



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

WILLIAM DOS SANTOS VILLA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS HOMÓLOGO INJETÁVEL ASSOCIADO OU
NÃO COM ÔMEGA 3 ORAL NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
SECA EM CÃES**



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

WILLIAM DOS SANTOS VILLA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS HOMÓLOGO INJETÁVEL ASSOCIADO OU
NÃO COM ÔMEGA 3 ORAL NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
SECA EM CÃES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

Presidente Prudente - SP
2023

636.089
V712p

Villa, William dos Santos.

Plasma rico em plaquetas homólogo injetável associado ou não com ômega 3 oral no tratamento de ceratoconjuntivite seca em cães / William dos Santos Villa. – Presidente Prudente, 2023.

47 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

1. Plasma rico em plaqueta homólogo. 2. Ácidos
graxos Omega-3. 3. Ceratoconjuntivite seca. 4. Cães.
Título.

WILLIAM DOS SANTOS VILLA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS HOMÓLOGO INJETÁVEL ASSOCIADO OU
NÃO COM ÔMEGA 3 ORAL NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
SECA EM CÃES**

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

Presidente Prudente, 06 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha filha Laura e minha esposa Aline, que suportaram minha ausência e foram as maiores incentivadoras e suporte para realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Silvia Franco Andrade, que me aceitou em sua equipe oftálmica me permitindo aprender e admirar cada vez mais a profissão

Veterinária e a especialização oftálmica;

Agradeço à Dra. Cecília Laposy pela coorientação do projeto de pesquisa, pelo processamento do plasma e por toda ajuda e paciência nesse processo;

Agradeço ao Dr. João Victor que foi essencial para que as aplicações, consultas, retornos dessem certo, sempre prestativo e disposto a ensinar, sou infinitamente agradecido por fazer parte da minha pesquisa e agora da minha vida como um grande amigo;

Agradeço à Letícia e ao Daniel, que junto com o Dr. João Victor realizaram todos os momentos dessa pesquisa ao meu lado, sempre disponíveis para ajudar, vocês foram essenciais, muito obrigado;

Agradeço aos membros da equipe oftálmica da Unoeste, João Victor, Giovana e Gismelli que foram muito importantes, ajudando no desenvolvimento da pesquisa sempre que possível;

Agradeço à Pazin Vet que compreendendo meu desejo por adquirir mais conhecimento fez de tudo para que eu pudesse estar nos dias de consultas, aplicações e retorno dos animais, me liberando das minhas atividades de trabalho para que eu pudesse desenvolver meu projeto de pesquisa;

Agradeço às empresas Avert Saúde Animal e Pet Society que esteve envolvida nesse projeto de pesquisa contribuindo com a doação de alguns materiais para que o projeto pudesse ser desenvolvido;

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

***“Quem não compreende um olhar,
tão pouco compreenderá uma longa explicação”.***

Mário Quintana

RESUMO

Plasma rico em plaquetas homólogo injetável associado ou não com ômega 3 oral no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma oftalmopatia inflamatória crônica de alta incidência em cães e humanos. A CCS tem como característica a inflamação crônica das glândulas lacrimais, levando ao desequilíbrio do filme lacrimal, reduzindo a produção de lágrima (quantitativo) e /ou instabilidade do filme lacrimal afetando a qualidade da lágrima (qualitativa). Esse desequilíbrio do filme lacrimal causa alterações na superfície da córnea como: opacidade da córnea, hiperemia conjuntival, neovascularização, pigmentação da córnea e secreção. Em casos mais graves pode levar a perda da visão, devido a opacidade, pigmentação ou ulceração da córnea. A causa mais comum de CCS é a imunomediada. O tratamento convencional consiste em combinações de fármacos que melhoram a lubrificação dos olhos, como lágrimas artificiais, e fármacos que estimulam a produção de lágrima, como inibidores de calcineurina que possuem efeitos lacrimoestimulantes, e imunomoduladores, sendo representado pelo tacrolimus e a ciclosporina A. O plasma rico em plaquetas (PRP) é rico em proteínas bioativas que possuem ação regeneradora tecidual. Nas últimas décadas, houve um aumento significativo do uso de PRP, como alternativa para terapia oftálmica em doenças, principalmente, da superfície ocular. O PRP tem um potencial terapêutico em enfermidades oculares especialmente aquelas que envolve a córnea, devido as altas concentrações de fatores de crescimento, transformador beta (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblástico (FGF) presentes no PRP. O ácido graxo ômega 3 (ω -3) é um ácido graxo essencial que possui ação anti-inflamatória e apresenta efeitos terapêuticos em cães, gatos e humanos. Um dos principais efeitos benéficos dos ω -3 é reduzir a produção de mediadores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral - α (TNF- α), a interleocina 1 β (IL-1 β), a interleocina (IL - 6), fator de transcrição kB (NF-kB) e as espécies reativas do oxigênio. O uso do PRP tem como beneficiar terapia celular regenerativa, de baixo custo e alta eficácia, a suplementação com ω -3 tem como objetivo melhorar a performance da resposta celular regenerativa do PRP e melhorar a qualidade do filme

lacrimal. O objetivo deste estudo, foi comparar o uso do plasma rico em plaquetas homólogo injetável (PRPH) associado ou não com ômega 3 oral, em cães com CCS. Foram avaliados 22 cães com CCS bilateral (44 olhos), sem predileção racial, etária ou sexual, divididos aleatoriamente em dois grupos de tratamento com 22 olhos cada: grupo plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) injetável, e grupo PRPH injetável associado ao ω -3 oral (PRPHO). Nos grupos PRPH e PRPHO foram administrado, por via injetável, 0,1 ml de PRPH em cada ponto de aplicação (conjuntiva palpebral inferior e superior e na glândula da terceira pálpebra), uma vez por mês, totalizando no máximo, três aplicações, conforme melhora dos sinais de CCS, e o grupo PRPHO além da aplicação do PRPH, foi associado a suplementação de ω -3 oral, uma x/dia, durante seis meses. Os animais foram avaliados mensalmente durante 6 meses quanto aos sinais clínicos e testes oftálmicos específicos: Teste Lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), e Teste de Fluoresceína (TF). Com relação ao número de aplicações de PRP necessárias para melhorar os sinais da CCS, no grupo PRPH (11 cães) foram três aplicações (36%/4 cães), dois aplicações (55%/6 cães), e uma aplicação (9%/1 cão) e no grupo PRPHO (11 cães) foram três aplicações (18%/2 cães), dois aplicações (55%/6 cães), e uma aplicação (27%/3 cães). Em ambos os grupos de tratamento, os sinais oculares apresentaram melhora até o final do estudo, e a resolução das úlceras de córneas foi mais precoce no grupo PRPHO. 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 PRPHO comparado ao PRPH de M3 a M6. Conclui-se que ambos os grupos de tratamento da CCS em cães foram eficazes na melhoria dos sinais clínicos e na porção quantitativa e qualitativa da lágrima, mas o grupo PRPHO foi mais eficaz na melhoria da qualidade da lágrima, na resolução mais precoce das úlceras de córnea e na redução do número de aplicações de PRP, o que mostra a importância da associação da suplementação oral de ω -3 para melhorar a performance da terapia celular regenerativa com PRP injetável no tratamento da CCS.

Palavras-chave: Ceratoconjuntivite seca, ácidos graxos ômega 3, plasma rico em plaquetas homólogo, olho seco, cães.

ABSTRACT

Injectable homologous platelet-rich plasma associated or not with oral omega 3 in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) is a chronic inflammatory ophthalmopathy with a high incidence in dogs. Platelet-rich plasma (PRP) is rich in bioactive proteins that have tissue regenerating action and omega 3 (ω -3) is an essential fatty acid that has anti-inflammatory action. The aim of this study was to compare the use of injectable homologous platelet-rich plasma (PHRP) with or without oral omega 3 in dogs with CCS. We evaluated 22 dogs with bilateral CCS (44 eyes), with no racial, age or sexual predilection, randomly divided into 2 treatment groups with 22 eyes each: injectable homologous platelet-rich plasma (HPRP) group, and injectable HPRP group associated with ω -3 oral (HPRPO). In the HPRP and HPRPO groups, 0.1 ml of HPRP was administered via injection at each application point (lower and upper palpebral conjunctiva and in the third eyelid gland), once a month, totaling a maximum of three applications, according to the improvement of the signs of KCS, and the HPRHO group, in addition to the application of HPRP, was associated with oral ω -3 supplementation, 1 x/day, for 6 months. The animals were evaluated monthly for 6 months by clinical signs and specific ophthalmic tests: Schirmer's Tear Test-1 (STT-1), Tear Film Breakup Test (BUT), Fluorescein Test (TF). Regarding the number of PRP applications needed to improve signs of KCS, in the HPRP group (11 dogs) there were 3 applications (36%/4 dogs), 2 applications (55%/6 dogs), and one application (9% /1 dog) and in the PRPHO group (11 dogs) there were 3 applications (18%/2 dogs), 2 applications (55%/6 dogs), and one application (27%/3 dogs). In both treatment groups, ocular signs improved by the end of the study, and resolution of corneal ulcers was earlier in the HPRPO group. There was a significant increase ($p < 0.05$) in STT-1 and TBUT in both groups from M0 to M6, with no statistical difference ($p > 0.05$) between groups in STT-1, but in TBUT there was a more significant increase ($p < 0.05$) in HPRPO compared to HPRP from M3 to M6. It is concluded that both KCS treatment groups in dogs were effective in improving the clinical signs and in the quantitative and qualitative portion of the tear, but the PRPHO group was more effective in improving the quality of the tear, in earlier resolution of ulcers of cornea and reducing the number of HPRP applications, which

shows the importance of associating oral ω -3 supplementation to improve the performance of regenerative cell therapy with injectable PRP in the treatment of CCS.

Keywords: Keratoconjunctivitis sicca, omega 3 fatty acids, homologous platelet-rich plasma, dry eye, dogs.

LISTA DE SIGLAS

x/dia	– vezes por dia
%	– Porcentagem
ARVO	– Associação de Pesquisa em Visão e Oftalmologia
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 ³	– milímetro cúbico
M0	– Momento zero
M1	– Momento um
M2	– Momento dois
M3	– Momento três
M4	– Momento quatro
M5	– Momento cinco
M6	– Momento seis
mOsmol/L	– miliosmoles por litro
TF	– Teste de Fluoresceína
TLS	– Teste Lacrimal de Schirmer
TLV	– Teste de Lissamina Verde
TMT	– Teste de Meniscometria de Tira
TOL	– Teste de Osmolaridade Lacrimal
TRFL	– Teste de Ruptura do Filme Lacrimal
PRPH	– Plasma Rico em Plaqueta Homólogo
Rpm	– Rotação por minuto
Seg	– Segundos
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO (REVISTA VETERINARY WORLD).....	13
ANEXO A- APROVAÇÃO DA CEUA.....	42
ANEXO B- QRCODE DOS 3 PONTOS DE APLICAÇÃO DO PRPH EM 1 CÃO COM CCS DO ESTUDO.....	43
ANEXO C- NORMAS DA REVISTA VETERINARY WORLD.....	44

ARTIGO CIENTÍFICO (REVISTA VETERINARY WORLD)**Plasma rico em plaquetas homólogo injetável associado ou não com ômega 3 oral no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães****Resumo**

Introdução e Objetivo: A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma oftalmopatia inflamatória crônica, na maioria dos casos com causa imunomediada e de alta incidência em cães e humanos. O plasma rico em plaquetas (PRP) é rico em proteínas bioativas, que possuem ação regeneradora tecidual e anti-inflamatória. O ácido graxo ômega 3 (ω -3) possui ação anti-inflamatória e imunomoduladora. O objetivo deste estudo foi comparar o uso do plasma rico em plaquetas homólogo injetável (PRPH) associado ou não com ômega 3 oral, em cães com CCS.

Materiais e Métodos: Foram avaliados 22 cães com CCS bilateral (44 olhos), sem predileção racial, etária ou sexual, divididos, aleatoriamente, em 2 grupos de tratamentos com 22 olhos cada: grupo plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) injetável, e grupo PRPH injetável associado ao ω -3 oral (PRPHO). Os animais foram avaliados mensalmente durante 6 meses, quanto aos sinais clínicos e testes oftálmicos específicos: Teste Lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1), Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), e Teste de Fluoresceína (TF).

Resultados: Em ambos os grupos de tratamento, os sinais oculares apresentaram melhora até o término do estudo, e a resolução das úlceras de córneas foi mais precoce no grupo PRPHO. 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 significativo ($p < 0,05$) no PRPHO, comparado ao PRPH de M3 a M6.

Conclusão: Conclui-se que ambos os grupos de tratamento da CCS em cães, foram eficazes na melhora dos sinais clínicos e da porção quantitativa e qualitativa da lágrima, mas o grupo PRPHO foi mais eficaz na melhora da qualidade da lágrima e na resolução mais precoce das úlceras de córnea, o que mostra a importância da associação da

suplementação oral com ω -3, para melhorar a eficácia do uso do PRP injetável no tratamento da CCS.

Palavras-chave: ácidos graxos ômega 3, cães, ceratoconjuntivite seca, olho seco, plasma rico em plaquetas homólogo.

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou síndrome do olho seco, é uma condição médica que afeta, principalmente, cães e humanos. A CCS tem como característica inflamação crônica das glândulas lacrimais, levando ao desequilíbrio do filme lacrimal, reduzindo a produção de lágrima (CCS quantitativa) e/ou instabilidade do filme lacrimal, e afeta a qualidade da lágrima (CCS qualitativa) [1][2]. Causa alterações nos olhos afetados, como opacidade da córnea, hiperemia conjuntival, neovascularização e secreção. Em casos graves, pode levar a perda da visão, devido a opacidade, pigmentação ou ulceração da córnea [3]. A causa mais comum de CCS em cães é imunomediada [1,2].

Os testes empregados para diagnóstico da CCS são: teste lacrimal de Schirmer (TLS), teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), teste de lissamina verde (TLV), teste de rosa bengala (TRB), teste do fenol vermelho (TFV) e teste de fluoresceína (TF) para coloração de úlcera na córnea, a avaliação das glândulas de meibômio e do filme lacrimal, histopatologia da conjuntiva ocular e citologia da glândula da terceira pálpebra. O teste quantitativo mais utilizado em medicina veterinária para CCS é o teste de TLS. Mais recentemente, o teste de meniscometria de tira, que avalia a quantidade de lágrima presente no menisco lacrimal, também se tornou um aliado no diagnóstico da CCS em cães, onde a função e a avaliação quantitativamente do volume de lágrimas no menisco lacrimal [5-7]. Os Valores de referência TLS 1 para a classificação da CCS são: 14 a 11mm/min classifica a CCS como discreta, moderada de 10 a 6mm/min e CCS grave de 5 a 0mm/min [5].

O tratamento convencional para CCS é baseado em uma combinação de fármacos que melhoram a lubrificação dos olhos e estimula a produção de lágrima são indicados os fármacos de uso tópico como lágrimas artificiais e os inibidores da calcineurina. Este último, possui efeitos lacrimoestimulantes e imunomoduladores, como o tacrolimus e a ciclosporina A [8-13]. Esses fármacos atuam como imunossupressores da produção de interleucinas-2, comprometendo a formação

da cascata de inflamação e o recrutamento de eosinófilos, reduzindo a inflamação, a liberação de histamina e a produção de prostaglandinas [11,12].

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo no uso de PRP como uma alternativa para terapias oftalmológicas em doenças da superfície ocular. Seu potencial para curar, reparar vários tecidos, despertou interesse em aplicação terapêutica como biomaterial na medicina regenerativa. O potencial terapêutico do PRP na superfície ocular é, devido as altas concentrações de fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblástico (FGF) que aceleram a cicatrização do epitélio da córnea [14-19]. Além desses fatores, contém citocinas, integrinas e vitamina A provenientes das plaquetas, conferindo propriedades de reconstrução e reparação tecidual, contém proteínas bioativas sintetizadas, principalmente, a partir dos alfa-grânulos e plaquetas no sangue, ele possui propriedades imunomoduladoras, é de fácil obtenção, de baixo custo e simples de usar [15-21].

Estudos com plasma rico em plaquetas (PRP) injetável em pacientes humanos com doença do olho seco, mostraram ser eficaz, resultando em aumento da produção de lágrimas, prolongando o tempo de ruptura do filme lacrimal, melhora na acuidade visual e redução dos sinais associados ao olho seco [16]. Em cães com olho seco, alguns estudos também mostraram eficácia no uso injetável de PRP [7]. A eficácia terapêutica do PRP autólogo, no tratamento CCS canino, foram demonstradas em vários estudos por meio de comparação com os atuais protocolos de tratamento desta doença [17-20]. Em um estudo comparando o tacrolimus tópico com o PRP injetável, mostrou que o PRP é uma alternativa viável no tratamento da CCS em cães [7,18].

Em estudos com PRP, mostrou-se ser mais eficaz do que colírio de soro autólogo, na restauração de danos da superfície ocular por CCS moderada a grave, devido à sua maior concentração de fatores de crescimento, anti-inflamatórios como citocinas e outros derivados de plaquetas [21]. Os principais benefícios do PRP são origem autóloga, baixo custo e tempo mínimo de preparo. Plaquetas, fatores de crescimento e citocinas encontradas no PRP promoveu o funcionamento saudável da superfície ocular, otimizando produção lacrimal e na melhoria da qualidade do filme lacrimal, por promover a proliferação, migração e diferenciação de células epiteliais da córnea [21-25].

A obtenção do PRP é por centrifugação de sangue total, que não foi congelado. O importante para a obtenção do PRP é entender que independente da técnica ou protocolo usado para obter o PRP para uso clínico, seu potencial terapêutico pode ser afetado por fatores qualitativos e quantitativos, que variam no produto final [21,26-28].

O PRP pode ser autólogo (do próprio indivíduo), homólogo (da mesma espécie) ou heterólogo (de outra espécie) em origem. As duas últimas formas só são utilizadas quando o PRP autólogo for impossível de ser usado [26]. O PRP é obtido por meio de centrifugação do sangue total do doador, com anticoagulantes, como trombina e citrato de sódio. Isso separa as plaquetas, que ficam suspensas no plasma. Com as plaquetas concentradas, os fatores de crescimento são liberados. Esse processo leva em média uma hora como tempo de preparo [29-31]. A concentração de plaquetas no PRP deve ser de 4 a 7 vezes maior do que no sangue total [32].

Órgãos internacionais classificam o PRP em categorias, PRP, PRP rico em leucócitos (L-PRP), PRP rico em glóbulos vermelhos (Red-PRP), e glóbulos vermelhos e PRP rico em leucócitos (Red-L-PRP) [33]. O PRP utilizado em oftalmologia também é denominado plasma rico em plaquetas oculares [34]. Várias formas farmacêuticas de PRP podem ser preparadas para a terapia ocular, como gotas, injetáveis e formas de coágulo [28,35].

Alguns estudos recentes na Medicina e na Medicina Veterinária, mostraram bons resultados no controle do olho seco com a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6), devido à sua capacidade de produzir mediadores anti-inflamatórios [37-39]. Na Medicina, o uso dos ω -3 e ω -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 [40,41].

Os principais ácidos graxo poliinsaturado (AGP) da família ômega 3, são os ácidos α -linolênico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), sendo o EPA e DHA os principais AGPs ômega-3 que apresentam efeitos terapêuticos em cães, gatos e seres humanos. O ALA é precursor do EPA e DHA. As enzimas Δ -6-desaturase, elongase e Δ -5-desaturase são responsáveis pela conversão do ALA em EPA e a elongase e Δ -4-desaturase na conversão do EPA em DHA [42].

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 ômega-3 [43].

O ácido docosahexaenóico (DHA) tem importante responsabilidade no funcionamento e desenvolvimento da retina [44], e cérebro [45], sendo predominante na maioria das membranas celulares. Na retina, encontra-se ligado aos fosfolípidios, que estão associados a rodopsina, uma proteína que interage no processo de absorção da luz. Seu mecanismo de ação, possivelmente, está relacionado com o aumento na eficiência do processo de transformação da luz e com a regeneração da rodopsina. A diminuição dos níveis desse ácido graxo nos tecidos da retina, tem sido associada, em recém-nascidos, com anormalidades no desenvolvimento do sistema visual, e em adultos com a diminuição da acuidade visual.

Por ser altamente insaturado, o DHA atua influenciando as propriedades físicas das membranas cerebrais, as características de seus receptores, as interações celulares e as atividades enzimáticas [42]. Um dos principais efeitos benéficos dos AGP ômega-3 é reduzir a produção dos mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6), o fator de transcrição kB (NF-kB), e as espécies reativas do oxigênio [46-48].

O presente estudo teve por objetivo avaliar se a suplementação oral de ômega 3, associado ao PRP homólogo, aumentará a eficácia do tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram estudados 44 olhos de 22 cães, de ambos os sexos e variadas raças, com idade $6,8 \pm 3,7$ (1 - 15) anos, e entre $13,3 \pm 11,0$ (3,1 - 43) kg, provenientes da rotina de atendimento do Serviço de Oftalmologia da Clínica Médica de Pequenos Animais, do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente/SP. Os animais foram incluídos no experimento em 2 grupos (grupos de tratamento da CCS). Os animais positivos para CCS foram examinados com

lâmpada de fenda (Kowa SL-15, Japão), e diagnosticados pelos seguintes parâmetros: sinais clínicos oftálmicos compatíveis (pigmentação, neovascularização, secreção ocular, úlcera de córnea e hiperemia/conjuntivite), e por testes oculares como: Teste Lacrimal de Schirmer-1 sem anestésico (TLS-1) (TLS-1 < 15 mm/min) e/ou Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) (TRFL < 20 segundos), e cadastrados sob um termo de autorização (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE), assinado e consentido pelo tutor do animal, e responsáveis pelo projeto. O estudo foi conduzido conforme as normas de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – n. 6433) da UNOESTE e da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology – Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research).

Grupos

Foram utilizados 22 cães distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de tratamento, com 11 animais cada (22 olhos): grupo plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) e grupo plasma rico em plaquetas + ômega 3 oral (PRPHO). Como critério de inclusão, os animais foram avaliados pelo Teste Lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1) e Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), com resultados < 15 mm/min e/ou < 20 segundos, respectivamente, eram admitidos para a pesquisa. Os animais não poderiam estar fazendo uso de qualquer outro tipo de tratamento. Como critérios de exclusão, foi estipulado que animais fazendo uso de colírios a base de tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina A ou qualquer outro imunossupressor, e resultados superior a 15 mm/min no TLS-1 e superior a 20 segundos no TRFL não poderia participar da pesquisa. A dose e a frequência de aplicações utilizadas nos grupos de tratamento foram:

Grupo plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH): 11 cães, (n=22 olhos) com CCS): Atendidos no ambulatório do setor de oftalmologia, com idade $9,7 \pm 4,0$ (5,0 – 15,0) anos, com peso médio de $7,1 \pm 2,4$ (3,6 – 12,1) kg, das seguintes raças, 6 Lhasa Apso, 2 Shi tzu, 2 Yorkshire em 1 Cocker Spaniel, enquanto ao sexo foram, 4 machos e 7 fêmeas. Após a avaliação e diagnosticado CCS, para os animais que apresentavam infecção secundária, iniciou-se o protocolo: No ambulatório

foi instilado 1 gota de colírio anestésico a base de proximetacaína (Colírio Anestalcon[®] - Alcon), com frequência de 3x com intervalo de 5 minutos, em seguida foi administrado, com seringa de 1ml e agulha calibre 0,45x13, 0,3 ml de PRPH, sendo: 0,1 ml na glândula da terceira pálpebra, 0,1 ml na conjuntiva palpebral inferior e 0,1 ml na conjuntiva palpebral superior, de ambos os olhos (fig. 1). Pode ser aplicado até 3 aplicações com intervalo de 30 dias cada, o que determinou a aplicação seguinte foi o resultado dos testes TLS – 1 e TRFL que, se apresentaram melhora não será necessário a segunda ou terceira aplicação. Além disso, foi associado o uso tópico de lubrificante ocular (hialuronato de sódio e carmelose sódica, Vetfresh plus[®] - Pet Society), 1 gota 2x/dia, em ambos os olhos, durante 6 meses.

Grupo plasma rico em plaquetas homólogo associado ao ômega 3 oral (PRPHO): 11 cães, (n=22 olhos) com CCS): Atendidos no ambulatório do setor de oftalmologia da Universidade, com idade entre 6,3±2,8 (3,0 – 12,0) anos, peso 12,5±7,8 (3,1 – 30) kg, sendo 1 Boxer, 1 Fox Paulistinha, 1 Labrador, 1 Poodle, 2 Pug, 2 Shi Tzu e 3 sem raça definida (SRD), 5 machos e 6 fêmeas. Após o diagnóstico de CCS, foi instituído o protocolo: No ambulatório foi, previamente, instilado 1 gota de colírio anestésico a base de proximetacaína (Colírio Anestalcon[®] - Alcon), 3 vezes com intervalo de 5 minutos, em seguida foi administrado, com seringa de um ml e agulha com calibre 0,45x13, 0,3 ml de PRPH, sendo 0,1 ml na glândula da terceira pálpebra, 0,1 ml na conjuntiva palpebral inferior e 0,1 ml na conjuntiva palpebral superior de ambos os olhos (fig. 1), poderia ser aplicado até 3 doses com intervalo de 30 dias cada, o que determinou a aplicação seguinte foi o resultado dos testes TLS – 1 e TRFL que, se apresentasse melhora não seria necessário a segunda ou terceira aplicação. Além disso, foi associado o uso tópico de lubrificante ocular (hialuronato de sódio e carmelose sódica, Vetfresh plus[®] - Pet Society), 1 gota 2x/dia em ambos os olhos, durante 6 meses, e suplementação oral com ômega 3 (Ograx - 3[®], Avert), HPRP 0,3ml + ω -3/1 cápsula oral 500mg/10kg/dia ou 1 cápsula de 1000 mg>10 kg/dia, durante 6 meses.

Quando diagnosticado no momento inicial, infecção secundária e/ou inflamação ocular (conjuntivite e/ou ceratite) foi utilizado colírio antibiótico a base de tobramicina (Tobramicina[®] - Neo Química) (1 gota 4x/dia), e em caso de inflamação ocular colírio anti-inflamatório a base de

diclofenaco de sódio (Still colírio[®] - Allergan) (1 gota 3x/dia) durante 15 dias. Sem a necessidade de ser excluído da pesquisa.

Processamento do Plasma Rico em Plaquetas Homólogo (PRPH)

A preparação do PRPH foi realizada pelo laboratório de análises clínica do hospital veterinário da UNOESTE. A obtenção do plasma rico em plaquetas foi baseada na técnica descrita por Estanho et al. (2023) [7]. Foi utilizado apenas um cão doador, hígado (avaliação clínica e exames laboratoriais dentro dos parâmetros de normalidade), sem raça definida, 7 anos, pesando 34 kg, e coletado 20 ml de sangue total por sistema a vácuo, para cada animal que recebeu a terapia, de maneira estéril, por meio da punção da veia jugular, em tubos estéreis e contendo citrato de sódio 3,2%.

Na primeira etapa, o sangue foi centrifugado a 200 gravidades (G), graduada em 1.100 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos, em uma centrífuga laboratorial (Excelsa[®]/FANEM). A seguir, foram descartados cerca de 30% do plasma superficial, e o conteúdo remanescente foi transferido para um tubo de *Falcon* seco e também estéril.

Na segunda etapa, a parte remanescente, foi centrifugada a 400 G na rotação de 1.500 rpm, por 10 minutos. Nessa etapa, o plasma foi dividido em duas porções, sendo uma delas a porção classificada como plasma rico em plaquetas e a outra porção plasma pobre em plaqueta (PPP). Com dois terços do material sobrenadante descartados (plasma pobre em plaquetas), o terço restante foi classificado como plasma rico em plaqueta. Desse material, foi obtido um volume total de 0,6 mililitros (ml), e que foi aplicado 0,1 ml, instantaneamente na glândula da terceira pálpebra e conjuntivas palpebrais inferior e superior de cada olho, totalizando 0,3ml.

Avaliação dos sinais clínicos

A avaliação dos sinais oftálmicos, foi realizada mensalmente durante 6 meses de tratamento, desde o M0 (momento de diagnóstico da CCS) até o M6 (momento final do tratamento e avaliação da CCS). Os sinais oftálmicos de cada animal, foram avaliados com auxílio da lâmpada de fenda portátil (SL-15, Kowa, Japão) e preenchida uma ficha específica, avaliando a 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

Para o Teste Lacrimal de Schirmer-1 TLS-1, sem anestésico, foi realizada limpeza ocular com algodão seco, para retirada de sujidades locais, e depois introduzindo no saco conjuntival medial 0,5 cm da ponta do papel filtro (Teste de Schirmer[®], Ophthalmos, SP), permanecendo por um tempo de 1 minuto e, assim que retirado a leitura foi feita imediatamente de acordo com a quantidade umedecida do papel filtro. Foram considerados olhos positivos para CCS, aqueles que apresentaram valores de TLS-1 < 15 mm/min [5].

Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), foi instilada 1 gota de fluoresceína 1% colírio (Fludiat[®], 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, com luz de cobalto da lâmpada de fenda portátil, com observação de pequenas manchas. Foram efetuadas duas repetições e a média calculada por meio 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% (Fludiat[®] (Oftalmopharma[®])) sobre a superfície ocular e em seguida, o olho foi lavado com solução fisiológica e examinado com lâmpada de fenda portátil para verificar se houve ou não impregnação do corante na 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 Anestésico[®] (cloridrato de tetracaína a 1% + Cloridrato de fenilefrina a 0.1%, Allergan) para o GPRPH, para o GPRPHO foi o colírio Anestalcon[®] (cloridrato de proximetacaína 5mg/ml - Alcon) 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 e foram instiladas 1 gota de adrenalina (ampola 2ml) e 1 gota de Still[®] 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 escamosas. 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[®] (cloridrato de proximetacaína 5mg/ml - Alcon) em cada olho foram 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 depositada 1 gota de adrenalina e instilada 1 gota do colírio Still[®] (diclofenaco sódico, Allergan) na conjuntiva. Os fragmentos coletados foram fixados em formalina e corados pelas técnicas de hematoxilina eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil) e ácido periódico de Schiff (PAS) (Merck, EUA). Na técnica de coloração com HE, foram avaliadas quantidades de neutrófilos 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. Com relação à variável TF, o teste não

paramétrico de Friedman foi usado para comparar vários pontos no tempo, enquanto o Kruskal-Wallis 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 as plaquetas concentradas, os fatores de crescimentos são liberados, esse processo leva a concentração de plaquetas que deve ser de 4 a 7 vezes maior do que no sangue total. A média inicial da contagem de plaquetas foi 249.154 (160.000 - 350.000/mm³) e, após o processo de preparação, a média final foi de 1.124.192/mm³ (459.000 - 1.771.000/mm³) plaquetas. Com relação ao número de aplicações de PRP necessárias para melhorar os sinais da CCS, no grupo PRPH (11 cães) foram 3 aplicações (36%/4 cães), 2 aplicações (55%/6 cães), e uma aplicação (9%/1 cão) e no grupo PRPHO (11 cães) foram 3 aplicações (18%/2 cães), 2 aplicações (55%/6 cães), e uma aplicação (27%/3 cães). Com relação à reação adversa da aplicação do PRP, em ambos os grupos, do total de 22 cães de cada grupo, somente 1 cão do grupo PRPH (4,5%) e do grupo PRPHO (4,5%) manifestaram reação adversa à aplicação, apresentando edema palpebral após a aplicação, foi utilizado colírio a base de diclofenaco e compressa com gelo para redução do edema que em poucos minutos regrediu.

Nos resultados das medianas do escores de avaliação dos sinais oculares (Tabela 1), ambos os grupos de tratamento, apresentaram melhora dos sinais clínicos, e remissão total dos sinais no M5, a pigmentação da córnea em ambos os grupos apresentou melhora, e remissão total dos sinais a partir do M3, a neovascularização da córnea no grupo PRPH, houve remissão dos sinais a partir do M5, enquanto que no grupo PRPHO a remissão total dos sinais oculares foi mais precoce a partir do M3, a secreção no grupo PRPH apresentou remissão total a partir do M4 enquanto que no grupo PRPHO, a remissão total da secreção foi a partir do M2 e hiperemia conjuntival apresentou remissão total no grupo PRPH a partir do M5, enquanto que no grupo PRPHO a remissão total apresentou remissão total dos sinais precocemente a partir do M2.

As médias e desvio padrão do TLS-1 e TRFL dos grupos PRPH e PRPHO estão descritos na Figura 2. 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 PRPHO comparado ao PRPH de M3 a M6.

Os resultados observados do TF estão descritos na Figura 3, sendo que não houve marcação por fluoresceína no grupo PRPH a partir do M5, enquanto no grupo PRPHO foi mais precoce, até M4. Nos resultados do TF (Figura 3), ambos os grupos apresentaram, inicialmente olhos corados por fluoresceína no M0. O grupo PRPH manteve-se positivo até o M5 e o grupo PRPHO manteve-se positivo até o M4, em ambos os grupos apresentaram resultados negativos no M6, mas o grupo PRPHO apresentou resultados mais precoce.

A Figura 4, representa os resultados sinais clínicos de ambos os grupos no momento inicial (M0), 3 meses após (M3) e no final de 6 meses (M6). Ambos os grupos apresentaram 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 grupo PRPHO houve uma melhora importante na pigmentação da córnea no M6.

A média e desvio padrão da contagem de linfócitos, neutrófilos e células escamosas do exame de citologia aspirativa por gulha fina da glândula da terceira pálpebra, estão descritos na Figura 5. Houve diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem de linfócitos e neutrófilos nos momentos M3 e M6 em relação ao M0, em ambos os grupos, e houve diferença estatística entre os grupos PRPH e PRPHO no M3 e M6, sendo que o grupo PRPHO foi mais significativo a redução do número de linfócitos e neutrófilos. Com relação à contagem das células escamosas, houve diminuição significativa ($p < 0,05$) nos momentos M3 e M6 em relação ao M0, porém não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$) até o M6.

Na Figura 6 estão descritos as média e desvio padrão da contagem de linfócitos, neutrófilos e células calciformes, no exame histopatológico da conjuntiva palpebral inferior. Houve diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem de linfócitos e neutrófilos nos momentos M3 e M6 em relação ao

M0, em ambos os grupos, e houve diferença estatística entre os grupos PRPH e PRPHO no M6, sendo que o grupo PRPHO foi mais significativo a redução do número de linfócitos e neutrófilos. Com relação à contagem das células caliciformes houve aumento significativo ($p < 0,05$) nos momentos M6 em relação ao M0, e houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos PRPH e PRPHO no M6, sendo que o grupo PRPHO foi mais significativo esse aumento.

Os esfregaços das lâminas da citologia aspirativa por agulha fina da glândula da terceira pálpebra, realizado nos momentos M0 (início), M3 (3 meses) e M6 (6 meses) pós tratamento com PRPH e PRPHO do olho direito do animal n. 2 do grupo PRPH, e do olho direito do animal n. 3 do grupo PRPHO, estão demonstrados na Figura 7. Na Fig. 7a (PRPH) e Fig 7d (PRPHO) no M0, há um grande número linfócitos na submucosa da conjuntiva palpebral. Na Fig. 7b (PRPH) e Fig. 7e (PRPHO) no M3, há um moderado número de linfócitos e raras células glandulares. Já no M6 na Fig 7c (PRPH) e Fig. 7f (PRPHO) são visualizadas um pequeno número de linfócitos e neutrófilos e raras células glandulares.

Na Fig. 8 estão mostrados as lâminas de biopsia do estudo histopatológico da conjuntiva palpebral inferior, no momento inicial (M0) e 6 meses pós tratamento (M6), do olho direito do animal n. 2 do grupo PRPH e do olho direito do animal n. 3 do grupo PRPHO. Nas Fig 8a e Fig 8c as lâminas de biopsia (coradas com HE) apresentam um infiltrado inflamatório em submucosa no M0; Fig 8b e Fig 8d apresentam ausência de infiltrado inflamatório no M6. Nas Fig 8e e Fig 8g as lâminas de biopsia (coradas com PAS), apresentam ausência de células caliciformes, com presença de infiltrado inflamatório em submucosa no M0; já nas Fig 8f e Fig 8h há a presença de um grande número de células caliciformes (M6).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que compara o uso do PRPH injetável em cães diagnosticados com CCS, com o PRPH injetável associado à suplementação oral de ômega 3, no intuito de melhorar ou potencializar a terapia celular regenerativa. Por esse motivo a comparação com outros estudos foi muito difícil por não ter tanta literatura a respeito do tema.

O PRP é estável e estéril por algumas horas no estado líquido, isso dificulta muito o processo para obtenção e aplicação do mesmo, sendo necessário utilizá-lo logo após seu preparo. No entanto, é essencial separá-lo do PPP logo após a centrifugação, pois a difusão das plaquetas no PPP reduz a contagem de plaquetas no PRP ao longo do tempo. Isso mantém a eficácia e concentração adequada de plaquetas. No processo de obtenção do PRP, a concentração média final de plaquetas obtida neste estudo ($1.124.192/\text{mm}^3$) ficou acima de um milhão de plaquetas como relatado por outros estudos [7,32].

Estanho et al [7] citaram que o tratamento com PRPH injetável requer em média duas a três aplicações, e que somente 1 cão (9%) apresentou sucesso terapêutico com apenas uma aplicação, o que está de acordo com o presente estudo, porém, a associação de ômega 3 ao PRPH aumentou o número de cães com somente uma aplicação (27%/3 cães), o que sugere um aumento da eficácia com a suplementação de ômega 3 ao tratamento com PRPH. A aplicação injetável de PRP na glândula da terceira pálpebra, conjuntiva palpebral superior e inferior se mostrou segura, com apenas 2 cães (1 animal no grupo PRPH e 1 animal no grupo PRPHO) que apresentaram reações leves de hipersensibilidade, de modo similar descrito por outros autores [7,49].

Ambos os grupos de tratamento apresentaram melhora dos sinais clínicos oculares (Tabela 1) e cicatrização das úlceras de córnea, porém o grupo suplementado com ômega 3 mostrou essa melhora mais precoce. O ômega 3 é rico em EPA e DHA. O EPA tem efeito pró-inflamatório exercendo ações celulares que estimulam a produção de colagenase e aumentam a expressão de moléculas de adesão necessárias ao extravasamento de leucócitos. O EPA é o 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, incluindo a redução de leucócitos pró-inflamatórios e migração de citocinas, levando assim à diminuição da resposta inflamatória in vivo [47,48].

O DHA também pode originar às resolvinas D1 (RvD1) e D2 (RvD2), uma protectina (ou neuroprotectina, quando produzida pelos tecidos neurais) e uma maresina, tendo assim uma importante função anti-inflamatória nos sistemas neuronais e na formação, desenvolvimento e funcionamento do

cérebro e da retina [44-48]. Silva et al. 2018 [38] 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 PRPH injetável.

Com relação à melhora da quantidade da lágrima avaliada pelo TLS-1, os resultados obtidos são similares aos descritos por Estanho et al. [7] que relataram aumento dos valores em relação ao início do tratamento, porém quando comparado ao uso do tacrolimus, este foi mais eficiente. No presente estudo, também há um aumento significativo quando comparado ao início, porém não há diferença significativa entre os grupos PRPH e PRPHO. Porém, quando observamos a qualidade da lágrima aferida pelo TRFL, o presente estudo mostra 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. 2018 [38].

A melhora da qualidade da lágrima pode, também está de acordo com a melhora dos sinais clínicos e resolução mais precoce das úlceras de córnea, potencializando o efeito de regeneração da córnea do PRP [8,14,19]. Além disso, ao aumento significativo do número de células caliciformes responsáveis pela produção de mucina [1,2] colabora com a melhora da qualidade da lágrima observada neste estudo com os valores de TRFL maiores e mais significativos no grupo PRPHO.

Nos resultados da citologia e da histopatologia houve uma diminuição significativa na contagem de linfócitos e neutrófilos, em ambos os grupos, e houve diferença estatística entre os grupos PRPH e PRPHO, sendo que o grupo PRPHO foi mais significativo essa redução, estando de acordo com outros estudos [7, 38], esse efeito pode estar relacionado à ação do EPA proveniente do ômega 3 [38] como anti-inflamatório natural devido as resolvinas RvE1 que ativa macrófagos e sua atividade fagocítica potencializando a ação do PRP [7] que também possui atividade anti-inflamatória.

Houve uma diminuição maior do processo inflamatório tanto nos achados da citologia quanto na histopatologia, com a associação dos ômega 3, e também um aumento maior de células caliciformes.

O atual estudo sugere um efeito sinérgico do PRP, com suas altas concentrações de TGF- β , VEGF e FGF. O atual estudo sugere um efeito sinérgico do PRP, com suas altas concentrações de

TGF-B, VEGF e FGF que aceleram a cicatrização do epitélio da córnea [14], além de suas proteínas bioativas sintetizadas principalmente a partir dos alfa-grânulos e plaquetas no sangue, com propriedades imunomoduladoras [15-19], 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 [38-42]. que aceleram a cicatrização do epitélio da córnea [14], além de suas proteínas bioativas sintetizadas principalmente a partir dos alfa-grânulos e plaquetas no sangue, com propriedades imunomoduladoras [15-19], 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 [38-42].

CONCLUSÃO

Conclui-se que ambos os grupos, PRPH e PRPHO, no tratamento da CCS em cães foram eficazes na melhora dos sinais clínicos e da porção quantitativa da lágrima, mas o grupo PRPHO foi mais eficaz na melhoria da qualidade da lágrima, na resolução mais precoce das úlceras de córnea, na redução do número de aplicações de PRP, e na redução dos linfócitos e neutrófilos, o que mostra a importância da associação da suplementação por via oral de ômega 3 para melhorar a eficácia da terapia celular regenerativa com PRP injetável no tratamento da CCS em cães.

Agradecimentos – 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 pela doação do ômega 3 e Pet Society pela doação dos colírios utilizados neste estudo.

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

REFERÊNCIAS

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. Stevenson, W., Chauhan, S.K. and Dana, R. (2012) Dry eye disease: An immune-mediated ocular surface disorder. *Arch. Ophthalmol.*, 130(1): 90–100..
3. Vatnikov, Y.A., Erin, I.S., Suleimanov, S.M., Kulikov, E.V., Seleznev, S.B., Lutsay, V.I., et al. (2020) Effect of Autologous Plasma Treatment on the Cornea Regeneration with Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs. *Journal of Animal Health and Production*. 8 (1),
4. Dees, D.D. and Kent, M.S. (2020) Efficacy of adjunctive therapy using Vizoovet in improving clinical signs of keratoconjunctivitis sicca in dogs: A pilot study. *Veterinary Ophthalmology*. 23 (4), 632–639.
5. Featherstone, H.J. Heinrich, C.L. Ophthalmic Examination and Diagnostics. In: GELATT, K.N., GILGER, B.C. and KERN, T.J. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: John Wiley & Sons, 2013, p. 533-613.
6. Nascimento, F.F., Passareli, J.V.G.C., Zulim, L.F.D.C., Silva, D.A., Giuffrida, R., Estanho, G.J.G., et al. (2023) Comparison of strip meniscometry and Schirmer tear test results and tear film breakup time between healthy dogs and dogs with dry eye disease. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 86 (4),.
7. Estanho, G.J.G., Passareli, J.V.G.C., Pando, L.D.S., Vieira, D.E., Nai, G.A., Santarém, C.L., et al. (2023) Comparison of topical 0.03% tacrolimus and homologous injectable platelet-rich plasma in the treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Veterinary World*. 134–143.
8. Merlini, N.B., Fonzar, J.F., Perches, C.S., Sereno, M.G., Souza, V.L., Estanislau, C.A., et al. (2014) Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66 (6), 1742–1750
9. Lemp, M.A., Bron, A.J., Baudouin, C., Benítez Del Castillo, J.M., Geffen, D., Tauber, J., et al. (2011) Tear Osmolarity in the Diagnosis and Management of Dry Eye Disease. *American Journal of Ophthalmology*. 151 (5), 792-798.e1.
10. Izci, C., Celik, İ., Alkan, F., Erol, M., and Sur, E. (2015) Clinical and light microscopic studies of the conjunctival tissues of dogs with bilateral keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. *Biotechnic & Histochemistry*. 90 (3), 223–230.

11. Radziejewski, K. and Balicki, I. (2016) Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Veterinaria Hungarica*. 64 (3), 313–329.
12. Zhao, M., He, F., Yang, Y., Lin, W., Qiu, W., Meng, Q., et al. (2022) Therapeutic efficacy of tacrolimus in vernal keratoconjunctivitis: a meta-analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Hospital Pharmacy*. 29 (3), 129–133.
13. Radziejewski, K. and Balicki, I. (2016) Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Veterinaria Hungarica*. 64 (3), 313–329.
14. Sharun, K., Chandran, D., Manjusha, K.M., Mankuzhy, P.D., Kumar, R., Pawde, A.M., et al. (2023) Advances and prospects of platelet-rich plasma therapy in veterinary ophthalmology. *Veterinary Research Communications*.
15. Farghali, H.A., AbdElKader, N.A., AbuBakr, H.O., Ramadan, E.S., Khattab, M.S., Salem, N.Y., et al. (2021) Corneal Ulcer in Dogs and Cats: Novel Clinical Application of Regenerative Therapy Using Subconjunctival Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma. *Frontiers in Veterinary Science*. 8 641265.
16. Alio, J.L., Rodriguez, A.E., Ferreira-Oliveira, R., Wróbel-Dudzińska, D., and Abdelghany, A.A. (2017) Treatment of Dry Eye Disease with Autologous Platelet-Rich Plasma: A Prospective, Interventional, Non-Randomized Study. *Ophthalmology and Therapy*. 6 (2), 285–293.
17. Avila, M.Y., Igua, A.M., and Mora, A.M. (2018) Randomised, prospective clinical trial of platelet-rich plasma injection in the management of severe dry eye. *The British Journal of Ophthalmology*. [bjophthalmol-2018-312072](https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312072).
18. Tanidir, S.T., Yuksel, N., Altintas, O., Yildiz, D.K., Sener, E. and Caglar, Y. (2010) The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea*, 29(6): 664–669.
19. Alio, J.L., Rodriguez, A.E., and WróbelDudzińska, D. (2015) Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders: *Current Opinion in Ophthalmology*. 26 (4), 325–332.

20. Erin, I.S., Vatnikov, Y.A., Sakhno, N.V., Kulikov, E.V., and Voronina, Y.Y. (2017) *Complex therapy of dry keratoconjunctivitis of dogs using autologous plasma enriched with thrombocytes. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* 66 (6), 374–379.
21. Panda, B.B., Mohapatra, S., and Parida, S. (2020) Update on the role of Eye platelet-rich plasma (E-PRP) in the treatment of ocular surface disorders. *Indian Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology.* 6 (4), 487–496.
22. Alio, J.L., Abad, M., Artola, A., Rodriguez-Prats, J.L., Pastor, S., and Ruiz-Colecha, J. (2007) Use of Autologous Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Dormant Corneal Ulcers. *Ophthalmology.* 114 (7), 1286-1293.e1.
23. Ribeiro, M.V.M.R., Barbosa, F.T., Ribeiro, L.E.F., Lacet, C.M.C., Lyra, J.M.D.A.G., Guedes, V.D.L., et al. (2016) Platelet-rich plasma in diabetic dry eye disease. *Revista Brasileira de Oftalmologia.* 75.
24. 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. *International Journal of Molecular Sciences.* 18 (11), 2264.
25. Edelman, M.L., Mohammed, H.O., Wakshlag, J.J., and Ledbetter, E.C. (2018) Clinical trial of adjunctive autologous platelet-rich plasma treatment following diamond-burr debridement for spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 253 (8), 1012–1021.
26. Wu, T.E., Chen, C.J., Hu, C.-C., and Cheng, C.-K. (2015) Easy-to-prepare autologous platelet-rich plasma in the treatment of refractory corneal ulcers. *Taiwan Journal of Ophthalmology.* 5 (3), 132–135.
27. Sharun, K. and Pawde, A.M. (2020) Platelet-rich plasma for hip osteoarthritis: comparing the variables in production protocol and composition. *Clinical Rheumatology.* 39 (12), 3899–3901.
28. Sharun, K. and Pawde, A.M. (2021) Variables affecting the potential efficacy of platelet-rich plasma in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 84 (1), e47–e48.
29. DUSSE, L.M.S., MACEDO, A.P., BATSCHAUER, A.P., and CARVALHO, M.G., M.G. (2008) Plasma rico em plaquetas (PRP) e sua aplicação em odontologia. 40 193–197.

30. Dohan Ehrenfest, D.M., Rasmusson, L., and Albrektsson, T. (2009) Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 27 (3), 158–167.
31. Sant'Anna, R.C.D.A. (2018) Fibrina rica em plaquetas e leucócitos versus plasma rico em plaquetas: propriedades e aplicação clínica. *Revista Naval de Odontologia*. 45 (1), 62–68.
32. Marx, R.E. (2001) Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP?: *Implant Dentistry*. 10 (4), 225–228.
33. Harrison, P., Alsousou, J., Andia, I., Burnouf, T., Dohan Ehrenfest, D., Everts, P., et al. (2018) The use of platelets in regenerative medicine and proposal for a new classification system: guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 16 (9), 1895–1900.
34. Rodríguez, A.E. and Alió, J.L. (2019) Eye Platelet-Rich Plasma (E-PRP) for Corneal Regeneration. in: J.L. Alió, J.L. Alió Del Barrio, F. Arnalich-Montiel (Eds.), *Corneal Regeneration*, Springer International Publishing, Champp. 317–345.
35. Seven Mustafa and Mehandzhiyski, N. (2021) APPLICATION OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) IN CORNEAL LESIONS – A REVIEW.
36. Barabino, S., Rolando, M., Camicione, P., Ravera, G., Zanardi, S., Giuffrida, S., et al. (2003) Systemic Linoleic and γ -Linolenic Acid Therapy in Dry Eye Syndrome With an Inflammatory Component: *Cornea*. 22 (2), 97–101.
37. 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. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*. 3 (1), 4.
38. 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. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 81 (5).
39. Rashid, S. (2008) Topical Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids for Treatment of Dry Eye. *Archives of Ophthalmology*. 126 (2), 219.

40. 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.
41. 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.
42. 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. *Revista de Nutrição*. 19 (6), 761–770.
43. Lenox, C.E. and Bauer, J.E. (2013) Potential Adverse Effects of Omega-3 Fatty Acids in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 27 (2), 217–226.
44. 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 American Journal of Clinical Nutrition*. 83 (6), 1458S-1466S.
45. Wurtman, R.J. (2008) Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents. *Metabolism*. 57 S6–S10.
46. Hodge, W.G., Schachter, H.M., Barnes, D., Pan, Y., Lowcock, E.C., Zhang, L., et al. (2006) Efficacy of ω -3 Fatty Acids in Preventing Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 113 (7), 1165–1173.
47. 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. *The Journal of Experimental Medicine*. 201 (5), 713–722.
48. Bannenberg, G.L. (2010) Therapeutic Applicability of Anti-Inflammatory and Proresolving Polyunsaturated Fatty Acid-Derived Lipid Mediators. *The Scientific World JOURNAL*. 10 676–712.
49. Latalski, M., Walczyk, A., Fatyga, M., Rutz, E., Szponder, T., Bielecki, T. and Danielewicz, A. (2019) Allergic reaction to platelet-rich plasma (PRP): Case report. *Medicine (Baltimore)*, 98(10): e14702.

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

		M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Pigmentação da córnea	PRPH	1	1	1	0	0	0	0
	PRPHO	2	1	1	0	0	0	0
Neovascularização da córnea	PRPH	1	1	1	1	1	0	0
	PRPHO	2	1	1	0	0	0	0
Secreção	PRPH	1	1	1	1	0	0	0
	PRPHO	1	1	0	0	0	0	0
Hiperemia conjuntival	PRPH	2	1	1	0	1	0	0
	PRPHO	2	1	0	0	0	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.

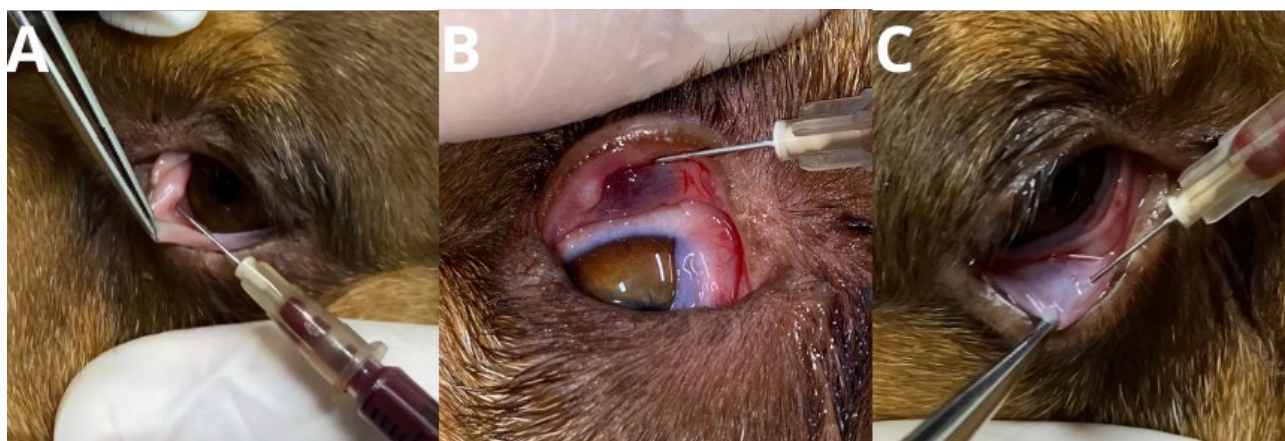


Figura 1. Pontos de aplicações do PRPH. A – Glândula da terceira pálpebra, B – Conjuntiva palpebral superior e C – Conjuntiva palpebral inferior.

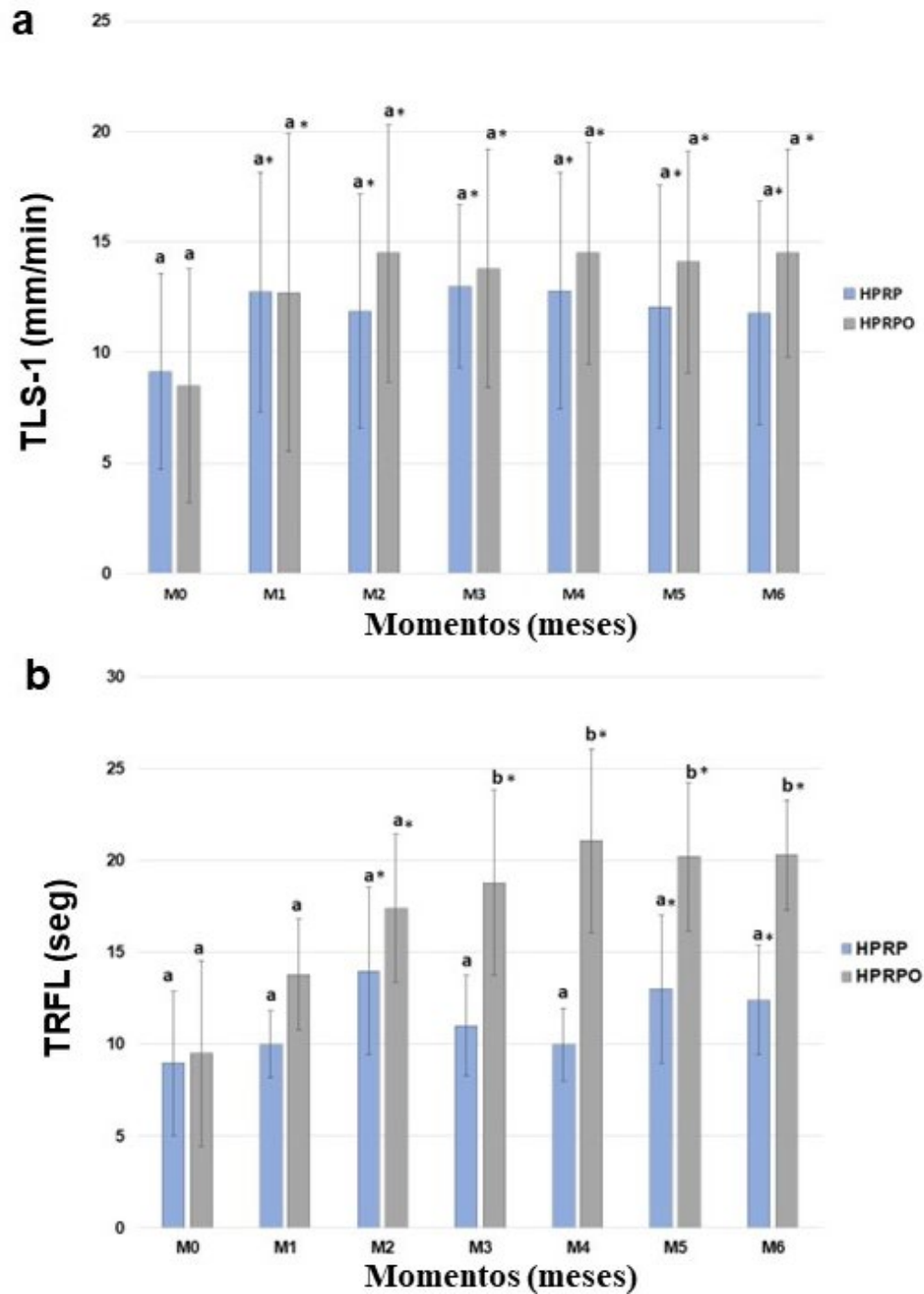


Figura 2. Média e desvio padrão dos testes oculares: (a) teste lacrimal de Schirmer-1 (TLS-1) em mm/min, (b) teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos do grupo plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) e do grupo plasma rico em plaqueta homólogo + ômega 3 oral (PRPHO) nos momentos inicial (M0), e a cada 30 dias, do momento 1 (M1) ao momento 6 (M6).

*= $p < 0,05$ (teste de Tukey para comparação de momentos com M0)

^{a,b}= $p < 0,05$ (teste de Kruskal–Wallis para comparação de grupos em cada momento)

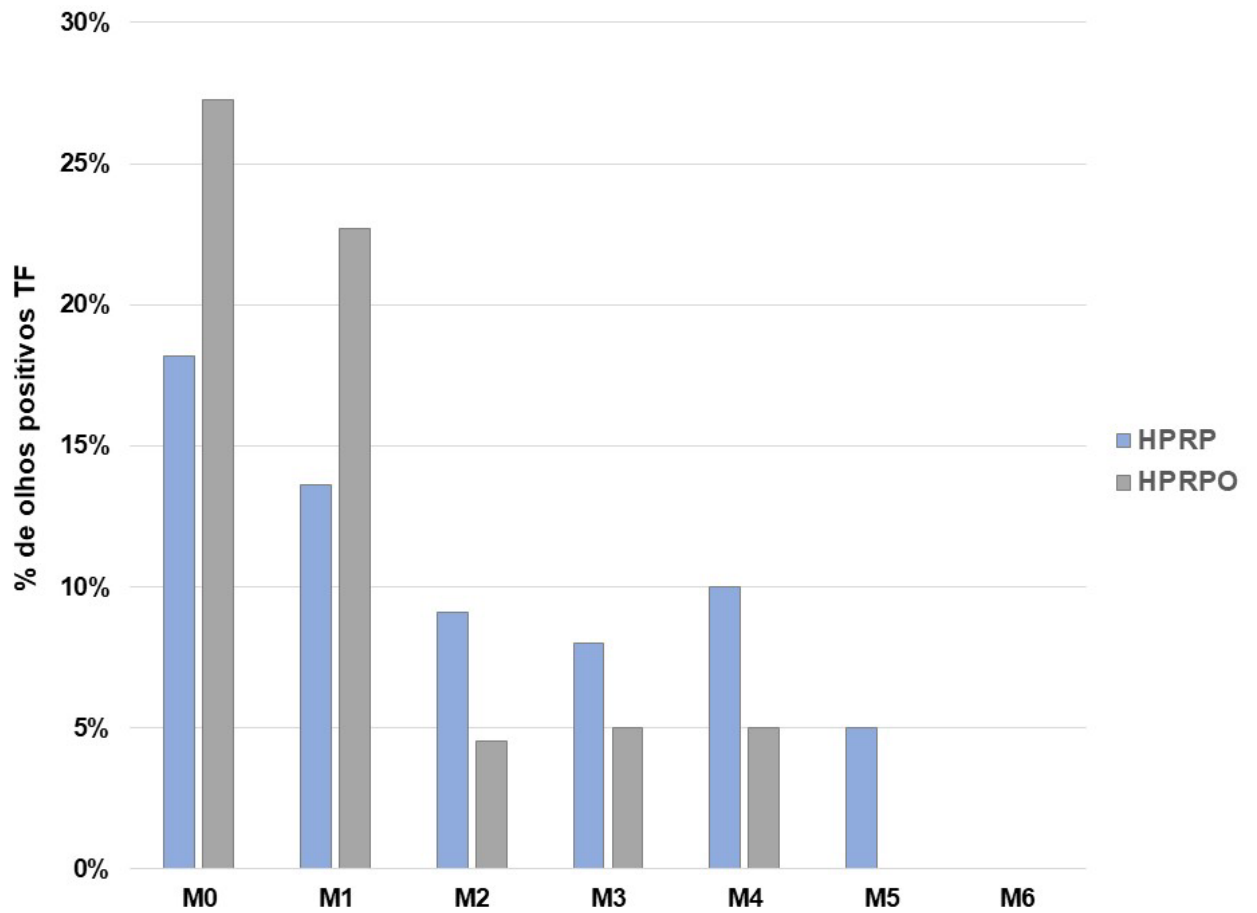


Figura 3. Percentual de cães com CCS (n=22) nos grupos plasma rico em plaquetas homólogo (PRPH) e plasma rico em plaquetas homólogo associado a ω -3 oral (PRPHO) que tiveram os olhos corados no teste de fluoresceína (TF) nos momentos M0 a M6.

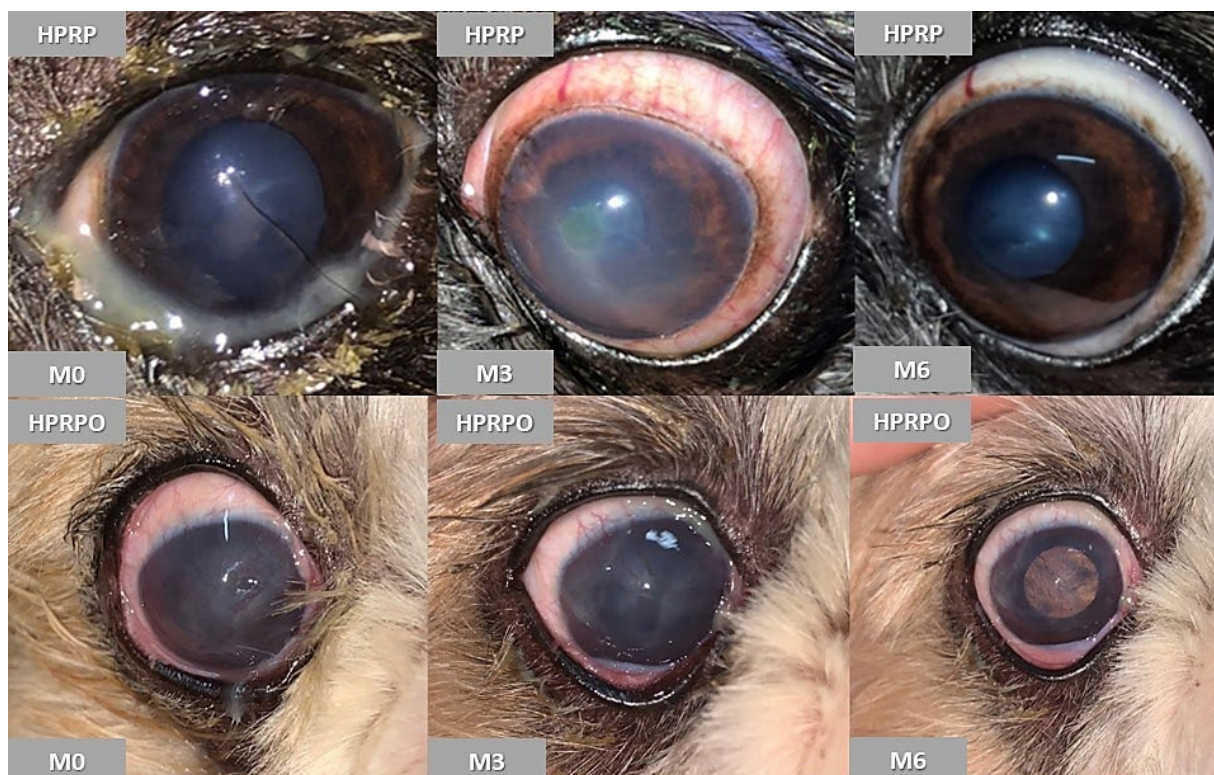


Figura 4. Grupo PRPH (cão n. 1) (2 aplicações de PRPH) e grupo PRPHO (cão n. 10) (2 aplicações de PRPH + 6 meses de ômega 3 oral) nos momentos inicial (M0), 3 meses após (M3) e no final de 6 meses (M6).

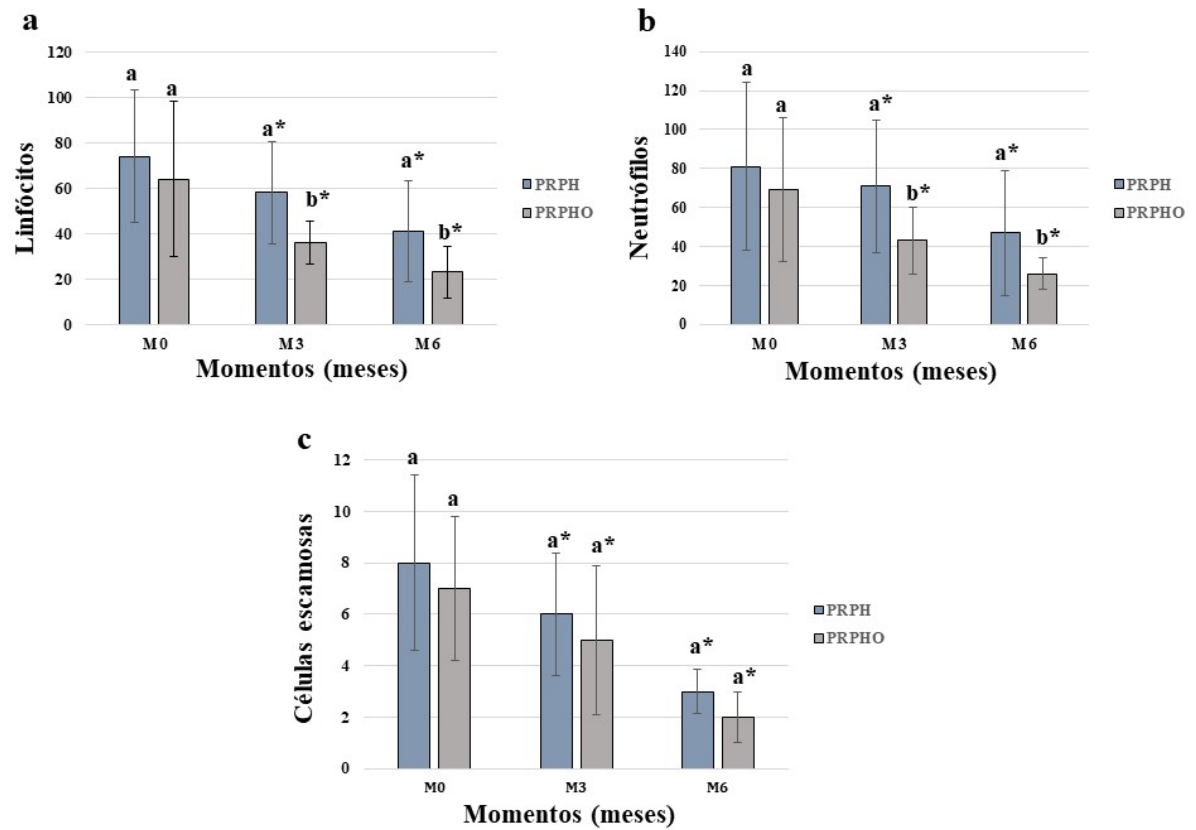


Figura 5. Média e desvio padrão da contagem de (a) linfócitos, (b) neutrófilos e (c) células escamosas, no exame citológico da glândula da terceira pálpebra realizado nos momentos M0 (início), M3 (3 meses) e M6 (6 meses) pós tratamento com PRPH e PRPHO.

*= $p < 0,05$ (teste de Tukey para comparação de momentos com M0)

^{a,b}= $p < 0,05$ (teste de Kruskal–Wallis para comparação de grupos em cada momento)

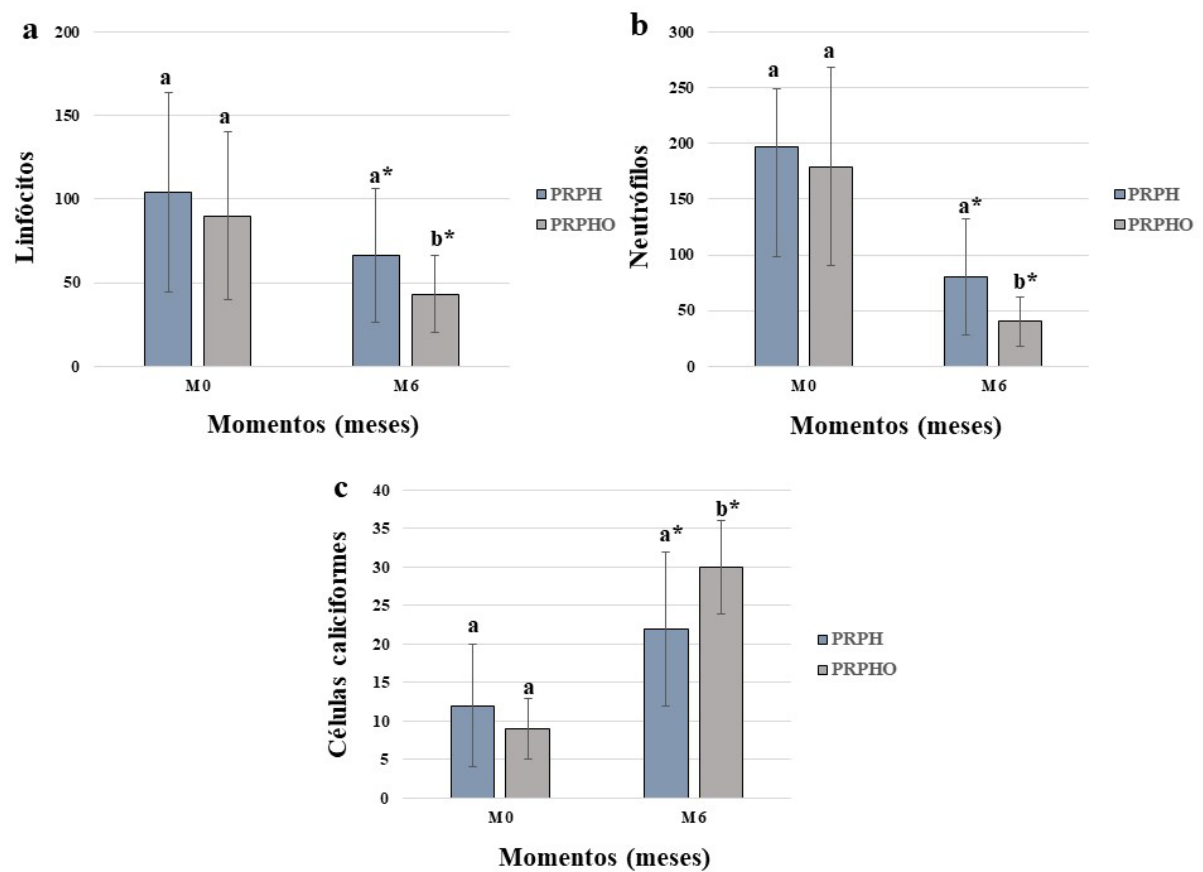


Figura 6. Média e desvio padrão da contagem de (a) linfócitos, (b) neutrófilos e (c) células calciformes, no exame histopatológico da conjuntiva palpebral inferior realizado nos momentos M0 (início) e M6 (6 meses) pós tratamento com PRPH e PRPHO.

*= $p < 0,05$ (teste de Tukey para comparação de momentos com M0)

^{a,b}= $p < 0,05$ (teste de Kruskal–Wallis para comparação de grupos em cada momento)

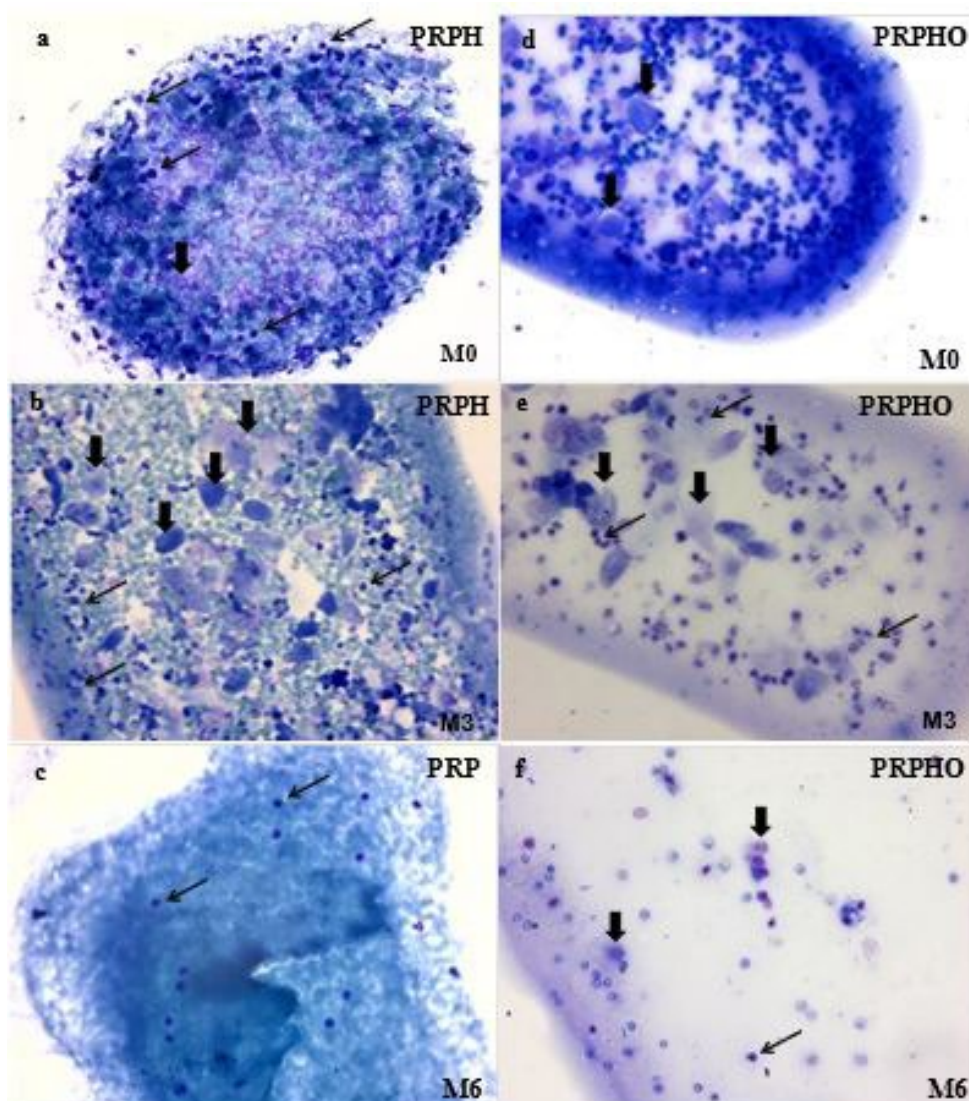


Figura 7. Citologia aspirativa por agulha fina da glândula da terceira pálpebra realizado nos momentos M0 (início), M3 (3 meses) e M6 (6 meses) pós tratamento com PRPH e PRPHO do olho direito do animal n. 2 do grupo PRPH e do olho direito do animal n. 3 do grupo PRPHO. Esfregaços das lâminas apresentando: (a) e (d) – Grande número linfócitos. (b) e (e) – Moderado número de linfócitos e raras células glandulares. (c) e (f) – Pequeno número de linfócitos e neutrófilos e raras células glandulares. Setas finas: células inflamatórias (linfócitos e neutrófilos). Setas grossas: células glandulares. Giemsa, aumento de 400x.

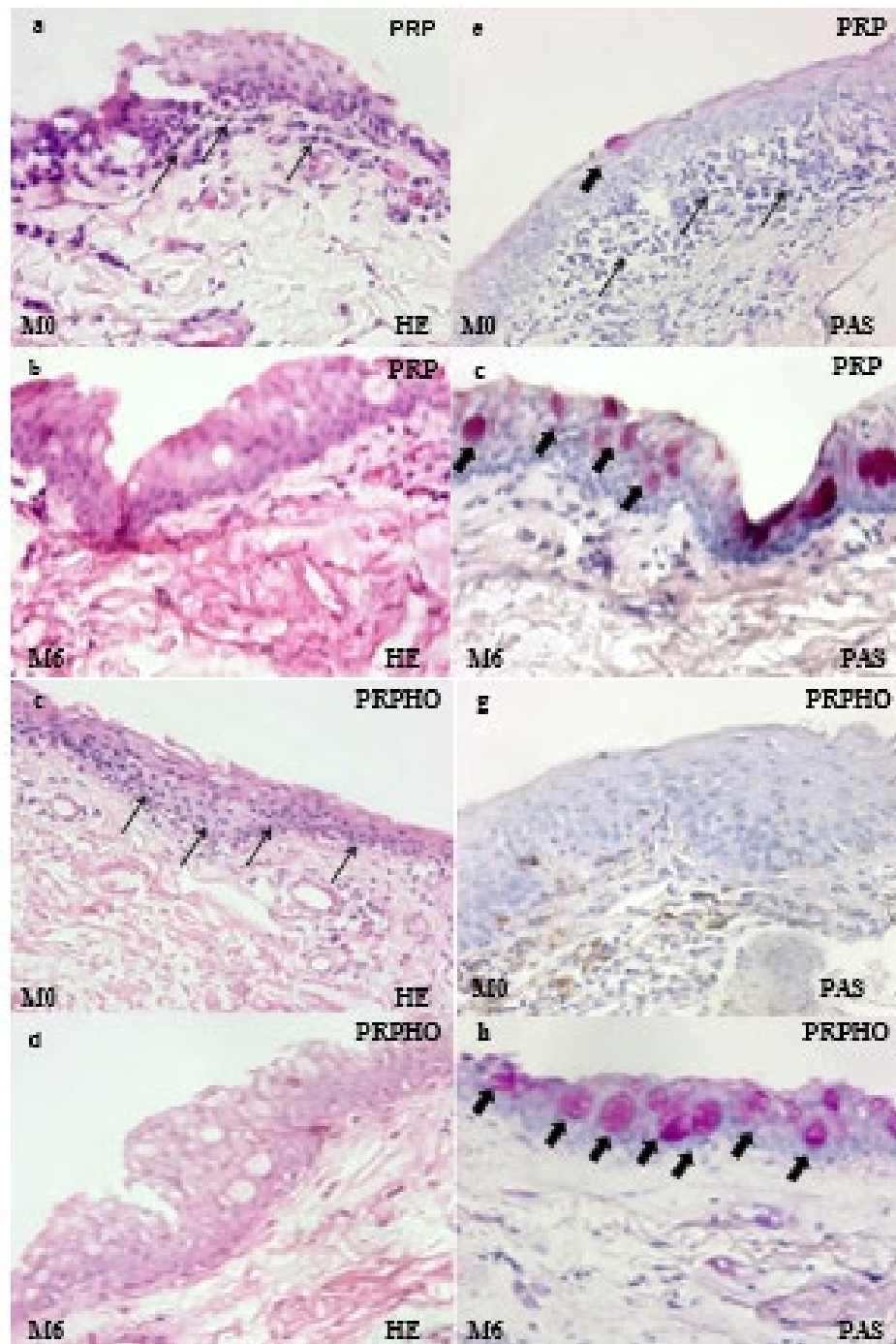


Figura 8. Histopatologia da conjuntiva palpebral inferior dos Grupos PRPH e PRPHO no momento inicial (M0) e 6 meses pós tratamento (M6) do olho direito do animal n. 2 do grupo PRPH e do olho direito do animal n. 3 do grupo PRPHO. Lâminas de biopsia coradas com HE (Hemacilina-eosina) aumento de 400x apresentando: (a) e (c) – Infiltrado inflamatório em submucosa (setas finas) (M0); (b) e (d) – Ausência de infiltrado inflamatório (M6). Lâminas de biopsia coradas com PAS aumento de 400x apresentando: (e) e (g) – Ausência de células caliciformes, com presença de infiltrado inflamatório em submucosa (setas finas) (M0); (f) e (h) – Grande número de células caliciformes (setas largas) (M6).

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

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 PLASMA RICO EM PLAQUETAS INJETÁVEL ASSOCIADO OU NÃO COM ÔMEGA 3 ORAL NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6433 e tendo como participante(s) JOAO VICTOR GOULART CONSONI PASSARELI (discente), GIOVANA JOSE GARCIA ESTANHO (discente), HELENA BORGES VICENTE (discente), GISMELLI CRISTIANE ANGELUCI (discente), LETICIA DA SILVA PANDO (discente), DANIEL ESPINHOSA VIEIRA (discente), 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: 08/2020 a 01/2022.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
canino	15	10 quilos	5 anos	M	ATENDIMENTO ABULATORIAL HV
canino	15	10 quilos	5 anos	F	ATENDIMENTO ABULATORIAL HV

Presidente Prudente, 26 de Abril de 2021.

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

Prof. 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
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA 183229-2079 ceua@unoeste.br

Coordenadora da CEUA - UNOESTE valide este documento em www.unoeste.br/spp informando o código de segurança a46f3d6c0bf6e8e4d90e246536f1e0b3

**ANEXO B - QR CODE DOS 3 PONTOS DE APLICAÇÃO DO PRPH EM 1 CÃO COM
CCS DO ESTUDO**



ANEXO C - NORMA DA REVISTA VETERINARY WORLD



Veterinary World
— Open access and peer reviewed journal —

ISSN (Online): 2231-0916
ISSN (Print): 0972-8988

Home Editorial Board For authors ▾ FAQ For reviewers ▾ Archive Policies

Instructions to 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.

PUBLICATION ETHICS AND MALPRACTICE STATEMENT

Veterinary World's Publication Ethics and Publication Malpractice Statement is based, in large part, on the guidelines and standards developed by the Committee on Publication Ethics (COPE). The relevant duties and expectations of authors, reviewers, and editors of the journal are set out below.

Responsibilities of authors

Responsibilities of authors

By submitting a manuscript to Veterinary World, the author(s) warrant that the manuscript is their own, original work and that it has neither been published previously nor is currently being considered for publication elsewhere. They also warrant that the sources of any ideas and/or words in the manuscript that are not their own have been properly attributed through appropriate citations and/or quotes. An author should not normally publish manuscripts describing essentially the same research in multiple journals or publication venues. Such redundant publication is generally considered to constitute unethical publishing behavior, and if discovered may result in a manuscript under consideration being rejected, or a published article being retracted. Authors of manuscripts reporting on original research should present an accurate account of the work performed, accompanied by an objective discussion of its significance. Underlying data should be represented accurately in the manuscript. The manuscript should contain sufficient detail and references to permit others to replicate the work. The fabrication of results and the making of fraudulent or knowingly inaccurate statements constitute unethical behavior and may be cause for rejection or retraction of a manuscript or published article. Where the manuscript reports on commercial software, hardware, or other products, authors must include a declaration at the beginning of the manuscript in which they must either state that no conflict of interest exists or describe the nature of any potential conflict. All sources of financial support for the research should also be disclosed in the manuscript. The author(s) of a manuscript agree that if the manuscript is accepted for publication in Veterinary World, the published article will be copyrighted using a Creative Commons "Attribution-Non Commercial-Share Alike" license. This license allows the author(s) to retain the copyright, but also allows others to freely copy, distribute, and display the copyrighted work, and derivative works based upon it, under certain specified conditions. Authors are responsible for obtaining written permission to include any images or artwork for which they do not hold copyright in their articles, or to adopt any such images or artwork for inclusion in their articles. The copyright holder must be made explicitly aware that the image(s) or artwork will be made freely available online as part of the article under a Creative Commons "Attribution-Non Commercial-Share Alike" license. The authors' names should be listed on the article in order of their contribution to the article, and all authors take responsibility for their own contributions. Only those individuals who have made a substantive contribution should be listed as authors; those whose contributions are indirect or marginal (e.g., colleagues or supervisors who have reviewed drafts of the work or provided proofreading assistance, and heads of research institutes/centers/labs) should be named in an "Acknowledgments" section at the end of the article, immediately preceding the Reference List. The corresponding author must ensure that all appropriate co-authors and no inappropriate co-authors are included on the article, and that all listed co-authors have seen and approved the final version of the article and agreed to its publication. Where an author discovers a significant error or inaccuracy in an article of his/hers that has been published in Veterinary World, he/she has an obligation to promptly notify the editors and cooperate with them to correct the article or retract it as appropriate.

Responsibilities of reviewers

Veterinary World's reviewers perform work for the journal on a volunteer basis. Given that most of these individuals are in full-time employment, their reviewing activities for Veterinary World must, by necessity, not be their top priority. Reviewers are free to decline invitations to review particular manuscripts at their discretion, for example, if their current employment workload and/or other commitments make it prohibitive for them to complete a review in a timely fashion and to do justice to the task in the available time frame. They should also not accept manuscript review assignments for which they feel unqualified. Reviewers who have accepted manuscript assignments are normally expected to submit their reviews within three weeks (20 days). They should recuse themselves from the assignment if it becomes apparent to them at any stage that they do not possess the required expertise to perform the review, or that they may have a potential conflict of interest in performing the review (e.g., one resulting from competitive, collaborative, or other relationships or connections with any of the authors, institutions, or companies associated with the manuscript). Privileged information or ideas obtained by reviewers through the peer review process must be kept confidential and not used for personal advantage. Any manuscripts received for review must be treated as confidential documents, and must not be shown to or discussed with others except as authorized by Veterinary World Journal Editor. When conducting their reviews, reviewers are asked to do so as objectively as possible, refraining from engaging in personal criticism of the author(s). They are encouraged to express their views clearly, explaining and justifying all recommendations made. They should always attempt to provide detailed and constructive feedback to assist the author(s) in improving their work, even if the manuscript is, in their opinion, not publishable. Reviewers should identify in their reviews relevant published work that has not been cited by the author(s), together with any instances in which proper attribution of sources has not been provided. They should call to the responsible editor's attention any major resemblances between a manuscript under consideration and other published articles or papers of which they are aware, as well as any concerns they might have in relation to the ethical acceptability of the research reported in the manuscript.

Responsibilities of editors

Veterinary World has ultimate responsibility for deciding if a manuscript submitted to Veterinary World should be published, and in doing so is guided by the journal's policies as determined by Veterinary World editorial board and constrained by such legal requirements as shall then be in force regarding libel, copyright infringement, and plagiarism. The Editor may consult with the Associate Editor and other members of the editorial team, as well as with reviewers, in making publication decisions. The editors will evaluate manuscripts for their intellectual content without regard to the race, color, gender, sexual orientation, religious beliefs, ethnic origin, citizenship, or political philosophy of the author(s). They will not disclose any information about a manuscript under consideration to anyone other than the author(s), reviewers and potential reviewers, and in some instances Veterinary World editorial board members, as appropriate. Additionally, the editors will make every effort to ensure the integrity of the blind review process by not revealing the identity of the author(s) of a manuscript to the reviewers of that manuscript, and vice versa. When evaluating a manuscript for publication, in addition to considering standard criteria pertaining to the rigor of the manuscript, the quality of its presentation, and its contribution to humanity's stock of knowledge, the editors will also seek evidence that ethical harms have been minimized in the conduct of the reported research. They will question whether the benefits outweigh the harms in the particular study's case. Since Veterinary World welcomes the submission of manuscripts from any country, it is necessary to recognize that laws and regulations regarding research ethics and ethical approval vary worldwide. As such, the editors may need to seek clarification in this regard with the author(s) and request that they supply a letter from the relevant institutional ethics committee or board that approved the research. The editors will be guided by COPE's Guidelines for Retracting Articles when considering retracting, issuing an expression of concern about, and issuing corrections pertaining to articles that have been published in Veterinary World. They are committed to working closely with research organizations and institutions in line with COPE's advice on Cooperation between Research Institutions and Journals on Research Integrity Cases.

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 (<https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/NC3Rs%20ARRIVE%20Guidelines%202013.pdf>) 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.

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 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, 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., Callia, 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 or click the submit your manuscript link from 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 before contacting the editorial office.

Editorial Office contact person: Dr. Anjum Sherasiya, e-mail: editorveterinaryworld@gmail.com

Online Submission:

To submit a manuscript, please follow the instructions below:

- Launch your web browser and go to www.ejmanager.com or click on the link submit your manuscript at 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 700 for developing or underdeveloped countries (Low income countries). Category-2: USD 900 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 15-03-2021

Site Links

Editorial board	FAQ
Instruction for authors	Reviewer guidelines
Author declaration certificate	Open access policy
Tutorial for online submission	Most cited articles
Manuscript template	Archive
Submit your manuscript	

Editorial Office

Veterinary World, Star, Gulshan Park, NH-8A, Chandrapur Road,
Wankaner - 363621, Dist. Morbi (Gujarat), India
E-mail: editorveterinaryworld@gmail.com
Website: www.veterinaryworld.org

Editor-in-Chief

Dr. Anjum V. Sherasiya
E-mail: editorveterinaryworld@gmail.com

Publisher: Veterinary World, E-mail: veterinaryworldpublisher@gmail.com

Designed By [Madni Infoway](#)