quando detectada a presença de infecção secundária e/ou inflamação ocular (conjuntivite e/ou ceratite) foi utilizado colírio antibiótico a base de ciprofloxacina (Ciprovet<sup>®</sup> - Labyes) (1 gota 4x/dia), e em caso de inflamação ocular colírio anti-inflamatório a base de diclofenaco de sódio (Still colírio<sup>®</sup> - Allergan) (1 gota 3x/dia) durante 15 dias.

### **Processamento da CTM**

O criotubo contendo a CTM foi fornecido pela Regenera<sup>®</sup> (Campinas-SP) e armazenado em botijão de nitrogênio a -196°C. O preparo foi conforme o protocolo da Regenera<sup>®</sup>, o criotubo foi descongelado por 2 minutos em banho-maria a 37°C. Após, transferido imediatamente o conteúdo do criotubo para a solução de descongelamento centrifugado em baixa rotação (1100 rpm; força centrífuga relativa (FCR) = 216g) (Centrifuga Marca Fanem, Modelo 206BL) durante 5 minutos. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e adicionado à solução de lavagem 1. Foi homogeneizado delicadamente até que o precipitado se dissolvesse. Centrifugou novamente a 216g,

1100 RPM durante 5 minutos. Após a centrifugação, desprezou o sobrenadante e adicionou à solução de lavagem 2. Homogeneizou delicadamente até que o precipitado se dissolva. Centrifugou novamente a 216g, 1100 RPM durante 5 minutos. Desprezou o sobrenadante e adicionou 600µl de soro fisiológico para aplicação. Homogeneizou delicadamente com a pipeta de Pasteur até que o precipitado se dissolvesse. As células não podem permanecer mais de 10 minutos na solução fisiológica, pois após este tempo elas ficam enviáveis para uso, então a aplicação era imediata após o término do preparo.

### **Avaliação dos sinais clínicos**

As avaliações dos sinais oftálmicos foram realizadas mensalmente durante 6 meses de tratamento, começando no momento do diagnóstico da CCS (M0) até o final do tratamento (M6). Cada animal foi avaliado auxílio da lâmpada de fenda portátil (SL-15, Kowa, Japão) e os resultados foram registrados em uma ficha específica. Os parâmetros avaliados incluíram pigmentação e neovascularização da córnea, presença de secreção ocular, hiperemia conjuntival e úlcera de córnea. Os escores adotados para a avaliação foram: (0) sem alteração; (1) leve; (2) moderado e (3) severo.

### **Testes oftálmicos**

Teste Lacrimal de Schirmer-1 TLS-1, realizado sem anestésico, realizou a limpeza ocular utilizando um algodão seco para remover qualquer sujidade local e depois introduziu no saco conjuntival medial 0,5 cm da ponta do papel filtro (Teste de Schirmer<sup>®</sup>, 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 [5].

Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), instilou 1 gota de fluoresceína 1% colírio (Fludiat<sup>®</sup>, Oftalmopharma) 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, com observação de pequenas manchas. Foram

efetuadas duas repetições e a média calculada através desses resultados. Valores de TRFL  $\leq$  20 segundos foram considerados positivos para CCS [5].

Teste de Fluoresceína (TF) utilizando um corante vital a base de fluoresceína sódica que marca o estroma da córnea. Foi instilado 1 gota do colírio de fluoresceína 1% (Fludiat<sup>®</sup> (Oftalmopharma<sup>®</sup>)) sobre a córnea do animal. Após a instilação, 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.

### **Análises citológica**

Amostras foram coletadas para análise das células da glândula da terceira pálpebra, nos momentos M0, M3 e M6, através da técnica de aspiração por agulha fina calibre 0,45x13 e seringa 3ml. Para a coleta, foi instilado 1 gota de colírio Anestalcon<sup>®</sup> (cloridrato de proximetacaína 5mg/ml - Alcon) para o GCTM e GCTMO, para a dessensibilização na glândula do olho coletado. Com a exposição da glândula da terceira pálpebra com auxílio de uma pinça oftálmica, foram coletadas as amostras destas glândulas, após foi instilado 1 gota de Still<sup>®</sup> colírio (diclofenaco sódico, Allergan). O conteúdo colhido foi inserido em lâmina de vidro e realizado o esfregaço. Para a fixação das amostras foi utilizado metanol e a coloração pela técnica de MGG (May-Grunwald-Giemsa). Foram avaliados a quantidade de neutrófiloslinfócitos. A contagem das células, em cada lâmina, foi realizada em 5 campos de grande aumento, utilizando a objetiva de 40x, através do microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão).

### **Análise histopatológica**

Para a análise histopatológica da conjuntiva, realizada no M0 e M6 do estudo, os animais foram submetidos a anestesia local com o colírio Anestalcon<sup>®</sup> (cloridrato de proximetacaína 5mg/ml - Alcon) em cada olho e realizados cortes, com auxílio de uma tesoura de conjuntiva (HR, São Paulo, Brasil) de 1,0 milímetro, aproximadamente, da conjuntiva palpebral inferior medial e colocado sobre fragmento de papel (1x1 cm). Em seguida, foi instilada 1 gota do colírio Still<sup>®</sup> (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 polimorfonucleares e mononucleares, e a técnica de PAS, utilizada para contagem das células caliciformes. A contagem das células, em cada lâmina, foi realizada em 5 campos de grande aumento utilizando a objetiva de 40x (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão) e para exame de microscopia de luz e 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 e TRFL, incluindo células caliciformes, linfócitos e neutrófilos. Com relação à variável TF, o teste não paramétrico de Friedman foi usado para comparar vários momentos 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**

Com relação ao número de aplicações de células tronco mesenquimal necessárias para melhorar os sinais da CCS, no GCTM (10 cães) foram 3 aplicações (20%/2 cão), 2 aplicações (50%/5 cães), e uma aplicação (30%/3 cães) e no GCTMO (10 cães) foram 3 aplicações (30%/3 cães), 2 aplicações (30%/3 cães), e uma aplicação (40%/4 cães). Com relação à reação adversa da aplicação do células tronco mesenquimal, em ambos os grupos, do total de 20 cães, 3 cães do GCTMO (15%) tiveram reações adversa a aplicação apresentando hiperemia, edema e quemose, que rapidamente foram tratados com compressas de gelo durante 15 minutos e os sinais de hipersensibilidade foram controlados e os animais do GCTM não teve reações adversas.

Nos resultados das medianas do escores de avaliação dos sinais oculares (Tabela 1), ambos os grupos apresentaram melhora dos sinais clínicos, e remissão total dos sinais no M3, a pigmentação da córnea no GCTM apresentou melhora no M3 já no GCTMO a melhora foi no M2, a

neovascularização da córnea no GCTM houve remissão a partir o M1, enquanto que no GCTMO a remissão total dos sinais oculares foi a partir do M3, a secreção no GCTM apresentou remissão total a partir do M1 enquanto que no GCTMO a remissão total da secreção foi a partir do M3 e hiperemia conjuntival apresentou remissão total em ambos os grupos no M1.

Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no TLS-1 (Figura 2a) e TRFL (Figura 2b) em ambos os grupos de M0 a M6, sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos no TLS-1, mas no TRFL houve aumento mais significativo ( $p < 0,05$ ) no GCTMO comparado ao GCTM de M3 a M6.

No TF não houve mais marcação por fluoresceína em ambos os grupos a partir do M3, sendo que ambos os grupos apresentaram inicialmente olhos corados positivamente no M0.

Ambos os grupos apresentam melhora clínica ao final da pesquisa, M6. Em ambos os grupos se observou a redução de secreção ocular, hiperemia conjuntival e a cicatrização de úlcera de córnea no GCTM houve uma melhora importante na pigmentação da córnea no M6 (figura 4).

Na citologia aspirativa da glândula da terceira pálpebra não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos nos diversos momentos, mas houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) significativa em relação ao M0 até o M6 dos GCTM e GCTMO mostrando a eficácia das CTM e do Ômega 3 em diminuir o número de linfócitos. Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos nos diversos momentos M0 e M6, mas houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) significativa no M3 entre GCTM e GCTMO, sendo que o GCTMO reduziu mais significativamente a contagem de neutrófilos. Isto quer dizer que a associação de ômega oral reduz mais cedo o processo inflamatório (figura5).

A média e desvio padrão da contagem de neutrófilos, linfócitos e células caliciformes da conjuntiva estão descritas na Figura 6 e 7.

## **Discussão**

O uso de CTM injetável melhorou significativamente os sinais clínicos e quantidade e qualidade da lágrima, o que levou à redução dos processos inflamatórios e subsequente agressão tecidual à superfície ocular e às glândulas lacrimais.

A atividade biológica das CTM está ligada à sua capacidade de auto renovação se diferenciando em diferentes tipos de células e a capacidade de influenciar e estimular a ação celular de outros tecidos, com atividade parácrina devido a secreção de moléculas bioativas com propriedades antiapoptótica, angiogênica, antifibróticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, que estimula e recrutam células tronco de outros tecidos, permitindo um efeito restaurador endógeno [19, 27].

Um estudo prévio mostrou melhora significativas nos sinais clínicos oculares onde observou 44 olhos após tratamento com CTM tópica, após os seis meses do tratamento com CTM, a ocorrência de secreção conjuntival, conjuntivite, neovascularização corneana e a pigmentação da córnea. No M0, 8 olhos foram positivos no FT, indicando a presença de úlceras de córnea, mas ao final do estudo, M6, todas foram negativas [13]. Corroborando com o nosso trabalho. Já em relação após o término do estudo, ou seja, 6 meses após o início do tratamento com células tronco, houve retorno de secreção ocular e conjuntivite em 7 animais em nosso estudo os animais continuaram sem secreção ocular e conjuntivite, porém 5 animais tiveram que receber o tratamento convencional após o período de acompanhamento.

Ambos os grupos de tratamento melhoram os sinais clínicos oculares e cicatrização das úlceras de córnea. O ômega 3 é rico em EPA e DHA. Com efeito pró-inflamatório o EPA exerce ações celulares que estimulam a produção de colagenase e aumentam a expressão de moléculas de adesão necessárias ao extravasamento de leucócitos, sendo precursor da série E de resolvinas, que inclui a resolvina E1 (RvE1) e a resolvina E2 (RvE2). As resolvinas foram descritas pela primeira vez na formação de moléculas mediadoras com capacidade anti-inflamatória e propriedades imunomoduladoras [17, 28].

O DHA também pode dar origem às resolvinas D1 (RvD1) e D2 (RvD2), uma protectina ou neuroprotectina, quando produzida pelos tecidos neurais, tendo uma importante função anti-inflamatória nos sistemas neuronais e na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina [16, 17].

Silva et al. [22] demonstraram que a suplementação oral de EPA e DHA em cães com CCS aumentou a eficácia do uso do colírio imunossupressor tacrolimus, o que corrobora com os resultados

obtidos no presente estudo com o CTM injetável onde demonstrou um sinergismo com a suplementação.

No presente estudo, também há um aumento significativo quando comparado ao início, porém não há diferença significativa entre os GCTM e GCTMO do TRFL. Mas quando observamos a qualidade da lágrima aferida pelo TRFL, mostrou um aumento significativo entre os momentos e grupos, sendo maior no grupo suplementado com ômega 3, o que está de acordo com o estudo de Silva et al. [22]. A melhora da qualidade da lágrima pode também está de acordo com a melhoras dos sinais clínicos e resolução mais precoce das úlceras de córnea [7,13,20].

Nos resultados da citologia e da histopatologia houve uma diminuição na contagem de linfócitos e neutrófilos, em ambos os grupos, e houve diferença estatística entre os GCTM e GCTMO do M0 a M3, sendo que o GCTMO foi mais significativo essa redução, estando de acordo com o estudo, que mostra que esse efeito pode estar relacionado à ação do EPA proveniente do ômega 3 [22] como anti-inflamatório natural devido as resolvinas RvE1 que ativa macrófagos e sua atividade fagocítica potencializando a ação do CTM que também possui atividade anti-inflamatória devido a sua função parácrina [7, 10, 18 e 24].

No presente estudo, houve aumento significativo do número de células caliciformes entre o início e o fim do tratamento, corroborando com outros estudos que também demonstraram aumento das células caliciformes, após a associação do ômega 3 no tratamento da CCS [21,22].

Sgrignolli et al [13] em seu estudo obteve melhora significativa na redução de células inflamatórias coletadas através de biopsia e citologia aspirativa da conjuntiva palpebral e glândula da terceira pálpebra, o que corrobora com o nosso resultado. Mostrando que o mecanismo de ação parácrina e autócrina reduz o processo inflamatório e a substituição dessas células danificadas pela doença [15,27].

O atual estudo sugere um efeito sinérgico do CTM, com função autócrina e parácrina, com o ômega 3, principalmente com o EPA que é anti-inflamatório e imunomodulador natural, melhorando a qualidade da lágrima e favorecendo diminuição mais precoce dos sinais clínicos oculares e da cicatrização da córnea [21-25].

## Conclusão

Conclui-se que ambos os grupos de tratamento da CCS em cães foram eficazes na melhora dos sinais clínicos, na porção quantitativa e qualitativa da lágrima e na resolução das úlceras de córnea. Porém, o GCTMO foi mais eficaz na melhora da qualidade da lágrima em relação ao GCTM, o que mostra a importância da associação da suplementação oral de ômega 3 para potencializar a ação anti-inflamatória e imunomoduladora da terapia celular regenerativa com CTM injetável no tratamento da CCS em cães.

**Agradecimentos** – O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001, e ao apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

**Fundos** – Os autores agradecem aos laboratórios Avert Saúde Animal, Labyes e Regenera pelo fornecimento dos materiais utilizados neste estudo.

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

## Referência

1. Carter, R. and Colitz, C.M.H. (2002) The causes, diagnosis, and treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Med.*, 97(9): 683–694.
2. Ganesalingam, K. *et al.* (2019) Molecular Evidence for the role of inflammation in dry eye disease. *Clin Exp Optom* 102(5):446-454.
3. Radziejewski, K. and Balicki, I. (2016) Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Vet. Hung.* 64 (3), 313–329.

4. Izci, C., Celik, I., Alkan, F., et al. (2002), Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Ame. Jour Vet Res.* v. 63, n.5, p.688-694.
5. Berdolay, Y.A., English, R.V., Naldelstein, B. (2005) Effect of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspension on tear productin in dog with Keratoconjunctitis Sicca. *Vet Opthal*, v.8, n.4, p. 225-232.
6. Miller, P.E. Lacrimal system. In: Maggs, D.J., Miller P.E., Ofri, R. (2008) Slater's *Fund of Vet Opthal*.. 4 ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 157-174.
7. Fitzpatrick J.; Bulsara, M.; Zheing, M.H. (2017) The effectiveness of platelet-rich plasma in the treatment of tendinopathy: A Meta-analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Am J Sports Med.* 45:226–33.
8. Meheux CJ, McCulloch PC, Lintner DM, Varner KE, Harris JD. (2016) Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Arthroscopy.* 32(3):495-505.
9. Fonseca, S. A. (2011) Efeitos clínicos e histopatológicos da aplicação autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea sobre a glândula da terceira pálpebra de coelhos e de cães. *Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília*, Brasília, DF.
10. Beyazyldiz, E. et al. (2014) Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells International*, v. 2014, p. 1-9.
11. Lee, M. J. (2015). Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Mol Ther*, v. 23, n. 1, p. 139-146.
12. Villatoro, A., Fernández, V., Claros, S., Alcoholado, C., Cifuentes, M., Merayo-Llodes, J., et al. (2017) Regenerative Therapies in Dry Eye Disease: From Growth Factors to Cell Therapy. *Int J of Mol Sci.* 18 (11), 2264.
13. Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, Sgrignoli DAM, Nai GA, da Silva MG, de Barros MA, Bittencourt MKW, de Moraes BP, Dinallo HR, Foglia BT, Cabrera WB, Fares EC, and Andrade SF. (2019) Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$  in dogs

- with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.*39:101525.
14. Siqueira, R. C. Terapia celular nas doenças oftalmológicas (2009). *Revis Bras de Hematol e Hematoter*, v. 31, p. 120-127, 2009.
  15. Caplan, A. I. (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, v. 213, p. 341-347.
  16. Cheatham, C.L., Colombo, J., and Carlson, S.E. (2006) n-3 Fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. *The Am J of Clin Nutr.* 83 (6), 1458S-1466S.
  17. Bannenberg, G.L. (2010) Therapeutic Applicability of Anti-Inflammatory and Proresolving Polyunsaturated Fatty Acid-Derived Lipid Mediators. *The Sci World J.* 10 676–712.
  18. Rashid, S. (2008) Topical Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids for Treatment of Dry Eye. *Arch of Ophthalmol.* 126 (2), 219.
  19. Calder, P.C. (2010) Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients.* v. 2, p.355-74.
  20. Barabino, S., Rolando, M., Camicione, P., Ravera, G., Zanardi, S., Giuffrida, S., et al. (2003) Systemic Linoleic and  $\gamma$ -Linolenic Acid Therapy in Dry Eye Syndrome With an Inflammatory Component: *Cornea.* 22 (2), 97–101.
  21. Neves, M.L., Yamasaki, L., Sanches, O.D.C., Do Amaral, M.S.P., Stevanin, H., Giuffrida, R., et al. (2013) Use of linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *J of Ophthalmic Inflamm and Infec.* 3 (1), 4.
  22. Silva, D.A., Nai, G.A., Giuffrida, R., Sgrignoli, M.R., Santos, D.R.D., Donadão, I.V., et al. (2018) Oral omega 3 in different proportions of EPA, DHA, and antioxidants as adjuvant in treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Arq Bras de Oftalmol.* 81 (5).
  23. Roncone, M., Bartlett, H., and Eperjesi, F. (2010) Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens and Anterior Eye.* 33 (2), 49–54.
  24. Wojtowicz, J.C., Butovich, I., Uchiyama, E., Aronowicz, J., Agee, S., and McCulley, J.P. (2011) Pilot, Prospective, Randomized, Double-masked, Placebo-controlled Clinical Trial of an Omega-3 Supplement for Dry Eye. *Cornea.* 30 (3), 308–314.

25. Martin, C.A., Almeida, V.V.D., Ruiz, M.R., Visentainer, J.E.L., Matshushita, M., Souza, N.E.D., et al. (2006) Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev de Nutr.* 19 (6), 761–770.
26. Lenox, C.E. and Bauer, J.E. (2013) Potential Adverse Effects of Omega-3 Fatty Acids in Dogs and Cats. *J. Vet. Intern. Med.* 27 (2), 217–226.
27. Aggarwal S, Pittenger MF. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.*, 105(4):1815-22
28. Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., et al. (2005) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 201 (5), 713–722.

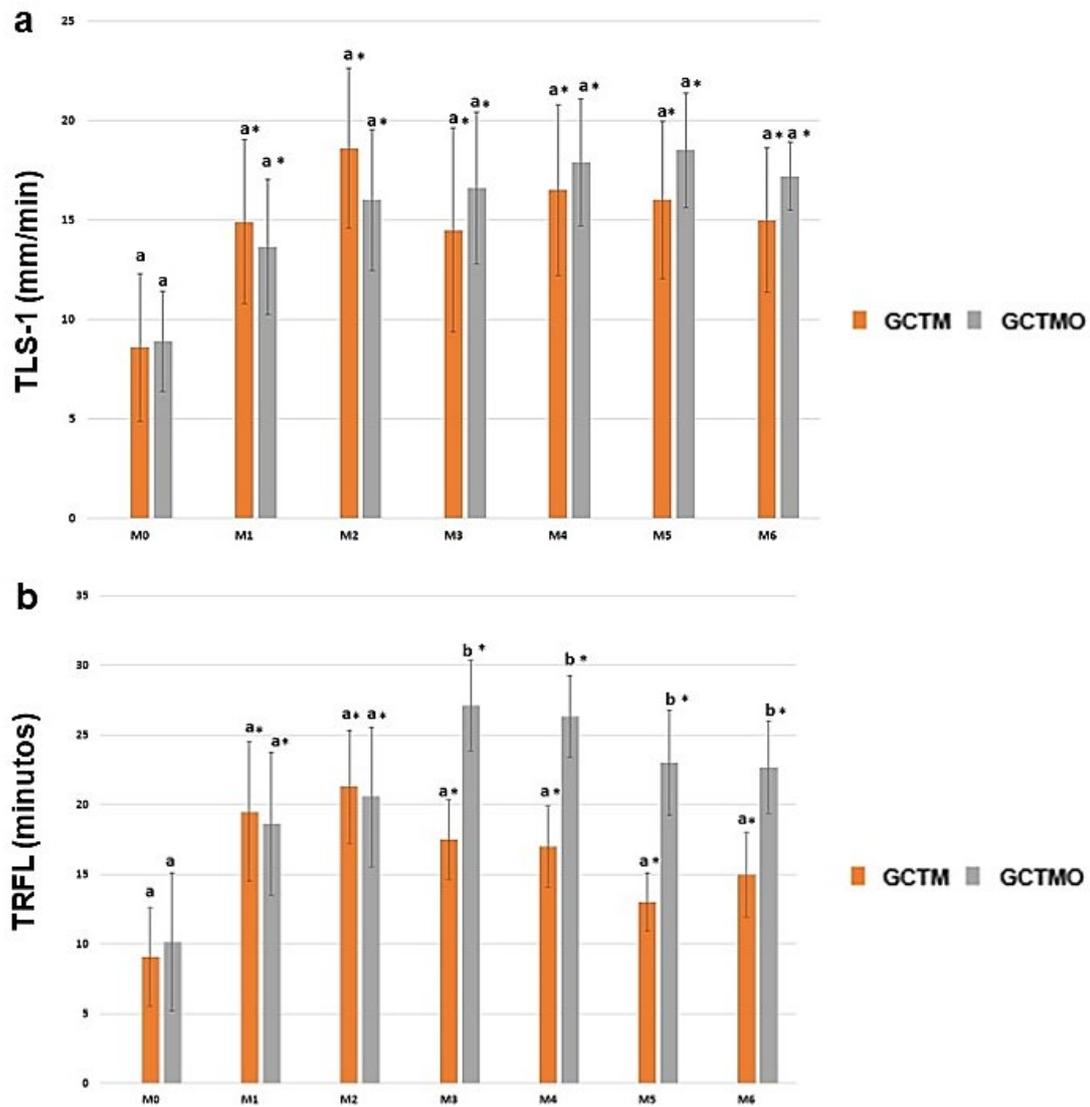
Tabela 1. Mediana do escores de avaliação\* dos sinais clínicos dos grupos GCTM e GCTMO nos momentos inicial (M0) e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).

<b>Sinais Clínicos</b>	<b>Grupos</b>	<b>M0</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>
<b>Pigmentação da córnea</b>	GCTM	1	1	1	0	0	0	0
	GCTMO	1	1	0	0	0	0	0
<b>Neovascularização da córnea</b>	GCTM	1	0	0	0	0	0	0
	GCTMO	1	1	1	1	0	0	0
<b>Secreção</b>	GCTM	1	0	0	0	0	0	0
	GCTMO	1	1	1	0	0	0	0
<b>Hiperemia conjuntival</b>	GCTM	1	0	0	0	0	0	0
	GCTMO	1	0	0	0	0	0	0

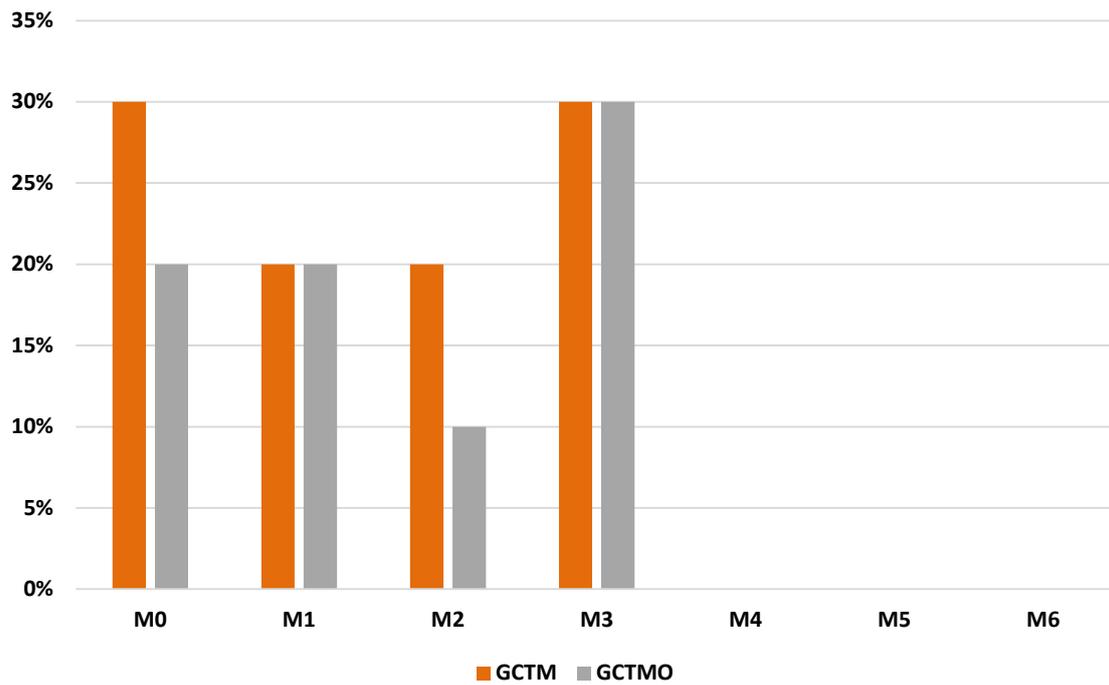
\*Escores de avaliação para pigmentação da córnea, neovascularização da córnea, secreção e hiperemia conjuntival: (0) sem alteração, (1) leve, (2) moderado e (3) severo.



**Figura 1.** Pontos de aplicações do CTM. A – Glândula da terceira pálpebra, B – Conjuntiva palpebral superior e C – Conjuntiva palpebral inferior.



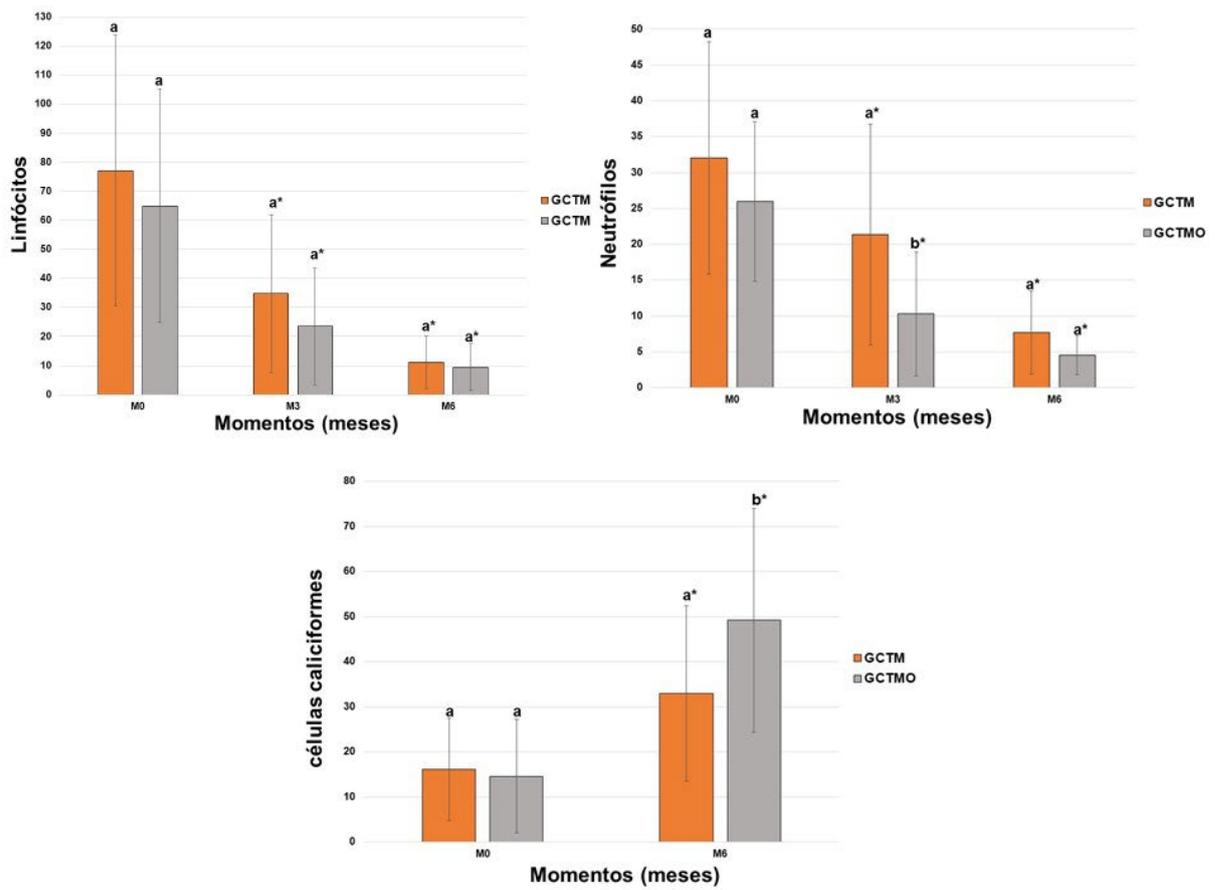
**Figura 2.** Média e desvio padrão dos testes oculares: (A) teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1) em mm/min, (B) teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos do grupo Células tronco Mesenquimal (GCTM) e do grupo Células tronco Mesenquimal + Ômega 3 oral (GCTMO) nos momentos inicial (M0), e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).



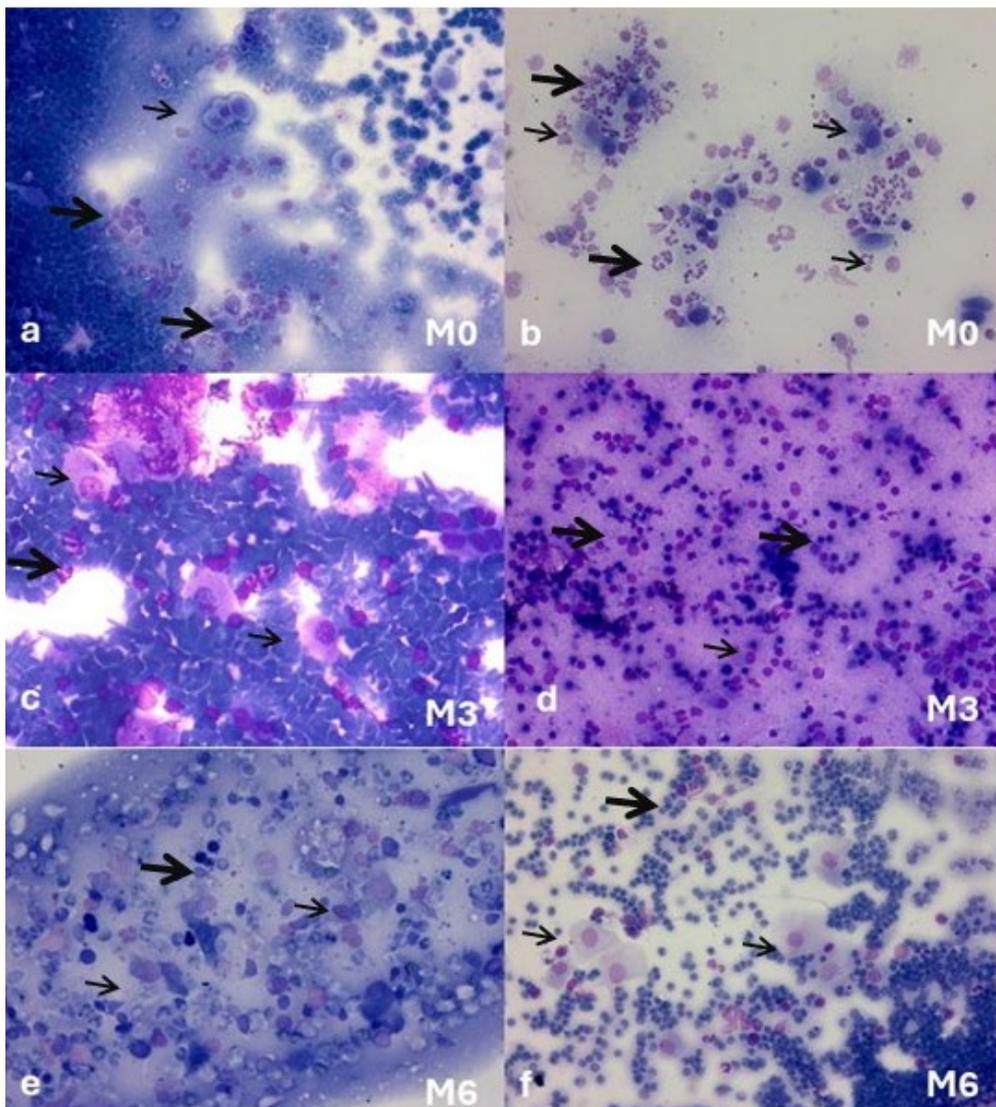
**Figura 3.** Percentual de cães com CCS (n=20) nos grupos Células tronco Mesenquimal (GCTM) e Células tronco Mesenquimal associado a  $\omega$ -3 oral (GCTMO) que tiveram os olhos corados no teste de fluoresceína (TF) nos momentos M0 a M6.



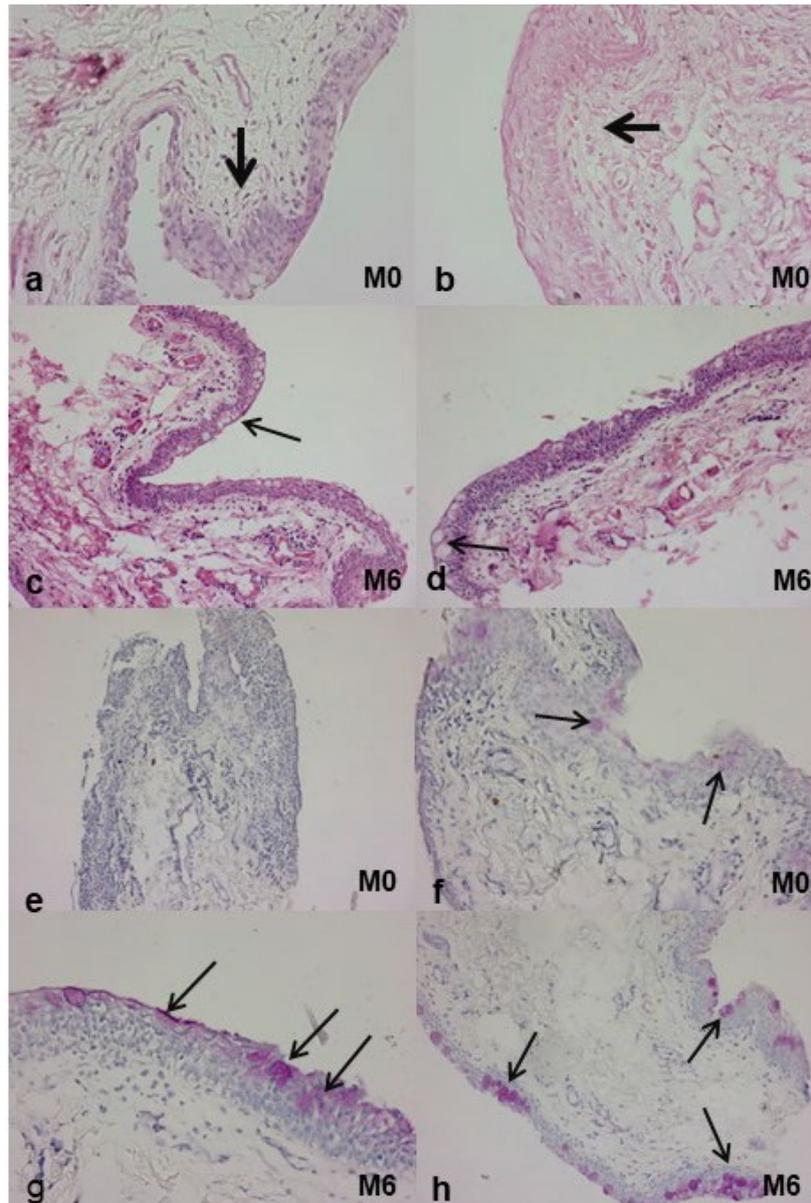
**Figura 4.** Grupo GCTM (cão n. 1) (2 aplicações de CTM) e grupo GCTMO (cão n. 10) (2 aplicações de CTM + 6 meses de ômega 3 oral) nos momentos inicial (M0), 3 meses após (M3) e no final de 6 meses (M6).



**Figura 5.** Média e desvio padrão da contagem de (A) neutrófilos, (B) linfócitos e (C) células calcificiformes, no exame histopatológico da conjuntiva bulbar inferior, realizado nos momentos M0 (início) 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).



**Figura 6.** Fotomicroscopia da citologia aspirativa da glândula da 3ª pálpebra: a) Grupo Células tronco: pequeno número de neutrófilos e grande número de linfócitos. b) Grupo Células tronco + Ômega 3: grande número de neutrófilos e linfócitos. c) Grupo Células tronco: pequeno número de neutrófilos e pequeno número de linfócitos. d) Grupo Células tronco+ Ômega 3: pequeno número de neutrófilos e grande número de linfócitos. e) Grupo Células tronco: moderado número de neutrófilos e pequeno número de linfócitos. f) Grupo Células tronco+ Ômega 3: moderado número de neutrófilos e pequeno número de linfócitos. Coloração de Giemsa, aumento de 100x. Setas finas: neutrófilos; setas grossas: leucócitos.



**Figura 7.** Fotomicroscopia da biópsia de conjuntiva: a) Grupo Células tronco: pequeno número de células inflamatórias. b) Grupo Células tronco + Ômega 3: pequeno número de células inflamatórias. c) Grupo Células tronco: ausência de células inflamatórias e presença de células caliciformes. d) Grupo Células tronco+ Ômega 3: ausência de células inflamatórias e presença de células caliciformes. e) Grupo Células tronco: ausência de células caliciformes. f) Grupo Células tronco+ Ômega 3: pequeno número de células caliciformes. g) Grupo Células tronco: grande número de células caliciformes. h) Grupo Células tronco+ Ômega 3: número de células caliciformes. A, B, C e D: hematoxilina-eosina, aumento de 100x; E, F, G e H: Coloração de PAS, aumento de 100x. Setas finas: células caliciformes; setas grossas: leucócitos.

**ANEXO 1 - CERTIFICADO CEUA ARTIGO 1**

# **UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista**

---

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação**  
**PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica**

## **Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**COMPARAÇÃO ENTRE TACROLIMUS, CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº **6412** e tendo como participante(s) **JOAO VICTOR GOULART CONSONI PASSARELI (discente), GIOVANA JOSE GARCIA ESTANHO (discente), GISMELLI CRISTIANE ANGELUCI (discente), HELENA BORGES VICENTE (discente), DANIEL ESPINHOSA VIEIRA (discente), LETICIA DA SILVA PANDO (discente), ANA MARIA SIQUEIRA SILVEIRA WEHBE (técnico participante), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), CECILIA LAPOSY SANTAREM (docente), SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE (orientador responsável)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APROVADO** em reunião realizada em 07/10/2020.

Vigência do projeto: 09/2020 a 03/2023.

ANIMAL VIVO					
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Canis lupus familiaris	15	10 quilos	4 anos	F	Animal da rotina hospitalar.
Canis lupus familiaris	15	10 quilos	4 anos	M	Animal da rotina hospitalar.

Presidente Prudente, 7 de Outubro de 2020.



---

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI



---

Profª Ms. Adriana Falco de Brito  
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

**ANEXO 2 - CERTIFICADO CEUA ARTIGO 2****UNOESTE - Universidade do Oeste  
Paulista**

---

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação**  
**PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica**

**Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**USO DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL INJETÁVEL ASSOCIADO OU NÃO COM ÔMEGA 3 ORAL NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6484 e tendo como participante(s) **JOAO VICTOR GOULART CONSONI PASSARELI (discente), HELENA BORGES VICENTE (discente), GIOVANA JOSE GARCIA ESTANHO (discente), GISMELLI CRISTIANE ANGELUCI (discente), LAYLA SOUZA DOS SANTOS GASPAROTTO (discente), GIOVANA CRISTINA DE LIMA SANTOS (discente), ANA MARIA SIQUEIRA SILVEIRA WEHBE (técnico participante), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE (orientador responsável)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APROVADO** em reunião realizada em 11/11/2020.

Vigência do projeto: 09/2020 a 05/2023.

ANIMAL VIVO

<b>Espécie/Linhagem</b>	<b>Nº de Animais</b>	<b>Peso</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>
Canis lupus familiaris	10	8 quilos	4 anos	M
Canis lupus familiaris	10	8 quilos	4 anos	F

Presidente Prudente, 24 de Novembro de 2020.



---

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI



---

Profª Dra. Adriana Falco de Brito  
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 3229-2079 – cpdi@unoeste.br  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 18 3229-2079 – cep@unoeste.br

## ANEXO 3 – NORMAS DA REVISTA VETERINARY OPHTHALMOLOGY

### AUTHOR GUIDELINES

#### Sections

1. Submission and Peer Review Process
2. Article Types
3. After Acceptance

*Veterinary Ophthalmology* is a peer-reviewed, online, international journal that welcomes submission of manuscripts whose target audience includes Diplomates of the American College of Veterinary Ophthalmologists (ACVO) and the European College of Veterinary Ophthalmologists (ECVO), members of international ophthalmic societies and associations, academic researchers with interests in veterinary or comparative ophthalmology, specialists and general practitioners with an ophthalmology interest.

*Veterinary Ophthalmology* strives to serve as the primary journal for all articles pertaining to veterinary and comparative ophthalmology published worldwide. *Veterinary Ophthalmology* publishes original material relating to all aspects of clinical and investigational veterinary and comparative ophthalmology.

#### 1. Submission and Peer Review Process

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/vop>

For help with submissions, please contact the journal's Editorial Office at [VOP.office@wiley.com](mailto:VOP.office@wiley.com)

This journal does not charge submission fees.

#### Article Preparation Support

Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for Preparing Your Article for general guidance about writing and preparing your manuscript.

#### Free Format submission

*Veterinary Ophthalmology* offers Free Format submission for a simplified and streamlined submission process. Before you submit, you will need:

- Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files—whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. If the figures are not of sufficiently high quality, your manuscript may be delayed. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Your manuscript will be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.
- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. (*Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.*)
- The title page of the manuscript, including:
  - Your co-author details, including affiliation and email address. (*Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.*)
  - Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following (*Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication*):
    - Data availability statement
    - Funding statement
    - Conflict of interest disclosure
    - Ethical approval statement

Important: *Veterinary Ophthalmology* operates a double-anonymized peer review policy. Please anonymize your manuscript and supply a separate title page file.

### Open Access

*Veterinary Ophthalmology* is a subscription journal that offers an Open Access option. You'll have the option to make your article open access after acceptance, which will be subject to an APC unless a waiver applies. Read more about [APCs here](#).

### Preprint Policy

Please find the Wiley preprint policy [here](#).

*Veterinary Ophthalmology* will consider for review articles previously available as preprints. You may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. You are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

This Journal operates a double-anonymized peer review process. Authors are responsible for anonymizing their manuscript in order to remain anonymous to the reviewers throughout the peer review process (see “Main Text File” below for more details). Since the journal also encourages posting of preprints, however, please note that if authors share their manuscript in preprint form this may compromise their anonymity during peer review.

#### Data Sharing and Data Availability

*Veterinary Ophthalmology* expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

#### Data Citation

Please review [Wiley's Data Citation policy](#).

#### Data Protection

By submitting a manuscript to or reviewing for *Veterinary Ophthalmology*, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication. Please review [Wiley's Data Protection Policy](#) to learn more.

#### Funding

You should list all funding sources in the Acknowledgments section. You are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the [Open Funder Registry](#) for the correct nomenclature.

#### Authorship

All listed authors should have contributed to the manuscript substantially and have agreed to the final submitted version. Review [editorial standards](#) and scroll down for a description of authorship criteria.

#### Author Pronouns

Authors may now include their personal pronouns in the author bylines of their published articles and on Wiley Online Library. Authors will never be required to include their pronouns; it will always be optional for the author. Authors can include their pronouns in their manuscript upon submission and can add, edit, or remove their pronouns at any stage upon request. Submitting/corresponding authors should never add, edit, or remove a coauthor's pronouns without that coauthor's consent. Where post-publication changes to pronouns are required, these can be made without a correction notice to the paper, following Wiley's Name Change Policy to protect the author's privacy. Terms which fall outside of the scope of personal pronouns (e.g. proper or improper nouns), are currently not supported.

#### ORCID

This journal requires ORCID. Please refer to [Wiley's resources on ORCID](#).

### Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is your responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit [Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ](#).

The corresponding author is responsible for obtaining written permission to reproduce the material "in print and other media" from the publisher of the original source, and for supplying Wiley with that permission upon submission.

### Title Page

The title page should contain:

- i. A brief informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see [Wiley's best practice SEO tips](#));
- ii. A short running title of less than 50 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Conflicts of interest (if declared);
- vii. Ethical approval statement.

Important: *Veterinary Ophthalmology* operates a double-anonymized peer review policy. Please anonymize your manuscript and prepare a separate title page containing author details.

### Main Text File

The main text file should be in Word or PDF format. As *Veterinary Ophthalmology* operates a double-anonymized peer review process, authors are required to provide an anonymized main text file upon initial submission. The anonymized version should have no obvious references or hints as to the authors' country or region. The laboratory/ institution/practice information should be removed from the anonymized version and written as "XXXX -anonymized for review-". Authors of manuscripts which proceed to revision stage will be asked to provide a deanonymized version, in addition to their anonymized version, upon submission of their revision.

Please note: It is no longer required to include the location of the manufacturer when providing manufacturer information (equipment, devices, and reagents).

Your main document file should include:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations;
- Abstract structured (Objective; Animal Studied, Procedure(s), Results, and Conclusions);
- Six keywords (please ensure these are not already included within your title guidance on keywords creation is available on [Wiley Author Services](#));
- Main body: formatted as introduction, materials & methods, results, discussion and/or conclusion;
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);
- Figure legends: Legends should be supplied as a complete list in the text. Figures should be uploaded as separate files (see below).

## Reference Style

This journal uses AMA reference style. Review your [reference style guidelines](#) prior to submission. As *Veterinary Ophthalmology* offers Free Format submission, however, this is for information only and you do not need to format the references in your article. This will instead be taken care of by the typesetter.

## Figures and Supporting Information

Figures, supporting information, and appendices should be supplied as separate files. You should review the [basic figure requirements](#) for manuscripts for peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements. View [Wiley's FAQs](#) on supporting information.

## Embedded Rich Media

*Veterinary Ophthalmology* has the option for authors to embed rich media (i.e. video and audio) within their final article. These files should be submitted with the manuscript files online, using either the "Embedded Video" or "Embedded Audio" file designation. If the video/audio includes dialogue, a transcript should be included as a separate file. Maximum file size is 300 MB, and the combined manuscript files, including video, audio, tables, figures, and text must not exceed 350 MB. For full guidance on accepted file types and resolution please see [here](#).

Ensure each file is numbered (e.g. Video 1, Video 2, etc.). Legends for the rich media files should be placed at the end of the article.

The content of the video should not display overt product advertising. Educational presentations are encouraged.

Any narration should be in English, if possible. A typed transcript of any speech within the video/audio should be provided. An English translation of any non-English speech should be provided in the transcript.

All embedded rich media will be subject to peer review. Editors reserve the right to request edits to rich media files as a condition of acceptance. Contributors are asked to be succinct, and the Editors reserve the right to require shorter video/audio duration. The video/audio should be high quality (both in content and visibility/audibility). The video/audio should make a specific point; particularly, it should demonstrate the features described in the text of the manuscript.

**Participant Consent:** It is the responsibility of the corresponding author to seek informed consent from any identifiable participant in the rich media files. Masking a participant's eyes, or excluded head and shoulders is not sufficient. Please ensure that a consent form (<https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/licensing-info-faqs.html>) is provided for each participant.

**Peer Review**

This journal operates under a double-anonymized peer review model. Except where otherwise stated, manuscripts are peer reviewed by at least two anonymous reviewers and an Editorial Board Member. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Authors may suggest potential reviewers that have expertise in the field and can provide an unbiased evaluation. Previous or current mentors, mentees, collaborators, colleagues, or personal relations are not suitable recommendations. Authors can also oppose reviewers who would have a conflict of interest in reviewing their manuscripts.

The reviewers' comments are reviewed by an Editorial Board Member who makes a recommendation on the suitability of the report for publication to the Editor-in-Chief, who makes the final decision. The editors reserve the right to seek consultation on appropriateness of study design, survey instruments, and methods used for statistical analysis of data.

Manuscripts that report studies that are otherwise scientifically sound may be rejected before or after peer review because they lack breadth of appeal, impact, or are outside the interest area of the journal. Likewise, studies that are simply additive to the literature and do not provide substantial discovery, mechanistic insight, challenge dogma, or highlight novel understanding are not likely to be considered suitable for publication.

Manuscripts that are poorly prepared or written or do not follow ethical guidelines will be returned without peer review. It is the authors' responsibility to submit manuscripts that are written in a style that enhances readability (clear, direct, concise, with appropriate grammar and spelling). Authors with limited experience in scientific writing in English are encouraged to seek assistance from professional editing services.

*In-house submissions, i.e. papers authored by Editors or Editorial Board members of the title, will be sent to Editors unaffiliated with the author or institution and monitored carefully to ensure there is no peer review bias.*

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is [available here](#).

### Appeals and Complaints

Authors may appeal an editorial decision if they feel that the decision to reject was based on either a significant misunderstanding of a core aspect of the manuscript, a failure to understand how the manuscript advances the literature or concerns regarding the manuscript-handling process. Differences in opinion regarding the novelty or significance of the reported findings are not considered as grounds for appeal. To raise an appeal, please contact the journal by email, quoting your manuscript ID number and explaining your rationale for the appeal. The editor's decision following an appeal consideration is final.

To raise a complaint regarding editorial staff, policy or process please contact the journal in the first instance. If you believe further support outside the journal's management is necessary, please refer to Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics.

### Refer and Transfer Program

Wiley believes that no valuable research should go unshared. *Veterinary Ophthalmology* participates in Wiley's [Refer & Transfer program](#). If your manuscript is not accepted, you may receive a recommendation to transfer your manuscript to another suitable Wiley journal, either through a referral from the journal's editor or through our Transfer Desk Assistant.

### Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles

*Veterinary Ophthalmology* requires that you include in the manuscript details of ethical review board approvals, ethical treatment of human and animal research participants, and gathering of informed consent, as appropriate. You will be expected to declare all conflicts of interest, or none, on submission. Please review Wiley's policies surrounding [human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines](#).

This journal follows the core practices of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#) and handles cases of research and publication misconduct accordingly (<https://publicationethics.org/core-practices>).

This journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read [Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors](#) and [Wiley's Publication Ethics Guidelines](#).

### Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology (GERVO)

The Journal reserves the right to decline to publish manuscripts that do not comply with the [Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology \(GERVO\)](#), such as the appropriate regulatory approval is not reported, the Journal has concerns about the welfare or treatment of animals used in the study, there is reason to believe

Article Type	Description	Word Guide (this is a suggested range and not prescriptive)	Abstract / Structure	Other Requirements
Original Articles	Including clinical studies (prospective and retrospective)	4,000 - 5,000	Yes, structured	Ethical Approval Conflict of Interest Statement
Review Articles	Papers which clarify, summarize and critically evaluate the current literature	4,000 - 5,000	Yes, unstructured	Conflict of Interest Statement
Case Reports	Case reports making a substantial contribution to ophthalmic knowledge	2,000 – 2,500 (with a recommendation of around 4 figures and between 18-20 references)	Yes, structured	Ethical Approval Conflict of Interest Statement
Viewpoint	Papers which challenge existing concepts or present an alternative interpretation of available information	2,000 – 2,500	Yes, unstructured	Conflict of Interest Statement
Brief Communications	Brief communications are used when the extent of the investigation or the findings do not warrant a full paper, but are still considered of value to the ophthalmic community	1,500 – 2,000 (with a recommendation of around 2 figures and between 10 - 12 references)	Yes, structured	Ethical Approval Conflict of Interest Statement
Letter to the Editor	Letters may cover a variety of topics	750 – 1,000 (including references and a recommendation of around 1-2 figures/tables)	No	Conflict of Interest Statement

that animals have been subjected to unnecessary or avoidable pain or distress or the Journal has concerns about involvement of people in the study.

The Journal is not obliged to reveal the basis for such a decision.

The Journal may request further information about care and use of animals, or involvement of people, including evidence of regulatory approval or compliance with local regulations.

## Ethical Approval Statement

We require that authors indicate during submission of their manuscript if the study required institutional or governmental approval in the jurisdiction in which it was conducted, and whether such approval was granted.

To confirm adherence to the journal's ethical policies, including compliance with the Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology (GERVO), authors must provide an Ethical Approval Statement. Please select (and edit accordingly) the most suitable Ethical Approval Statement from our templated statements available here: Templates for Ethical Approval Statements. The finalized statement should be included in the Title Page.

## Conflict of Interest

*Veterinary Ophthalmology* requires that all authors include a conflict of interest statement (this should be included in the Title Page). Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company.

If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, they can query the editorial office at [vop.office@wiley.com](mailto:vop.office@wiley.com). The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this in the manuscript and at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to list in the manuscript, and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

## 2. Article Types

## 3. After Acceptance

## Wiley Author Services

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

## Copyright & Licensing

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License.

Standard re-use and licensing rights vary by journal. Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND Creative Commons License.

*Self-Archiving Definitions and Policies:* Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions.

### Early View

Upon publication, articles are available as full text HTML or PDF in Early View prior to inclusion in an issue and can be cited as references using their Digital Object Identifier (DOI) number.

### Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email.

### Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

### Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

### Correction to Authorship

In accordance with Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics and the Committee on Publication Ethics' guidance, *Veterinary Ophthalmology* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the Request for Changes to a Journal Article Author List Form and contact either the journal's editorial or production office, depending on the

status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in Wiley's Best Practice Guidelines under "Author name changes after publication."

## **ANEXO 4 – NORMAS DA REVISTA VETERINARY WORLD**

### Instructions for Authors

#### General

Veterinary World publishes high quality and novelty papers focusing on Veterinary and Animal Science. The fields of study are bacteriology, parasitology, pathology, virology, immunology, mycology, public health, biotechnology, meat science, nutrition, gynecology, surgery, genetics, prion diseases and epidemiology. Food animals, companion animals, equines, wild animals, laboratory animals and animal models of human infections are considered. Studies on zoonotic and emerging infections are highly appreciated. All articles published by Veterinary World are made freely and permanently accessible online. All articles to Veterinary World are posted online immediately as they are ready for publication. All articles will be assigned a DOI number (Digital Object Identifier) whereby they become searchable and citable without delay. The journal aims for a first decision to be made within 6-8 weeks (this time is the average time as review process depends on the spare time of the reviewers so, there may be more or less than this time occur) of receipt of the submission and the Editors-in-Chief make the final decision on publication. Online submission of manuscript: <https://www.ejmanager.com/my/vetworld/> Veterinary World uses double-blind review, which means that both the reviewer and author identities are concealed from the reviewers, and vice versa, throughout the review process. Before being sent to reviewers, manuscripts are pre-screened by the editorial office to check that they agree with the criteria for publishing in Veterinary World: accordance with the aims and scope of the journal, nature of the study, originality of the results, quantity and quality of data, general conclusions, and presentation of the work with a good quality of English

language. If the paper does not fulfill these criteria, it may be rejected at this stage without review. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Veterinary World.

#### ETHICAL GUIDELINES

Veterinary World adheres to the below ethical guidelines for publication and research. If your manuscript is based on in vivo experiment, then follow the guideline of ARRIVE and amend the manuscript wherever necessary as per guideline. You must have to do it otherwise there may be a chance of reject.

#### AUTHORSHIP AND ACKNOWLEDGEMENTS:

##### Authorship

All the authors in a manuscript are responsible for the technical information communicated. For this reason, it is necessary that all authors must read and approve the final version of the manuscript before signing the consent and declaration form. All named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and All must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. Veterinary World adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet

conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Change in authorship:

We do not allow any change in authorship after provisional acceptance. We cannot allow any addition, deletion or change in the sequence of the author name. We have this policy to prevent the fraud.

Acknowledgements

Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Similarity index

We check the plagiarism with the use of iThenticate. To reduce the similarity, please give proper citations and use the words/sentences carefully.

**ETHICAL APPROVALS**

Experimental Subjects: When experimental animals (All live animals considered experimental when using for the study) are used, the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the International Animal Ethics Committee or Institutional ethics committee and in accordance with local laws and regulations. All studies using

human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

#### PERMISSION

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

#### AUTHOR DECLARATION CERTIFICATE

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. Certificate also includes permission from other copyright holders if any copyrighted materials used in manuscript. ([Download Author Declaration Certificate](#)).

#### COMPETING INTERESTS DISCLOSURE CERTIFICATE

Authors submitting a paper to Veterinary World have to disclose competing interests if any by submission of [Competing Interests Disclosure Certificate](#).

#### MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

- Original Research articles
- Review articles
- There is no page limit but unnecessary text, illustrations, and tables must not be included.
- We do not accept the submission of Case reports.

#### MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

- Refer the latest articles and manuscript template from [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org) for format of each section. There is no page limit for manuscripts. The manuscript must be typed with 11

point Times New Roman font (Double space line) in MS Word 2010.

- Give line no. to whole word document.
- Title (should be clear, descriptive and not too long)
- PLEASE DO NOT INCLUDE AUTHOR NAME AND AFFILIATION IN WORD FILE as we follow double blind peer review process.
- Structured Abstract
- Keywords (indexing terms), normally 3-6 items.
- Introduction (should include recent references)
- Materials studied, area descriptions, methods, techniques (Include permission of Animal Ethics Committee if needed)
- Results
- Discussion (Discuss the result with support of recent references)
- Conclusion
- PLEASE DO NOT INCLUDE ACKNOWLEDGMENT IN WORD FILE BUT INCLUDE IT IN AUTHOR DECLARATION CERTIFICATE as we follow double blind peer review process.
- Competing interest statement
- Authors' Contributions (include in revised manuscript only) as we follow double blind peer review process.
- Research article: 40% references must be of research/review papers published during past five years. Review article: 40-50% references must from papers published during past five years. References in the text should be given by placing in bracket [1],

[1,2,3]. Reference no. should start from no. 1 onwards from Introduction section (e.g.: [1],[2]...[1,2]). Reference list must be prepared accordingly.

- Tables
- Figure captions
- Figures (separate file(s)).

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality.

Abbreviations, Symbols, and Nomenclature: All specifications must be stated according to the S.I. system. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). Any abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used. All biological, medical, chemical or other terms should be used according to the most recent recommendations of the respective international nomenclature. Enzymes should be given in I.U. (International Units), according to Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, when they are first mentioned in the text, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with.

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's

Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses. Names of micro-organisms and zoological names should be in italics in the manuscript.

Figures/Graphs: The manuscript comprises the text and a list of all figures and tables with their captions and titles in a separate file. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. All figures/graphs etc. must be in JPG format.

References: Each paper should include bibliographical references. The name of the journal in which the paper cited appears should be listed in the form of the abbreviated title from the cover of the journal concerned, otherwise use the abbreviations contained in a Bibliographic Guide for Editors & Authors from Chemical Abstracts, which is available in all major libraries, or the World List of Scientific Periodicals, 4th ed., London 1963-65, or [www.journalseek.net](http://www.journalseek.net), or from other authenticated list. Name of the journal must be in Italic letter. Please ensure that references in the text exactly match those in the manuscript's reference list. If editing sections of text please ensure that any references that are affected are amended accordingly in the reference list. Reference to personal communications and unpublished result should be in the text only.

Examples:

- Maheshwari M., Nelapati K. and Bindu B. (2011) *Vibrio cholerae* - A Review, *Vet. World*, 4(9): 423-428.
- Sani N. A., Oladele S. B., Raji M. A. and Ibrahim D. G. (2011) Seroprevalence of Avian Leukosis Virus Antigen Using ELISA

Technique in Exotic Broilers and Nigerian Local Chickens in Zaria, Nigeria, *Vet. World*, 4(8): 345-348.

- Albert, J. and Morris, J.G. (1999) Cholera and other vibrios. In: Strickland, G.T., editor. *Hunters Tropical Medicine*. 8th edition. Philadelphia: Saunders, W.B. 323- 334.
- Garate- Lizarranga, I., Bustillos- Guzman, J.J., Lopez- Cortes, D.J., Hernandez-Sandoval, F., Erler, K. and Luckas, B. (2006) Paralytic shellfish toxin profiles in netphyto- plankton samples from bahia. concepcion, gulf of California, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.*, 52: 800- 806
- Gholami, P., Lew, S.Q. and Klontz K.C. (1998) Raw shellfish consumption among renal disease patients. A risk factor for severe *Vibrio vulnificus* infection. *Am. J. Prev. Med.*, 15:243-245.
- Lin, W., Fullner, K.J., Clayton, R., Sexton, J.A., Rogers, M.B., Calia, K.E., Calderwood, S.B., Fraser, C. and Mekalanos, J.J.(1999). Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 1071- 1076.
- In case of web references, write the date of accession.

#### ONLINE SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted Online via the online submission site [www.ejmanager.com](http://www.ejmanager.com) or click the submit your manuscript link from [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org). The use of an online submission and peer review site speeds up the decision-making process, enables immediate distribution, and allows authors to track the status of their own manuscripts. If assistance is needed, Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users

need to upload their manuscripts. But please refer tutorial for online submission from [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org) before contacting the editorial office.

Editorial Office contact person: Dr. Anjum Sherasiya, e-mail: [editorveterinaryworld@gmail.com](mailto:editorveterinaryworld@gmail.com)

Online Submission:

To submit a manuscript, please follow the instructions below:

- Launch your web browser and go to [www.ejmanager.com](http://www.ejmanager.com) or click on the link submit your manuscript at [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org) and choose author login from upper right corner. Select Veterinary World from the list. If you are not registered as an author then register yourself as an author. The system will generate username and password for you after registration. You have to use this username and password to login as an author.
- After login with your username and password, click on the tutorial link from upper menu. The tutorial will guide you procedure regarding submission of manuscript step by step.
- Please be patience during the final step of conversion to PDF. Sometimes conversion takes a long time (up to 2-3 min according to system speed and your network speed).
- Please do not forget to send the submission after conversion to PDF.
- After successful confirmation, you will receive the system generated acknowledgment by an email for your submission.
- Please upload:

- Your manuscript with title page under the file designation 'main document' (compulsory).
- Figure files under the file designation 'figures' (optional).
- You must have to upload 'author declaration certificate' (compulsory).
- Upload competing interests/conflict of interests certificate if applicable (optional).

#### MANUSCRIPT TRACKING

Sender author can track the progress of the submitted manuscript from his/her author account. However, sender author will receive a system generated email each time; at the time of submission, article revision letter, submission of the revised manuscript, provisional acceptance, payment request, acceptance/reject etc.

#### MANUSCRIPT REVISION

Sender author will receive an email once reviewers submit the comments to Veterinary World. Editor will check the comments and forward it to the sender author with or without further comments. Sender author has to submit the revised manuscript as per editorial and reviewers comments within 4 weeks. If sender author needs more time then he/she must have to get the approval from the editor. Editor-in-Chief will make the final decision for each manuscript.

#### ARTICLE PUBLISHING CHARGE

For each accepted article: Category-1: USD 800 for developing or underdeveloped countries (Low income countries). Category-2: USD 1000 for developed countries (High income countries). Category will be determined as per World Bank category. Minor English language editing will be done by journal

copyeditor without any cost to the authors. However, we will ask for external copyediting if manuscript English is not acceptable.

#### AFTER PROVISIONAL ACCEPTANCE

Upon provisional acceptance of a paper for publication, corresponding author will receive the email regarding payment of Article processing charge. Charges must be paid within 10 days as per instructions given in the email. Signed acceptance letter will be provided to all author after payment. Acceptance will be final after the payment of publication charge.

Proof corrections: The corresponding author will receive an e-mail containing PDF. A working e-mail address must therefore, be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format).

Proofs must be returned to the Editor within five days of receipt with corrections if any. If there is no correction then corresponding author must have to reply accordingly. We ask that you only correct typesetting errors and grammatical errors if any. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made.

Online publication: Online articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. We do assign DOI to each newly published article. We will send the email to all authors once article will be published.

Publication certificate: We will provide publication certificate to all author with the detail of published article by an email after online publication.

- Last updated on 19-02-2024