

**USO DE ÓLEO DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM  
COELHOS**

**MAGDA LUZIA NEVES**

**USO DE ÓLEO DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM  
COELHOS**

**MAGDA LUZIA NEVES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. - Área de Concentração: Clínica Médica de Pequenos Animais

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Maria Caldeira Franco Andrade.

636.932 2  
N519u

Neves, Magda Luzia

Uso de óleo de semente de linhaça no tratamento da ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos / Magda Luzia Neves. – Presidente Prudente, 2011. 106 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2011.

Bibliografia.

Orientadora: Sílvia Maria Caldeira Franco Andrade.

1. Óleo de Semente do Linho. 2. Ceratoconjuntivite seca. 3. Coelho. I. Título.

**MAGDA LUZIA NEVES**

**Uso de óleo de semente de linhaça no tratamento da ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 30 de junho de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia M. C. Franco Andrade  
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade  
Universidade Estadual de São Paulo – UNESP –  
Araçatuba - SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Melchert  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente - SP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família...

Aos meus pais Franklin e Neusa, exemplos de força, dedicação e amor incondicional.

Às minhas irmãs Maria Francisca e Mônica, mulheres de fibra, determinadas e companheiras maravilhosas.

Às minhas filhas Luísa e Laura, razão do hoje e esperança do amanhã.

*“Uma geração vai, e outra vem, porém a terra sempre permanece. E nasce o sol, põe-se o sol, e volta ao seu lugar onde nasceu. O vento vai para o sul, e faz o seu giro para o norte; continuamente vai girando o vento, e volta fazendo seus circuitos.”*

*ECLISIASTES – 1, 4, 5, 6.*

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, pelo Dom Especial da Vida, meu agradecimento especial.

À Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco de Andrade, pela orientação, compreensão e ensinamentos durante este trabalho, dedicação e companheirismo.

Ao Coordenador Pedagógico da Faculdade de Medicina de Presidente Prudente, Dr. Marco Aurélio Marangoni pela possibilidade de realização deste curso de mestrado.

À Coordenadora da Disciplina de Saúde Coletiva II da Faculdade de Medicina de Presidente Prudente, Profa. Msc. Marines Gonzáles pelo apoio e compreensão.

À Coordenadora da Disciplina de Programa de Aproximação à Prática Progressiva (PAPP), Profa. Msc. Juliana Garcia sempre presente em minha jornada, pelo incentivo, amizade e cumplicidade indispensáveis para realização deste trabalho.

Ao Colégio Unoeste representados pela Diretora Profa. Marleine Fidalgo, Coordenadora Pedagógica Profa. Maria Inês Balarim e o Gerente Administrativo Sr Péricles Nunes pela colaboração e apoio.

Às queridas amigas Enfa. Miriam Sales e Enfa. Regiane Souza por me socorrerem nos momentos de estresse.

Aos professores do Mestrado em Ciência Animal pelo carinho e atenção.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sávio pela disponibilidade e desprendimento para que pudéssemos iniciar o experimento.

Ao Sr Sidmar de Lima Martins, funcionário do biotério da UNOESTE, pela atenção a cuidado especial com os animais.

Aos acadêmicos da Faculdade de Medicina Veterinária de Presidente Prudente Eudes R. Candido, Jonatas Eduardo Góes, Luís Felipe C. Zulim, Cláudia Lizandra Ricci e Carolina Silva pelo comprometimento, respeito, senso de responsabilidade e companheirismo.

Aos residentes do Hospital Veterinário da UNOESTE Augusto Schweigest, Rosimary Fukui, Carlos Meireles e Carolina Akemi pela importante participação.

Ao Prof. Dr. Osimar C. Sanches, Profa. Dra Letícia Yamasaki, Profa. Dra. Rebeca Dalatore Guerino pelo auxílio indispensável.

À minha querida amiga Enfa. Milena Camargo, pelo convite ao desafio.

À Profa. Dra. Maria Francisca Neves e Dra Mônica Bernardo Neves pelos ensinamentos, e por participarem deste momento da minha vida de forma tão intensa.

À Sra. Elaine Ribeiro pela presença de espírito e conselhos.

Ao querido Filipe Costa Moreira pelo carinho e ajuda.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente pelo apoio financeiro e ao Laboratório Ophthalmos-SP por disponibilizar os materiais necessários para a execução do experimento.

E respeitosamente aos pequenos animais que doaram suas vidas para que este trabalho pudesse ser concluído.

**Aos que passam pela nossa vida....**

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...  
Porque cada pessoa é única para nós,  
e nenhuma pessoa substitui a outra.  
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,  
mas não vai só...  
Levam um pouco de nós mesmos  
e nos deixam um pouco de si mesmos.  
Há os que levam muito,  
Mas não há os que não deixam nada.  
Esta é a mais bela realidade da vida...  
A prova tremenda de que cada um é importante  
e que ninguém se aproxima do outro por acaso...”

Saint Exupéry



## RESUMO

### USO DE ÓLEO DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM COELHOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do óleo de semente de linhaça (OL) em várias preparações (oral, tópica, oral e tópica associadas) no tratamento da ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida experimentalmente em coelhos. Foram utilizados vinte coelhos brancos machos da raça Nova Zelândia. Os animais foram divididos em 4 grupos com 5 animais cada: Grupo C (controle) animais hígidos; Grupo OLO (OL via oral); Grupo OLT (OL por via tópica) e Grupo OLOT (OL via oral e tópica). Os coelhos foram avaliados semanalmente pelo Teste de Lágrima de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF) e Teste de Rosa Bengala (TRB), uma vez por mês pelo exame de citologia de impressão ocular, e ao final do experimento foram sacrificados para análise histopatológica. Houve melhora clínica significativa nos parâmetros analisados (TLS, TF e TRB) em todos os grupos que usaram OL, porém, houve diferenças no desempenho de cada grupo. Os Grupos OLO e OLT apresentaram valores superiores do TLS, quando comparado com o Grupo OLOT a partir da 7ª semana até o final da observação. No TF o grupo OLT reverteu mais precocemente, a partir da 5ª semana, a incidência de úlceras na córnea, do que os demais grupos. Os Grupos OLO e OLT apresentaram TRB negativos para CCS a partir da 9ª semana, enquanto o grupo OLOT somente na última semana. Nos achados citológicos o grupo OLT apresentou um maior grau de inflamação na 4ª e 8ª semana e também nos achados histopatológicos esse grupo apresentou um maior grau de edema, degeneração e necrose do que os demais grupos. Não foi observado nenhum efeito colateral com o uso do OL. Os resultados analisados demonstraram que o OL, tanto por via oral como tópica, foi eficaz no tratamento de CCS induzida experimentalmente em coelhos e pode ser um adjuvante, natural, no tratamento desta enfermidade.

**Palavras-chave:** Coelhos, ceratoconjuntivite seca, óleo de semente de linhaça, citologia de impressão ocular, histopatológico.

## ABSTRACT

### THE USE OF LINSEED OIL IN THE TREATMENT OF KERATO-CONJUNCTIVITIS SICCA EXPERIMENTALLY INDUCED IN RABBITS

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the linseed oil (OL) in different preparations (oral, topically, oral and topically combined) in the treatment of the kerato-conjunctivitis sicca (KCS) experimentally induced in rabbits. Twenty white male rabbits of the New Zealand race were used. They were divided in 4 groups of 5 animals each: Group C (Control); Group OLO (OL oral); Group OLT (OL topically); and Group OLOT (OL oral and topically). The rabbits were evaluated weekly by the Shirmer Tear Test (TLS), Flourescein Test (TF) and the Rose-Bengal Test (TRB), and a ocular impression cytology exam was done once a month, and at the end of the experiment the rabbits were sacrificed to a histopathological analysis. There was a significant improvement in the parameters analysed (TLS,TF and TRB) in all the groups that used OL, but there was differences in the performance of each group. In the TLS the groups OLO and OLT showed larger values than the OLOT group from the 7<sup>th</sup> week to the end of the experiment. In TF the group OLT reverted the incidence of corneal ulcers earlier than the other groups starting on the 5<sup>th</sup> week. In TRB, the group OLO and also the OLT showed normal values starting on the 9<sup>th</sup> week, while the group OLOT only on the last week. In the cytological findings the group OLT showed a more advanced stage of inflammation on the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week and also on the hispathological findings of this group showed a more advanced stage of edema, degeneration and necrosis than the other groups. It wasn't observed any collateral damage due the use of OL. The results analyzed showed that the OL, topically or oral, was efficient on the treatment of CCS experimentally induced in rabbits and can be and excellent adjuvant, natural and safe, in the treatment of this illness.

**Key-Words:** Rabbits, kerato-conjunctivitis sicca, linseed oil, ocular impression cytology, histopathological, rabbits.

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 -	Estrutura anatômica da córnea.....	20
FIGURA 2 -	Camadas da córnea.....	22
FIGURA 3 -	Neovascularização superficial de córnea.....	26
FIGURA 4 -	Fitas de Schirme.....	27
FIGURA 5 -	Teste Lacrimal de Schirmer.....	28
FIGURA 6 -	Teste de Fluoresceína.....	29
FIGURA 7 -	Teste de Rosa Bengala.....	29
FIGURA 8 -	Citologia de Impressão.....	30
FIGURA 9 -	Flor de linho e a planta seca.....	33
FIGURA 10 -	Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados.....	40

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

FIGURA 1-	Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados.....	64
FIGURA 2-	A) TLS em OD de coelho n. 2 do grupo OLO (OL oral) no M1 apresentando valor >5mm/min. (B) TF em OE do coelho n. 1 do grupo OLT (OL tópico) no M4 corando positivo para úlcera de córnea. (C) TRB em OD do coelho n.3 do grupo OLOT (OL oral+tópico) no M4 corando positivo para células desvitalizadas.....;	64
FIGURA 3-	Médias e desvios padrões dos valores obtidos do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) em mm/min em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento* com o óleo de semente de linhaça em diversos momentos (M). *Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico) ** $P < 0.05$ (Teste de Tukey).....	65
FIGURA 4-	Medianas dos valores obtidos do Teste de Fluoresceína* em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento** com o óleo de semente de linhaça em diversos momentos (M). *1=negativo (ausência de úlcera de córnea) e 2=positivo (presença de úlcera de córnea) **Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico).....	66
FIGURA 5-	Evolução de úlcera de córnea em OD de coelho n. 4 do grupo OLOT (OL oral e tópico). (A) úlcera em “melt” extensa no M1. (B) úlcera em “melt” mediana em plano inferior da córnea com ceratite e neovascularização no M3. (B) úlcera em “melt” pequena em plano inferior da córnea ceratite e neovascularização no M6. (D) resolução da úlcera com ceratite e neovascularização no M9.....	67
FIGURA 6-	Medianas dos valores obtidos do Teste de Rosa Bengala* em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento** com o óleo de semente de linhaça em diversos momentos (M). *1=negativo (ausência de células coradas desvitalizadas pela CCS) e 2=positivo (presença de células coradas desvitalizadas pela CCS) **Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico).....	68
FIGURA 7-	Citologia de impressão de córnea. Presença de células polimorfonucleares (>25 células por campo) entre as células do epitélio da córnea. Observa-se falta de coesão intercelular, relação núcleo citoplasma de 1:3 com alguns núcleos picnóticos (setas). Coloração de ácido periódico de Schiff (P.A.S), hematoxilina e Papnicolau modificado, 100X magnificação.....	69

FIGURA 8-	<p>Fotomicrografia da córnea e conjuntiva. (A) OE coelho nº 1 grupo C com conjuntiva livre de processo inflamatório, observando-se células caliciformes de forma maciça (setas) P.A.S. (100x). (B) OD do coelho n. 5 do grupo OLO com presença de células caliciformes (setas largas) e edema subconjuntival (setas finas) P.A.S. (100x). (C) OE do coelho n. 1 do grupo OLT com discreta presença de edema em epitélio (setas) e em estroma corneano (*) H.E. (100x). (D) OD do coelho n. 1 do grupo OLT epitélio corneano apresentando edema moderado (seta fina), área subcorneana evidenciando infiltrado inflamatório moderado com presença maciça de linfócitos (seta larga) e em estroma presença de vaso sanguíneo (*) H.E. (100x). .....</p>	70
FIGURA 9-	<p>Fotomicrografia da córnea (OE) de coelho nº 5 do grupo OLT. (A) observa-se edema acentuado em epitélio corneano e subcorneano e em estroma edema moderado (setas largas) H.E. (400x). (B) exocitose de neutrófilos em epitélio corneano com presença de neutrófilos (setas), congestão de vaso sanguíneo em estroma (seta larga) H.E. (400x). (C) epitélio corneano evidenciando exocitose de neutrófilos (seta) e estroma apresentando edema intenso H.E. (400x).....</p>	71
FIGURA 10-	<p>Fotomicrografia da conjuntiva do coelho n.2 (A) e n. 4 (B) do grupo OLOT. (A) OD presença de células caliciformes (setas largas), infiltração inflamatória discreta (setas finas) e edema subconjuntival (*) P.A.S. (400x). (B) OE presença de células caliciformes (setas largas) e infiltração inflamatória basicamente linfocitária com necrose conjuntival (setas finas) P.A.S. (100x).....</p>	72

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Medianas e percentis (P25;P75) dos valores obtidos da citologia da conjuntiva em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento com o óleo de semente de linhaça (OL) na 4 <sup>a</sup> (M4), 8 <sup>a</sup> (M8) e 12 <sup>a</sup> (M12) semana do experimento .....	73
TABELA 2 -	Medianas e percentis (P25;P75) dos valores obtidos de edema, degeneração, necrose e variáveis de inflamação e médias e desvios padrões da densidade de células caliciformes da histopatologia de córnea e conjuntiva em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento com o óleo de semente de linhaça (OL) na 12 <sup>a</sup> semana do experimento (M12).....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico  
ADGL – Ácido dihomogama-linolênico  
AG – Ácido Graxo  
AGE – Ácido graxo essencial  
AGPI – Ácido graxo poliinsaturado  
ALA – Ácido alfa-linolênico  
CCS – Ceratoconjuntivite seca  
CI – Citologia de impressão  
COX - ciclooxigenase  
DHA – Ácido docosahexaenóico  
EPA – Ácido eicosapentaenóico  
FLP – Filme lacrimal pré-corneal  
GLA – Ácido gama-linilênico  
IL1 – Interleucina1  
LOX – Lipoxigenase  
LT - Leucotrieno  
OL – Óleo de linhaça  
OLO – Óleo de linhaça oral  
OLOT – Óleo de linhaça oral e tópico  
OLT – Óleo de linhaça tópico  
PG - Prostaglandina  
PGI - Prostaciclina  
SS – Síndrome de Sjögren  
TF – Teste de Fuoresceína  
TFV – Teste de fenol vermelho  
TLS – Teste de lágrima de Schirmer  
TNF- $\alpha$ 1 – Fator de necrose tumoral alfa 1  
TRB – Teste de rosa bengala  
TX - Tromboxano  
UFL – Unidade funcional lacrimal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Segmento Anterior do Olho do Coelho .....	18
2.2 Filme Lacrimal Pré-corneal .....	20
2.3 Unidade Funcional Lacrimal.....	22
2.4 Ceratoconjuntivite Seca .....	23
2.5 Linhça .....	31
2.6 Ácidos Graxos Essenciais.....	36
REFERÊNCIAS .....	41
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	47
RESUMO.....	48
INTRODUÇÃO .....	49
MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS .....	54
Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) .....	54
Teste de Fluoresceína (TF).....	55
Teste de Rosa Bengala (TRB) .....	55
Citologia de Impressão (CI).....	55
Histopatológico de córnea e conjuntiva ocular .....	56
DISCUSSÃO .....	57
REFERÊNCIAS.....	59
<b>ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA</b>	
Veterinary Ophthalmology .....	103



## 1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou olho seco é uma enfermidade caracterizada por uma inflamação crônica da córnea, conjuntiva e glândulas lacrimais. É caracterizada pela diminuição da camada aquosa do filme lacrimal pré corneal que conduz a um comprometimento no deslizamento das pálpebras, tornando deficiente ou nula a função protetora da lágrima, afetando assim a córnea e a conjuntiva, propiciando infecções secundárias que evoluem com a destruição tecidual (GONÇALVES, 1979; HERRERA, 2008). Desta forma, é uma doença oftálmica progressiva que pode levar a cegueira, associada com inflamação, secreção ocular e dor (GILBART; ROSSI; GRAY, 1987; CAVALLET, 2007; HERRERA, 2008). Muitas espécies animais são afetadas, como o homem e, com maior frequência os cães (BOUNOUS et al, 1998). Inicialmente, os sinais clínicos são muito semelhantes aos de uma conjuntivite, cursando o olho vermelho, secreção ocular e prurido ocular, que podem dificultar o diagnóstico e o tratamento correto desta patologia (GONÇALVES, 1979; FRIDMAN et al., 2004; DEFANTE JUNIOR, 2006; PIGATTO, 2007; HERRERA, 2008).

A linhaça tem sido considerada um alimento nutracêutico e funcional que contém, além de seus nutrientes básicos como carboidratos, proteínas, gorduras e fibras, elementos que podem diminuir o risco de algumas doenças. Seu uso contínuo pode desencadear aumento da defesa orgânica e redução do ritmo de envelhecimento celular (TONATO, 2007; ANDRADE, 2008; ALMEIDA, BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009). Além destes elementos, ainda possui os ácidos graxos poliinsaturados, ômega 3 e ômega 6, que lhe conferem a propriedade de alimento funcional (TONATO, 2007).

Alguns trabalhos descrevem o controle da CCS através do uso do óleo de semente de linhaça (OL), com melhora dos sintomas como a sensação de ardor e ressecamento dos olhos e, conseqüentemente, diminuição do uso de lubrificantes (PINHEIRO-JÚNIOR et al., 2007). Por outro lado, ainda existe grande discussão entre os especialistas sobre o modo e o local de ação desta substância na resolução da CCS. Neste sentido é relevante a necessidade de outros estudos que elucidem estas dúvidas.

Esse estudo teve por objetivo avaliar as alterações clínicas, citológicas e histopatológicas provocadas pela inflamação na CCS induzida experimentalmente em coelhos, e estudar a recuperação do epitélio ocular com o uso de óleo de semente de linhaça por via oral, por via tópica, e oral e tópica associadas, que possa ser indicado como tratamento alternativo ou adjuvante desta doença com um produto natural.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Segmento Anterior do Olho do Coelho

Há muitos anos o coelho vem sendo utilizado como modelo oftálmico em pesquisas (WILLIAMS, 2007). O olho do coelho é composto por estruturas, responsáveis pela proteção, nutrição, acomodação e percepção da luz; possui, ainda, algumas peculiaridades anatômicas que o diferencia dos cães e gatos (DAVIS, 1929; WILLIAMS, 2007).

A transição entre o epitélio da pele e da conjuntiva ocorre além da margem tarsal interna, mais na superfície interna da pálpebra que no homem. A membrana nictante ou terceira pálpebra está localizada no canto interno do olho, auxiliando na proteção córnea e na produção de lágrimas (DAVIS, 1929).

O epitélio conjuntival é uma membrana mucosa que reveste a porção anterior do bulbo ocular, é lubrificada pela lágrima, e é amplamente vascularizado, encontra-se composto por células estratificadas, que recobrem internamente as pálpebras superficiais e a terceira pálpebra, além da esclera superior. Este epitélio age como barreira protetora física e imunológica e, de acordo com a porção anatômica, esse tecido varia de espessura, sendo mais espesso conforme se aproxima ao fórnix (DAVIS, 1929). Todo esse tecido é recoberto por muco, produzido por células calciformes e células epiteliais superficiais não calciformes da córnea e conjuntiva, que participam ativamente na formação do filme lacrimal (DAVIS, 1929; BARBOSA, 2007).

Os coelhos possuem quatro glândulas lacrimais (glândula lacrimal, glândula lacrimal acessória com lobos retrobulbar, orbital e infraorbital; glândula superficial da terceira pálpebra e glândula profunda da terceira pálpebra (glândula de Harder) (HOLMBERG, 2008), as quais são responsáveis pela produção da camada aquosa da lágrima (GELATT, 1999; MILLER, 2008).

As pálpebras possuem um complexo glandular formado pelas glândulas meibomianas (tarsais) responsáveis por secreção sebácea com grande quantidade de lipídeos. As glândulas de Zeiss (glândulas sebáceas) e de Moll (glândulas sudoríparas) encontram-se na base dos cílios, e juntamente produzem secreção oleosa e viscosa a qual reveste a córnea e as glândulas acessórias

responsáveis pela secreção lacrimal no fundo do saco conjuntival, colaborando com o filme lacrimal pré corneal (DAVIS, 1929; DEFANTE JUNIOR, 2006).

No coelho a córnea possui forma elíptica, é proeminente e larga, seu contorno segue a mesma curvatura da esclera, com raio de curvatura de aproximadamente 7,3mm e de espessura razoavelmente uniforme. É a parte anterior e transparente da túnica externa do olho. Sua transparência e o alto poder de refração estão relacionados com algumas características como a ausência de vasos sanguíneos e linfáticos, a forma como as fibras colágenas do estroma estão dispostas, fibras nervosas amielínicas, epitélio não queratinizado, e pela deturgescência (estado de desidratação) relativa, e a maneira como suas camadas estão organizadas (DAVIS, 1929; GARDNER, 1988; BARBOSA, 2007).

Davis (1929) em seu estudo sobre anatomia e histologia do olho e órbita do coelho observa que a Membrana de Bowman apresenta-se ausente, onde o epitélio corneal repousa sobre a membrana basal e esta sobre o estroma, e que, assim sendo, este animal se encontra mais suscetível a lesões de córnea.

A córnea do coelho é formada basicamente por cinco estruturas: epitélio, membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura1). A córnea está coberta por um epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado, composto aproximadamente por seis camadas. A camada mais profunda deste epitélio encontra-se em contato direto a membrana basal, e esta com o estroma e consiste de células cilíndricas que histologicamente são semelhantes as do homem (DAVIS, 1929). Em coelhos as células basais do epitélio próximo ao limbo apresentam pigmentos escuros que cercam a córnea, servindo de borda anatômica (DAVIS, 1929). Cavallet (2007) observou que o epitélio corneano contém numerosas terminações nervosas, o que justifica a sensibilidade da corneal. O estroma corresponde a 90% da espessura da córnea, é um tecido conjuntivo composto por fibras nervosas amielínicas, matriz extracelular e raros ceratócitos livres entre as fibras colágenas (CAVALLET, 2007; BARBOSA, 2007). Davis (1929) relatou que o estroma do coelho é semelhante ao do homem, não havendo detalhe peculiar para a espécie. Segundo Cavallet (2007) os ceratócitos em resposta à lesões profundas de córnea transformam-se em fibroblastos, formando um tecido cicatricial não transparente. A autora descreve a matriz extracelular como um tecido de fibras colágenas e de substância fundamental amorfa formada por glicosaminoglicanos

que influenciam na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, no controle das interações celulares e nos componentes da matriz extracelular.

No coelho, a membrana de Descemet, assim como em cães, apresenta-se densa e rija, o que proporciona resistência e elasticidade e, não tem capacidade de regeneração frente a lesões (DAVIS, 1929; BARBOSA, 2007; CAVALLET, 2007).

O endotélio é formado por única camada de células escamosas poligonais, com baixa capacidade de regeneração, e responsáveis em promover bombeamento contínuo de água para este tecido e assim colaborar com a promoção da transparência da córnea. Participa ativamente na secreção da membrana de Descemet (DAVIS, 1929; CAVALLET, 2007).

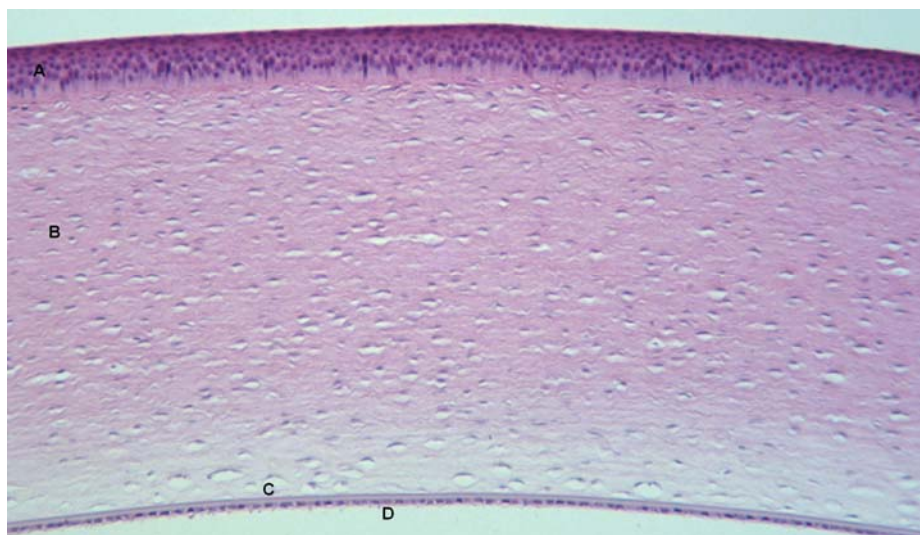


FIGURA 1- Estrutura anatômica da córnea de cão: A- epitélio; B- estroma; C- membrana de Descemet; D- Endotélio.  
Fonte: Herrera, 2008.

## 2.2 Filme Lacrimal Pré-Corneal

A lágrima também é denominada de Filme Lacrimal Pré-corneal (FLP) (HERRERA, 2008). O FLP recobre a superfície ocular promovendo uma visão adequada, além de contribuir para manutenção e defesa desta superfície que se encontra em contato com agentes agressores (CAVALLET, 2007; BARBOSA, 2007).

Dentre as suas funções podemos citar: suplementação da

córnea com nutrientes, transporte de oxigênio e de produtos metabólicos da superfície corneana; lubrificação da córnea e pálpebras; manutenção de superfície plana para refração da luz; remoção de corpos estranhos da córnea e conjuntiva; facilitar o acesso de glóbulos brancos à córnea e conjuntiva; promover defesa da superfície contra patógenos através de substâncias antibacterianas inespecíficas (lisozima,  $\beta$ - lisina, lactoferrina) e específicas (CAVALLET, 2007; BARBOSA, 2007; LIMA, 2008).

O FLP é constituído por três camadas distintas (Figura 2), a camada lipídica, a camada aquosa e a camada de mucina (GOMES, 2000; DAVIDSON; KUONEN, 2004; CAVALLET, 2007; BARBOSA, 2007 e XIONG et al., 2008).

A camada lipídica é a camada mais externa, secretada Basicamente pelas glândulas de Meibômio (tarsais), que correspondem às glândulas sebáceas modificadas e que se encontram dispersas às margens palpebrais. Esta camada tem como função retardar a evaporação e estabilizar o filme lacrimal sobre a córnea (VAUGHAN; ASBURY, 1990; GOMES, 2000; CAVALLET, 2007; BARBOSA, 2007; LIMA, 2008).

Gomes (2000) relatou que a disfunção da glândula de Meibômio pode desencadear uma instabilidade do filme lacrimal, além de alterações da superfície ocular. Davidson e Kuonen (2004) e Lima (2008) observaram que a remoção da camada lipídica proporciona evaporação do filme lacrimal e, conseqüentemente, obtém-se uma diminuição dos valores de tempo de ruptura do filme lacrimal, predispondo ao desenvolvimento do olho seco.

A camada aquosa ocupa quase toda a espessura do filme lacrimal, é produzida pelas glândulas lacrimais principais (70%) e glândulas acessórias (30%), cuja função é transportar nutrientes solúveis em água, substâncias bactericidas, componentes essenciais para proliferação e diferenciação do epitélio superficial (GOMES, 2000; DAVIDSON; KUONEN, 2004; CAVALLET, 2007).

A camada interna do filme lacrimal é formada de mucina, sendo secretada pelas células caliciformes da conjuntiva e as células epiteliais não caliciformes da córnea e conjuntiva (GOMES, 2000; DAVIDSON; KUONEN, 2004; LIMA, 2008).

Davidson e Kuonen (2004) e Cavallet (2007), relataram que a camada de mucina é composta por mucina, imunoglobulinas, uréia, sais, glicose, leucócitos,

restos celulares e enzimas. A mucina do filme lacrimal pode agir na superfície corneal protegendo-a de forma direta e indireta. Diretamente aderindo-se aos patógenos através de receptores específicos antes de atingir o epitélio corneano e indiretamente bloqueando a colonização microbiana. É capaz também de concentrar imunoglobulina A na superfície mucóide, protegendo-a (DAVIDSON; KUONEN, 2004).

Barbosa (2007) e Lima (2008) descreveram a camada de mucina como hidrófila que adere à superfície hidrofóbica, facilitando a dispersão da porção aquosa do filme lacrimal sobre a superfície ocular, protegendo-a da dessecação e contaminação bacteriana, além de encobrir irregularidades da superfície ocular e promover uma córnea lisa.

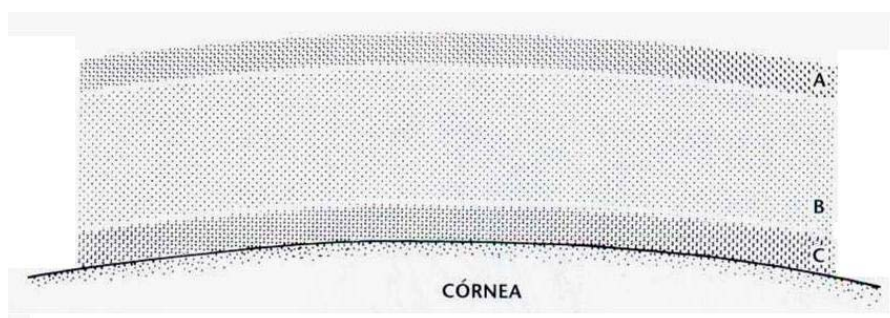


FIGURA 2- Camadas do Filme Lacrimal Pré-corneal: A- camada lipídica superficial; B- camada aquosa intermediária; C- camada interna mucóide. Fonte: Herrera, 2008.

### 2.3 Unidade Funcional Lacrimal

A principal função da unidade funcional lacrimal (UFL) é manter a integridade do filme, a transparência da córnea e a qualidade da imagem projetada na retina. Manter este equilíbrio somente é possível por ser a UFL um sistema integrado conectado por glândulas lacrimal e de Meibômio, córnea e conjuntiva, pálpebras e nervos (sensoriais e motores) que controla os componentes do filme lacrimal em resposta a influências ambientais, endócrinas e corticais (CAVALLET, 2007).

A desestabilização do filme lacrimal por lesões ou comprometimentos como diminuição da quantidade, alterações na composição, demora no escoamento

da lágrima pode levar ao desenvolvimento de uma doença ocular como olho seco (CAVALLET, 2007).

## **2.4 Ceratoconjuntivite Seca**

DEWS (2007) definiu a síndrome do olho seco como uma doença multifatorial, das lágrimas e superfície ocular, que resulta em sintomas de desconforto, perturbação visual e instabilidade do filme lacrimal com dano potencial da superfície ocular. Além disso, é acompanhado por um aumento da osmolaridade e inflamação ocular.

Gonçalves (1979); Gilbard, Rossi e Gray (1987); Cavallet (2007) e Herrera (2008) caracterizaram a ceratoconjuntivite seca (CCS) como uma inflamação crônica da córnea, conjuntiva e glândulas lacrimais, ocasionada por uma deficiência quantitativa e qualitativa do filme lacrimal pré corneal (FLP), que conduz a um comprometimento no deslizamento das pálpebras, tornando deficiente ou nula a função protetora da lágrima, afetando assim, as estruturas da córnea e conjuntiva, propiciando infecções secundárias que evoluem com a destruição tecidual e cegueira. Outros autores a definem habitualmente como diminuição da produção de lágrimas, já que os sinais clínicos estão diretamente relacionados à diminuição quantitativa da lágrima. Mas as alterações iniciais da superfície ocular, mesmo na presença de quantidades normais de lágrimas, se devem a deficiência qualitativa (HERRERA, 2008).

A CCS é uma enfermidade comum em pequenos animais e humanos (BOUNOUS et al, 1998). Em animais de pequeno porte apresenta incidência de 1%, sendo as raças mais predispostas o Lhasa Apso, Pequinês, Buldog Inglês, Cocker Spaniel, Pug, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier e Schnauzer miniatura (CAVALLET, 2007; HERRERA, 2008).

Em humanos, o olho seco faz parte do conjunto de sinais e sintomas presentes na Síndrome de Sjögren (SS), doença inflamatória crônica e auto-imune que acomete glândulas exócrinas (lacrimal, salivar, pâncreas, sudoríparas, mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e urogenital) (GOMES et al., 1994; FELBERG; DANTAS, 2006; GOMES, RAYMUNDI; CHAHADE, 2008).

Em 1933, o sueco, Henrik Sjögren introduziu um termo



específico, a queratoconjuntivite seca, para diferenciá-la de xerofthalmia já que esta doença está diretamente relacionada a deficiência de vitamina A. A incidência da SS é maior em mulheres brancas entre 50 a 60 anos com prevalência de 3-4% da população (VIVINO, 2004; GOMES, RAYMUNDI; CHAHADE, 2008). Pode ser classificada em SS primária, quando caracterizada pelo complexo sicca, a qual afeta as funções das glândulas exócrinas e manifestações extra-celulares como vasculite, pneumonias, nefrites entre outras. A SS secundária ocorre quando há associação do complexo sicca e outra doença imune, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso, cirrose biliar primária e outras (DANTAS FILHO; MENEZES, 1995; FREITAS et al., 2004).

A CCS pode ser desencadeada por vários fatores (CAVALLET, 2007) e segundo Xiong et al. (2008) e Lima (2008) a enfermidade pode ser classificada em duas categorias distintas, de acordo com sua etiologia: deficiência do extrato aquoso (quantitativo) e deficiência lipídica ou de muco (qualitativa).

A redução da porção lacrimal aquosa pode ocorrer por causas infecciosas, como blefarconjuntivite crônica (XIONG et al., 2008), por fármacos como: em terapia a base de sulfonamida ou uso prolongado de atropina, hereditariedade, como a hipoplasia acinar, iatrogênica por extirpação da terceira pálpebra, endocrinopatias como o hipotireoidismo e diabetes melitus, além de doenças orbitais traumáticas ou infecciosas (LIMA, 2008).

A CCS pode ocorrer mesmo quando a produção da porção lacrimal aquosa se encontra normal. Neste caso, a anormalidade se encontra na produção da camada lacrimal lipídica, que proporciona a evaporação da camada lacrimal aquosa, ou alteração na produção de mucina, que também pode levar à desestabilização do filme lacrimal (DAVIDSON; KUONEN, 2004; CAVALLET, 2007; LIMA, 2008).

Gomes (2000), Davidson e Kuonen (2004) e Lima (2008) descreveram que distúrbios das glândulas de Meibômio podem levar a uma produção inadequada da camada lipídica e a instabilidade do filme lacrimal pré-corneal (FLP) proporcionando a evaporação prematura da camada aquosa. Davidson e Kuonen (2004) observaram, ainda, que as moléculas lipídicas que compreendem esta camada quando alteradas podem ser tóxicas à córnea e que na presença de blefarites e meibomianites a produção deste componente do FLP encontra-se prejudicada, o que desencadeia a deficiência lacrimal qualitativa e

ceratopatia. Além disso, estes autores relataram que a diminuição na produção de mucina também desencadeia a desestabilização do filme lacrimal.

DEWS (2007) observou que a perda da mucina da superfície ocular ocorre em decorrência de fatores inflamatórios liberados devido à hiperosmolaridade lacrimal. Segundo Lima (2008) um processo cicatricial severo após doença ulcerativa na conjuntiva pode ocorrer em função de um déficit de células caliciformes. Este déficit leva a instabilidade e evaporação precoce do filme lacrimal e conseqüente prejuízo da lubrificação, nutrição e proteção da superfície ocular.

Para o diagnóstico de deficiência de mucina ocular é necessário quantificação histológica de células caliciformes, que pode ser obtida através de biópsia conjuntival. Esta quantificação das células caliciformes é um sensível indicador da higidez da superfície ocular, pois permite uma mensuração indireta da produção de mucina (LIMA, 2008).

Uma hiperosmolaridade da superfície ocular pode desencadear processo patológico (GILBARD; ROSSI; GRAY, 1987; CAVALLET, 2007) por aumentar a osmolaridade das células epiteliais e conseqüente ativação da cascata inflamatória com liberação de fatores inflamatórios como as citocinas e metaloproteínas na lágrima. Todo esse processo envolve morte celular, perda de células caliciformes no epitélio conjuntivo e diminuição de mucina, ocasionando instabilidade do filme lacrimal. Essa instabilidade agrava a hiperosmolaridade da superfície ocular complementando o ciclo vicioso (DEWS, 2007; CAVALLET, 2007).

Alguns estudos apontam os hormônios sexuais na etiologia do olho seco, onde descrevem que o baixo percentual de andrógeno propicia o processo inflamatório nas glândulas lacrimais (XIONG et al., 2008), já que os andrógenos tem participação na função da glândula lacrimal e glândula de Meibômio e acredita-se serem indutores de citocinas anti-inflamatórias nas glândulas lacrimais (DEWS, 2007; CAVALLET, 2007).

Os sinais clínicos da CCS variam com a gravidade e duração da instabilidade do filme lacrimal pré-corneal (FLP). Os olhos de indivíduos comprometidos pela CCS apresentam-se sem brilho e secos. Segundo relatos de humanos portadores, há a sensação constante de *secura* e ardência. Com o passar do tempo, o quadro clínico progride, e instala-se uma conjuntivite crônica, onde a mucosa torna-se espessa, hiperêmica, com superfície irregular e secreção viscosa,

erosão e infiltração da córnea (GONÇALVES, 1979; FRIDMAN et al., 2004; DEFANTE JÚNIOR, 2006; PIGATTO et al., 2007; HERRERA, 2008).

Defante Júnior (2006) observou que a córnea e conjuntiva apresentam-se opacas e ressecadas. Além disso, a córnea pode apresentar edema, ulceração ou neovascularização superficial (Figura 3).

Herrera (2008) verificou que a CCS muitas vezes é sub diagnosticada por ser confundida com conjuntivite bacteriana e, conseqüentemente, tratada com ampla variedade de antibióticos tópicos. Assim, em um primeiro momento ocorre melhora, mas com a interrupção da medicação a enfermidade evolui com a opacidade corneal grave que resulta em cegueira.

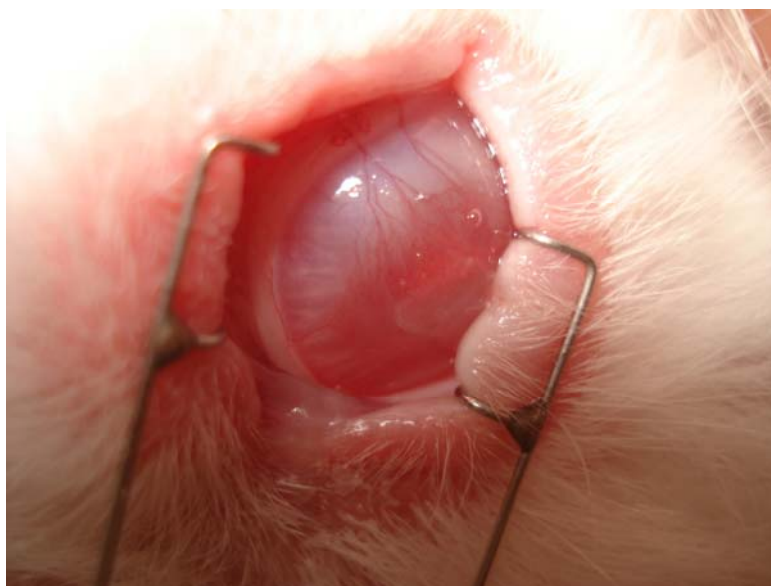


FIGURA 3- Olho esquerdo de coelho: neovascularização superficial de córnea

Fonte: Arquivo pessoal.

A CCS pode ser diagnosticada com base no histórico do paciente, nos sinais e sintomas apresentados e na aplicação de testes específicos, como o Teste de Schirmer e o Teste de Fenol Vermelho (KAERCHER; BRON, 2008).

O Teste de Schirmer ou Teste de Lágrima de Schirmer (TLS)

permite avaliar a quantidade de lágrima no saco conjuntival. Este teste é indicado para pacientes que apresentam irritação ocular crônica e sinais clínicos de olho seco. O teste é desenvolvido com utilização das fitas de Schirmer com dimensão padronizada (5 por 35mm) (Figura 4). Uma pequena porção da fita é

dobrada e colocada no saco conjuntival próximo ao ângulo interno do olho por cinco minutos com os olhos fechados em humanos e um minuto em animais (VAUGHAN; ASBURY, 1990; ANDRADE, 2008).



FIGURA 4- Fitas de Schirmer

Fonte: Arquivo pessoal.

Maggs (2008) descreveu a classificação do TLS em dois tipos, o Teste Lacrimal de Schirmer 1 (TLS 1) e o Teste Lacrimal de Schirmer 2 (TLS 2). O TLS 1 é utilizado de forma rotineira, a fita de Schirmer é inserida no saco conjuntival por 60 segundos e em seguida efetua-se a leitura da quantidade umedecida (Figura 5). Já no TLS 2 é necessário a utilização de colírio anestésico com o objetivo de cancelar a estimulação ou sensação corneana. O teste é considerado positivo quando se evidencia a redução na produção lacrimal observando um valor inferior a 10 mm de umedecimento na fita de Schirmer após repetitivos exames. O TLS é considerado normal, quando a fita apresenta mensuração de 10 a 25mm de umidade; de 5 a 10mm é resultado de um olho com suspeita de CCS; de 1 a 5mm é resultado de uma CCS grave e o valor zero de umidade é considerado uma CCS absoluta.



FIGURA 5- Teste Lacrimal de Schirmer em olho direito de coelho  
Fonte: Arquivo pessoal.

O Teste de Fenol Vermelho (TFV) é utilizado para quantificar a produção lacrimal (ANDRADE, 2008; HERRERA, 2008).

Além destes testes, existem outros métodos que possibilitam o diagnóstico da CCS, utilizando-se corantes vitais que coram o epitélio corneal. Um destes corantes é a Fluoresceína, que consiste na instilação de colírio ou a aplicação de tiras de Fluoresceína a 1%, onde o contato do corante com a superfície corneal forma uma fina película verde brilhante. Qualquer alteração nesta estrutura é visualizada através de uma concentração maior do corante nas áreas ulceradas (Figura 6) (VAUGHAN; ASBURY, 1990; ANDRADE, 2008).



FIGURA 6- Teste de Fluoresceína – úlcera de córnea em olho direito de coelho  
Fonte: Arquivo pessoal.



FIGURA 7- Teste de Rosa Bengala – tecido desvitalizado em olho esquerdo de coelho  
Fonte: Arquivo pessoal.

O outro corante é o Rosa Bengala a 0,5%, também em colírio ou tiras, que permite a identificação de células desvitalizadas (Figura 7) (ANDRADE, 2008). Vaughan e Asbury (1990) orientaram o uso de corante estéril, conta gotas individual ou ainda as fitas por proporcionarem maior segurança pois, caso contrário, na presença de lesão corneal o risco de se introduzir um novo microrganismo no olho é grande. Além disso, os corantes geralmente são irritantes e recomenda-se lavar os olhos do paciente com solução fisiológica 0,9% após realização do exame para total remoção do produto (ANDRADE, 2008).

Os raspados e biópsias de conjuntivas são exames laboratoriais coadjuvantes para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. A citologia de impressão conjuntival é um método não invasivo que permite a avaliação da superfície ocular em portadores de doenças inflamatórias crônicas, cuja coleta de material é rápida e bem tolerada pelos pacientes. Segundo alguns relatos, a qualidade do material obtido na citologia de impressão (CI) é superior a dos raspados conjuntivais, a qual permite avaliar parâmetros citológicos da superfície ocular como: presença de células inflamatórias, cromatina nuclear, relação entre o tamanho do núcleo e do citoplasma das células epiteliais da conjuntiva, distribuição das células caliciformes, junções intercelulares e queratinização. Os dados obtidos podem ser graduados segundo escala de Nelson (BOUNOURS et al., 1998; BARROS et al., 2001; CAMARGO et al., 2004; PINHEIRO-JÚNIOR et al., 2007).

A coleta de material da superfície ocular é realizada, após instilação de colírio anestésico, a partir da utilização do papel de filtro padronizado (Milipore Corporation), que é posicionado sobre a conjuntiva pressionado por cinco segundos. Em seguida retira-se o papel com auxílio de uma pinça e observa-se a aderência da conjuntiva sobre o papel filtro no momento da retirada (“peeling”), o que indica coleta adequada (Figura 8). Em seguida o material é fixado e submetido à técnica de coloração adequada (CAMARGO et al., 2004; PINHEIRO-JÚNIOR et al., 2007).



FIGURA 8- Citologia de Impressão

Fonte: Arquivo pessoal.

A literatura traz uma série de indicações terapêuticas, entre elas a forma tradicional que consiste na substituição da lágrima faltante. As soluções ideais são as viscosas, pois se ligam ao epitélio e estabilizam a película lacrimal pré-corneal e impedem sua ruptura. Alguns destes substitutos lacrimais são o dextrano 70 e hipromelose, o álcool polivinílico, carboximetilcelulose, ácido hialurônico (HERRERA, 2008; ANDRADE, 2008). A literatura traz uma série de indicações terapêuticas, entre elas a forma tradicional que consiste na substituição da lágrima faltante. As soluções ideais são as viscosas, pois se ligam ao epitélio e estabilizam a película lacrimal pré-corneal e impedem sua ruptura. Alguns destes substitutos lacrimais são o dextrano 70 e hipromelose, o álcool polivinílico, carboximetilcelulose, ácido hialurônico (HERRERA, 2008; ANDRADE, 2008).

A ciclosporina A é um imunossupressor usado com sucesso nas doenças de etiologia auto-imune, é um agente não citotóxico que age na secreção lacrimal de forma a estimular a produção de lágrimas e interromper o processo inflamatório (HERRERA, 2008). Porém, alguns efeitos adversos são comuns à administração sistêmica da ciclosporina A, incluindo a elevada taxa de creatinina, hipertensão e disfunção renal. Tais efeitos limitam o uso sistêmico da ciclosporina A para tratamento de desordens oculares. Assim, para desordens da superfície ocular, a aplicação tópica assegura vantagens e eficácia ao tratamento (TANG-LIU; ACHEAMPONG, 2005).

Herrera (2008) sugeriu a utilização do tacrolimus e o pimecrolimus que são imunossupressores tópicos, possuem ação lacrimomimética eficaz e podem ser associados ao uso da ciclosporina A. Além disso, o tacrolimus supera a ação da ciclosporina A em até cem vezes. Desta forma, o uso clínico em humanos destes fármacos é crescente, principalmente nos transplantes renais e hepáticos e em animais estão apresentando resultados positivos no tratamento de ceratoconjuntivite seca, pois proporcionam um aumento na produção de lágrimas (ANDRADE, 2008). Berdoulay, English e Nadelstein (2005) observaram que o uso de tacrolimus a 0,02% no tratamento da ceratoconjuntivite seca pode ser benéfico em pacientes que não respondem ao tratamento com ciclosporina A.

Barabino et al. (2003), em experimentos com sistema do ácido linolênico e do  $\gamma$ -linolênico, constataram melhora significativa nos sintomas de olho seco e redução da inflamação da superfície ocular. Recentemente, Pinheiro Júnior et al. (2007) utilizaram ácidos graxos essenciais por via oral, como terapêutica alternativa para portadores das variadas formas de deficiência lacrimal. Estes ácidos graxos essenciais são encontrados em muitos alimentos como nozes, peixes de águas frias, semente de soja, óleo de canola e o óleo de linhaça (PINHEIRO-JÚNIOR et al., 2007).

## **2.5 Linhaça**

O linho (*Linum usitatissimum*) é uma planta de cultura antiga, originária da Ásia, provavelmente do Cáucaso. Encontra-se amplamente distribuída no mundo. Os egípcios não só aproveitavam a planta em função das sementes ricas em óleo,



como também aprenderam a confeccionar o linho a partir do seu caule (CREDIDO, 2008).

O linho é uma planta da família das Lineaceas, apresenta altura até 1 metro, com talos eretos e folhas estreitas de cor verde e verde-claro. Esta planta floresce no verão, possui cinco pétalas e suas flores são geralmente azuis, podendo se apresentar também na cor branca e vermelha. O fruto parece uma cápsula de cor amarronzada que contém sementes brilhantes e planas (CREDIDO, 2008).



FIGURA 9- Flor de linho e a planta seca  
Fonte: [www.googleimagem.com.br](http://www.googleimagem.com.br)

A semente é achatada, ovalada e pontiaguda, ligeiramente maior que a semente de girassol, é de cor marrom avermelhada, brilhante com textura firme e mastigável, sabor parecido com o da castanha (PEREIRA, 2009; CORDEIRO, FERNANDES; BARBOSA, 2009).

A linhaça é rica em proteína, gordura e fibras dietéticas, com aproximadamente 41% de gorduras, 28% de fibras, 21% de proteínas, 4% de resíduos e 6% de outros carboidratos (açúcares, ácidos fenólicos, lignana e hemicelulose). A quantidade de calorías presente em 100g de linhaça é de 396 Kcal, 109 Kcal de proteínas e 287 Kcal de lipídeos, onde se observa 30,90g de lipídeos e 24,40g de proteínas (ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009).

As proteínas da linhaça são a albumina e a globulina, que correspondem aproximadamente de 20 a 24% de seus componentes. A composição de aminoácidos encontrada na proteína da linhaça é semelhante a da soja e é vista como uma das mais nutritivas proteínas vegetais. Esta semente também é rica em

potássio, contendo sete vezes mais potássio do que a banana. Além disso, observa-se na sua composição a presença de vitamina E, importante antioxidante biológico; 57% de ácidos graxos ômega-3 ( $\omega$ -3); 16% de ácidos graxos ômega-6 ( $\omega$ -6); 18% de ácidos graxos monoinsaturados e 9% de ácidos graxos insaturados. A predominância do  $\omega$ -3 nas sementes de linhaça tem sido correlacionada com a prevenção de algumas doenças como as coronarianas e alguns cânceres. Cerca de 28% do peso da linhaça corresponde as fibras solúveis (LAMARÃO; NAVARRO, 2007; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009).

Segundo Almeida, Boaventura e Guzman-Silva (2009) a linhaça tem sido estudada pelos seus benefícios à saúde e é considerada um alimento nutracêutico. Os alimentos nutracêuticos são aqueles que proporcionam benefícios médicos e de saúde, assim como a prevenção e tratamento de doenças. Encontram-se como nutrientes isolados como os suplementos dietéticos em cápsulas e dietas, e produtos herbais como alimentos processados: cereais, sopas e bebidas (ANDRADE, 2008). Já Tonato (2007) classifica a linhaça como alimento funcional por apresentar elementos ativos capazes de prevenir o risco de algumas doenças.

Segundo a Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o alimento funcional é aquele alimento ou ingrediente com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e que pode, além de funções nutricionais básicas, quando se trata de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Da mesma forma, Tonato (2007) completa a conceituação da ANVISA observando que a eficácia e a segurança desses alimentos devem ser assegurados por estudos científicos.

Hoje há um grande interesse em se estudar a linhaça pelos seus benefícios terapêuticos (ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009). A ceratoconjuntivite seca (CCS) vem sendo controlada com óleo de semente de linhaça (OL), pois seu uso resultou na melhora dos sintomas como sensação de olhos ressecados e ardor, além de, diminuição do risco de infecção secundária (PINHEIRO-JUNIOR et al., 2007). Segundo estes autores, ainda existe discussão sobre o modo e local de ação do OL sobre a CCS, mas acredita-se na sua ação antiinflamatória. Outras pesquisas tem se concentrado nos compostos fitoquímicos do OL, entre eles as lignanas e a alta concentração de  $\omega$ -3 (LAMARÃO; NAVARRO, 2007; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009).

A lignana praticamente, faz as vezes do estrógeno, que ao se ligar a receptores celulares, funciona como um falso hormônio, o fitoestrógeno, que atua na redução de tumores de mama por inibir a transformação de células iniciais em células neoplásicas, mas o mecanismo exato de sua ação ainda não foi elucidado (THOMPSON, et al., 1996a; THOMPSON et al., 1996b; THOMPSON, 2006).

Segundo Lichtenthäler (2006) alguns estudos demonstraram a ação da linhaça na prevenção de câncer de próstata, assim como no alívio dos sintomas da tensão pré-menstrual (TPM) e menopausa.

Ruxton (2004) e Waitzberg (2009) escreveram o papel protetor do  $\omega$ -3 na asma, reduzindo o processo inflamatório, além de diminuir o risco da doença e aumentar a função pulmonar. Da mesma maneira, o  $\omega$ -3 em indivíduos com doença auto-imune como a artrite reumatóide, geralmente respondem à suplementação de EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico) com diminuição dos níveis de citocina e conseqüente melhora dos sintomas como redução da rigidez matinal e edema das articulações (COVINGTON, 2007; WAITZBERG, 2009).

Estudos demonstram a redução significativa de riscos de morte súbita devido às arritmias cardíacas e doenças cardíacas confirmadas, pois o ácido graxo  $\omega$ -3 é antiarrítmico, antitrombótico e antiinflamatório. Lima (2007) relata que o DHA apresenta-se em elevadas proporções no cérebro, e na retina, sendo essencial para o desenvolvimento normal da retina e cérebro, principalmente em crianças prematuras.

O  $\omega$ -3 tem, ainda, efeito antiaterogênico, pois diminui a lipoproteína de baixa densidade e aumenta a lipoproteína de alta densidade (CLAPAUCH et al., 2002; COVINGTON, 2007; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009), assim como reduz o nível de triglicerídeos no sangue (COVINGTON, 2007).

Mais de 20% do cérebro é constituído de substâncias gordurosas que desempenham importantes funções. A saúde do cérebro depende da quantidade e do tipo de gordura, a performance mental exige um tipo específico desse elemento. O  $\omega$ -3 é um ácido graxo estrutural da substância cinzenta do cérebro capaz de promover a comunicação entre as células nervosas, auxiliar na construção das bainhas de mielinas ao redor das fibras nervosas, permitir uma melhor neurotransmissão química e, conseqüentemente, auxiliar no monitoramento do humor e da memória (RUXTON, 2004).

Conquer et al. (2002) discutiram a relação entre a baixa quantidade de  $\omega$ -3 e a demência, o qual faz uma relação do baixo nível de DHD no plasma de pacientes com o mal de Alzheimer's e outras demências.

Segundo Vale (2006) a seleção dos constituintes da dieta é um componente importante e crescente na medicina complementar e alternativa nas clínicas de dor, pois a ingesta de determinados elementos, assim como  $\omega$ -3, favorece o efeito analgésico e antiinflamatório por disponibilizar prostaglandinas e citocinas em menor proporção. Quanto ao efeito colateral, o mais conhecido pelo uso de linhaça, é o aumento do trânsito gastrointestinal, sua administração é indicada após as refeições por proporcionar melhor absorção, este dado ainda necessita de maior investigação (PINHEIRO-JUNIOR, 2007).

Carciofi, Bazolli e Prada (2002) relataram que na medicina veterinária a suplementação alimentar com  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 tem apresentado resultados positivos no controle de várias doenças. Citam que a maioria das doenças em cães e gatos, responsáveis por prurido, são as reações alérgicas principalmente por picada de pulga, hipersensibilidade alimentar, dermatite de contato e atopia. A presença de eicosanóides menos inflamatórios tem-se mostrado mais eficaz no controle dessas patologias. Não só a medicina veterinária de pequenos animais, mas também de grandes animais tem utilizado a linhaça. Por suas propriedades terapêuticas, essa semente vem sendo empregada na alimentação de eqüinos, pois implica na redução da quantidade de concentrado ao animal, o que é vantajoso (PENIDO, 2008). Neste animal, que tem estômago pequeno, previne a ocorrência de cólica gastrointestinal, além de oferecer um aporte nutricional de qualidade, proporcionado pelos derivados da linhaça, o que é observado na melhora do estado geral do animal (PENIDO, 2008). O autor relatou também a utilização do farelo de linhaça na alimentação do gado leiteiro, com o propósito de aumentar a produção de leite e melhorar a qualidade dos produtos derivados do leite.

Almeida (2007) observou o crescente mercado dos mais variados produtos naturais, onde o óleo de semente de linhaça prensado a frio e encapsulado e a semente de linhaça são comercializados para uso medicinal no tratamento de problemas gástricos, digestivos, úlceras duodenais, constipação intestinal, cólicas hepáticas, cálculo biliar entre outros distúrbios da saúde.

## 2.6 Ácidos Graxos Essenciais

Waitzberg (2009) descreve os lipídeos como compostos de glicerídeos formados através da associação química entre glicerol e uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos (AG). Esses são necessários às funções orgânicas bioquímicas estruturais e regulatórias. Os AG são ácidos carboxílicos que variam no seu comprimento, não se ramificam e são formados por vários pares de átomos de carbono, aos quais se encontram unidos por ligações simples ou duplas. São classificados conforme a saturação das ligações entre os carbonos em saturados (não possuem dupla ligação), monoinsaturados (possuem uma dupla ligação) e poliinsaturados (possuem mais de uma dupla ligação). A localização da primeira dupla ligação, a partir do final da molécula (grupo metil ou ômega) determina a série ou família à qual pertence. (WAITZBERG, 2009; CARCIOFI; BAZOLLI; PRADA, 2002).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são classificados em famílias do tipo ômega 9 ( $\omega$ -9), ômega 7 ( $\omega$ -7), ômega 6 ( $\omega$ -6), ômega 3 ( $\omega$ -3) (HAIDAMUS, 2006). Através dos alimentos ingeridos diariamente, os mamíferos adquirem os ácidos graxos, mas em situações de necessidade são capazes de sintetizar ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Mas não podem sintetizar os ácidos graxos poliinsaturados, pois não possuem enzimas específicas capazes de transformar o ácido oléico ( $\omega$ -9) em ácido linoléico ( $\omega$ -6) e ácido linolênico ( $\omega$ -3), assim são considerados ácidos graxos essenciais que devem ser obtidos nos alimentos (WAITZBERG 2009; COVINGTON, 2004; HAIDAMUS, 2006).

A composição dos AGPI das membranas celulares depende, em grande maioria, da quantidade ingerida na dieta. Alguns estudiosos consideram satisfatória a relação dietética de AGPI  $\omega$ -3: $\omega$ -6 entre 5:1 até 10:1 (LAMARÃO; NAVARRO, 2007; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009), outros autores, no entanto acreditam que a relação 3:1 é a mais próxima do ideal (OOMAH, 2001; HASSAN-ZADEH et al., 2008).

Os AGE  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são metabolicamente diferentes e apresentam funções fisiológicas também diferentes. Manter o equilíbrio nutricional é importante para a homeostase e o desenvolvimento normal do organismo, já que a mudança no nível dos poliinsaturados na dieta pode influenciar a ação dos mediadores biológicos (como as citocinas) e desta forma favorecer o surgimento de patologias (ALMEIDA,

2007; LAMARÃO; NAVARRO, 2007; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009). O consumo aumentado dos AGE  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, sem uma proteção antioxidante apropriada, pode levar à peroxidação lipídica *in vivo* e, conseqüentemente, reduzir os seus efeitos benéficos, o que torna necessário a utilização de níveis adequados de antioxidantes (ALMEIDA, 2007; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009)

Os alimentos ricos em  $\omega$ -6 são os óleos de soja, girassol e milho (HAIDAMUS, 2006) e de  $\omega$ -3 são os peixes de água fria, canola e o óleo extraído da semente de linhaça (HAIDAMUS, 2006; PINHEIRO-JÚNIOR, 2007).

O óleo de linhaça (OL) é a fonte mais rica de ALA, ( $\omega$ -3), que no organismo é convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). O peixe de água fria (salmão, arenque) também é rico em AGE  $\omega$ -3, o que o diferencia do OL é que este fornece o EPA e DHA já pré-formados, devido à ingestão de plantas marinhas que contém o  $\omega$ -3 sintetizado (MATINS, et al., 2008). O consumo, aumentado e prolongado de óleo de peixe traz riscos de sangramento devido a sua ação antiagregante plaquetária. Um fator a ser considerado é a baixa aceitação dos pacientes, pois o uso prolongado pode desencadear halitose, náuseas, eructações e meteorismo abdominal (MATINS et al., 2008).

Os ácidos graxos linoléico ( $\omega$ -6) e linolênico ( $\omega$ -3) após serem consumidos sofrem ação enzimática a qual desencadeia um processo de alongamento da cadeia de carbono, onde o ácido linoléico ( $\omega$ 6) é metabolizado originando o ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA), dihomo- $\gamma$ -linolênico (ADGL) e o ácido araquidônico (AA) (WAITZBERG; HAIDAMUS, 2006). O ácido linolênico ( $\omega$ 3) é dessaturado e alongado originando ALA, EPA e DHA (WAITZBERG, 2009; COVINGTON, 2004; HAIDAMUS, 2006; CAVALLET, 2007).

Cavallet (2007), Haidamus (2006) e Waitzberg (2009) descrevem como as principais funções gerais dos AGPI a manutenção das condições normais das funções cerebrais e impulsos nervosos; depósito de energia e conformação das membranas celulares, por constituírem os fosfolípidos, onde a presença dos AGPI em grande quantidade proporciona maior fluidez e conseqüentemente colabora na regulação da atividade da proteína na membrana, e são precursores de eicosanóides os quais regulam a função imune e inflamatória.

Frente a situações de perigo como injúria ou processo infeccioso, o organismo utiliza recursos bioquímicos teciduais e celulares que conjuntamente vão

trabalhar para restabelecer o equilíbrio através da contenção e destruição do microrganismo infectante e tecidos lesionados. O processo inflamatório está inserido no contexto já que participa da resposta imune imediata nos eventos de desequilíbrio (WAITZBERG, 2009).

Segundo Faintuch et al. (2006) a inflamação é caracterizada por quatro sinais clássicos: dor, calor, rubor e edema. Waitzberg (2009) observa a presença de mais um sinal, a perda da função. O autor relata que todos esses sinais são desencadeados por mediadores inflamatórios como as aminas, os eicosanóides e as citocinas. Os eicosanóides são substâncias biologicamente ativas na regulação de processos fisiológicos, são também mediadores dos processos inflamatórios lipídicos (CARCIOFI, BAZOLLI; PRADA, 2002).

A base para a formação dos eicosanóides são o ADGL, AA, ambos da série  $\omega$ -6, e o EPA, da série  $\omega$ -3 (HAIDAMUS, 2006; WAITZBERG, 2009). Quando em situação de injúria física ou química, a fosfolipase é ativada liberando o ADGL, o AA e EPA da membrana celular para o espaço intersticial, onde são metabolizados pela enzima ciclooxigenase (COX), originam assim as prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI) e tromboxanos (TX). Quando derivados AA, os eicosanóides produzidos são da série 2 (PGE2, TXA2, PGI2). Os eicosanóides derivados do EPA são chamados da série 3 (PG3, TXA3, PGI3) (WAITZBERG, 2009; CARCIOFI, BAZOLLI; PRADA, 2002; HAIDAMUS, 2006).

Quando a via enzimática utilizada é a lipooxigenase (LOX), tem-se como produto os leucotrienos, sendo originados do AA tem-se leucotrieno da série 4 (LTA4, LTB4, LTC4, LTD4, LTE4); o EPA forma os leucotrienos da série 5 e o ADGL os leucotrienos da série 3 do qual se tem pouca informação sobre a sua importância bioquímica (WAITZBERG, 2009; CARCIOFI, BAZOLLI; PRADA, 2002; HAIDAMUS, 2006).

Os eicosanóides sintetizados a partir dos AGPI  $\omega$ 6 são observados como mediadores pró-inflamatórios, onde a PGE2 induz a febre, dores, edema, permeabilidade vascular e vasodilatação, mas também diminuem o fator de necrose tumoral-1 $\alpha$  (TNF-1 $\alpha$ ) e interleucinas-1 (IL-1). De maneira geral os eicosanóides da série 2 são mais intensos na sua ação inflamatória. Todavia alguns estudos tem mostrado que os eicosanóides do ADGL (série  $\omega$ -6) concentram-se na membrana celular, bloqueando o metabolismo do AA, transformando os mediadores dos

lipídeos em eicosanóides não inflamatórios, PGE1 ( Figura 10) (CARCIOFI, BAZOLLI; PRADA, 2002; REMANS et al., 2004).

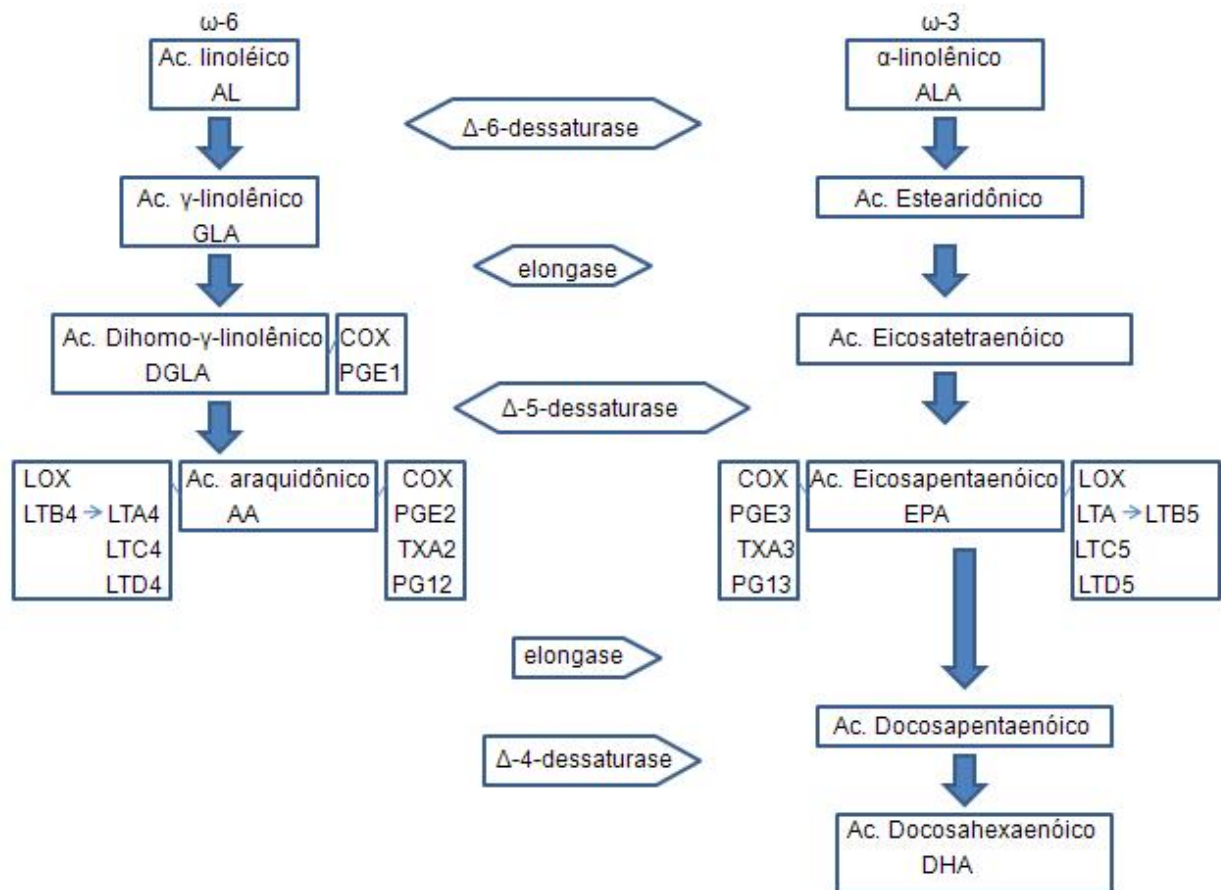


Figura 10- Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados.

Barabino et al. (2003) acompanharam por 45 dias, pacientes portadores de olho seco, confirmados através de testes específicos. Esses indivíduos foram tratados com ácidos linolênico e ácido gama-linolênico (derivados do  $\omega$ -6) e confirmaram a melhora significativa da inflamação da superfície ocular nos grupos tratados com AGE, quando comparados com o grupo tratado com placebo e lágrimas artificiais.

Os eicosanóides sintetizados a partir dos AGPI  $\omega$ 3 são considerados mediadores antiinflamatórios, ou seja menos ativos na ação inflamatória (WAITZBERG, 2009; CAVALLET, 2007; HAIDAMUS, 2006). Pinheiro-Júnior et al. (2007), descreveram um estudo clínico ao acaso de 38 pacientes do sexo feminino,



com diagnóstico de artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico associado a CCS, diagnosticada através de exame clínico e exames específicos. Após 180 dias de tratamento com OL via oral, na dose de 1 e 2 g, observou-se redução da inflamação da superfície ocular e melhora do sintoma da ceratoconjuntivite seca associada a Síndrome de Sjögren.

A inflamação é um processo fisiológico de defesa do organismo, a qual uma vez descontrolada pode desencadear uma doença, assim os AG são compostos essenciais das membranas das células do sistema imune e são necessários para o crescimento e manutenção das mesmas (LAMARÃO e NAVARRO, 2007). James et al. (2000) relatam que os AGE possuem propriedades antiinflamatórias naturais. A suplementação dietética com ácidos graxos poliinsaturados podem resultar em respostas clínicas em vários processos patológicos (CARCIOFI; BAZOLLI; PRADA, 2002; ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009).

## REFERÊNCIAS

ANDRADE S. F. Terapêutica Oftálmica. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 179-189.

ALMEIDA, K.C.L. **A incorporação de ácidos graxos ômega-3, oriundos da semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), influenciando o desenvolvimento cerebral de ratos filhotes**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Investigativa) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.

ALMEIDA, K.C.L.; BOAVENTURA, G.T.; GUZMAN-SILVA, M.A. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico na formação da bainha mielina. **Revista de Nutrição de Nutrição**, Campinas, v. 22, n.5, p. 747, set./out., 2009.

BARABINO, S. et al. Systemic Linoleic and  $\gamma$ -Linolenic Acid Terapy in Dry Eye Syndrome with and Inflammatory Component. **Cornea**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 97 – 101, 2003.

BARBOSA, E.B. **Avaliação oftalmológica e laboratorial de coelhos hígidos tratados com os colírios Dorzolamida a 2% e Latanoprost a 0,005%**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARROS J. N. et al. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.64, n.2, mar./abr. 2001.

BERDOULAY. A; ENGLISH, R.V.; NALDELSTEIN, B. Effect of topical 0,02% tracolimus aqueous suspension on tear productin in dog with Keratoconjunctitis Sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n. 4, p.225-232, 2005.

BOUNOUS, D.I. et al. Conjuntival Impression Cytology from Dogs with Topical Cyclosporine. **Adv Exp Med Biol**, v. 438, p. 997-1000, 1998.

CAMARGO, G.B. et al. Citologia de impressão na ceratoconjuntivite primaveril. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 6, 2004.

CARCIOFI, A.C.; BAZOLLI, R.S.; PRADA, F. ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na alimentação de cães e gatos. **Revista Educação Continuada CRM-SP/Continuous Education Journal CRM-SP**, São Paulo, v.5, n. 3, p. 268. 2002.

CAVALLET, I.C.R. **Ácidos graxos comparados ao gerioox no tratamento do olho seco por facectomia em cães**. 2007. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrôgenos: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabologia**, v. 46, n. 6, Dez. 2002.

COVINGTON, M.B. Omega-3 fatty acids. **American Family Physician.**, v. 70, n.1, p. 133-140, July 1. 2004.

CONQUER, J. A. et al. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with alzheimer's disease, other types oh dementia and cognitive impairment. **Lipids.**, v.35, n.12, p.1305-1312. 2002.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P.L.; BARBOSA, L.A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista brasileira de farmacognosia** , v. 19, n. 3, p. 727-732, jul./set. 2009.

CREDÍDO, E. **Linhaça: Propriedades Nutricionais**. Disponível em : <[http://www.abran.org.br/inf\\_artigos/lista.htm](http://www.abran.org.br/inf_artigos/lista.htm). 2006>. Acesso em: 28 nov. 2008.

DANTAS FILHO, L.; MENEZES, D.B. Síndrome de Sjögren. Apresentação de um caso. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 61, n. 5, p. 413-417, set./out. 1995.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucin (Review). **Veterinary Ofthalmology.**, v. 7, n. 2, p. 71-77. 2004.

DAVIS, F.A. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. **Trans Ams Ophthalmol Soc**, v. 19, p. 402-41. 1929.

DEFANTE JUNIOR, A. **A Ceratoconjuntivite seca em cães**. 2006. 35 f. Monografia (Especialização em Cirurgia de Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco, Campo Grande.

DEWS – International Dry Eye Work Shop – **Report the ocular surface.**, v.5, n.2, p. 142. 2007.

FAINTUCH, J. S. et al. Propriedades antiinflamatória da farinha de linhaça em pacientes obesos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 4, p. 273-7. 2006.

FELBERG, S.; DANTAS, P.E.C. Diagnóstico e tratamento da síndrome de Ajögren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 69, n. 6, p. 959-63. 2006.

FRIDMAN, D. et al. Olho seco: conceitos, história natural e classificação. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 67, p. 181-5. 2004.

FREITAS, T.M.C. et al. Síndrome de Sjögren: revisão de literatura e acompanhamento de um caso clínico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v.70, n. 2, Parte 1, p. 283-288. mar./abr., 2004.

GARDNER, M.D. **Anatomia – Estudo regional do Corpo Humano**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p. 633-641.

GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3<sup>th</sup> ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 594p.

GILBARD, D.J.P.; ROSSI, S.R.; GRAY, K.L. A new rabbit model keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology visual science**, v. 28, p. 225-228, feb. 1987.

GOMES, J. A. P. et al. Modelo Experimental de olho seco em coelho. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 57, n. 4, p. 264-69, 1994.

GOMES, J. A. P. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, 2000.

GOMES, R.S.; RAYMUND, S.D.; CHAHADE, W.H. Elementos básicos de diagnóstico e de terapêutica da: Síndrome de Sjögren. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 1, Mar. 2008.

GONÇALVES, C.P. **Oftalmologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1979, p, 415 – 417.

H Aidamus, L. L. **A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 reduziu a concentração plasmática de eicosanóides pró-inflamatórios, da enzima lactato desidrogenase e de lesões musculares em ratos submetidos a sessão de natação.** 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

HASSAN-ZADEH, A. et al. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n.6, p. 526-534, 2008.

HERRERA, D. **Oftalmologia clínica em animais de companhia.** São Paulo: Medvet Livros, 2008. p. 117-122.

HOLMBERG, B.J. Ophthalmology of exotic pets. In: MAGGS D.J.; MILLER P.E.; OFRI, R. **Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology.** 4. ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 427-441.

JAMES, M. J. et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am J Clin**, v. 71 (1 Suppl.), p. 343-8. 2000.

KAERCHER, T.; BRON, A.J. Classification and diagnosis dry eye. **Dev Ophthalmol**, v. 41, p. 36-53, 2008.

LAMARÃO, R.C.; NAVARRO, F. Aspectos nutricionais e protetores das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo, v.1, v. 4, p. 57-70, jul./ago. 2007.

LICHTHÄLER, A.G. **Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça marrom e dourada no Ca de mama.** 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Animal) – Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, A.M.V. **Produção lacrimal e densidade de células caliciformes conjuntivas em cães da raça Shih-Tzu.** 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

MAGGS, D. J. Basic diagnostic techniques. In: MAGGS D.J.; MILLER P.E.; OFRI, R. **Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology.** 4 ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 81- 106.

MARTINS, M.B. et al. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Ômega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. **Revista Institucional das Ciências da Saúde**, v. 26, n. 2, p.153-156, 2008.

MILLER, P.E. Lacrimal system. In: MAGGS, D.J.; MILLER, P.E.; OFRI, R. **Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4. ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 157-174.

OOMAH, B. D. Flaxseed as functional source. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.81, p. 889-894, 2001.

PENIDO, A. **A linhaça no combate à cólica e laminite dos cavalos**. Disponível: <[www.nordeste rural.com.br/nordeste rural/manter.asper.newsldhtm](http://www.nordeste rural.com.br/nordeste rural/manter.asper.newsldhtm)>. Acesso em: 31 out. 2008.

PEREIRA, R. Linhaça é super. **Revista Saúde**. Disponível em: <<http://www.lufrancesa.com/desafio/?p=178>>. Acesso em: 19 maio 2009.

PIGATTO, J.A.T. et al. Ceratocinjuntivite seca em cães e gatos. **Acta Scientiae veterinariae**, v. 35 (Supl 2), p. s250-s251, 2007.

PINHEIRO JÚNIOR, M. N. et al. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjögren. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 4, p. 649-655, 2007.

REMANNS, P. H. J. et al. Nutriente supplementation with polyunsaturated fatty acids and micronutrients in rheumatoid arthritis: Clinical and biochemical effects. **Europe Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 839-845. 2004.

RUXTON, C. Health benefits of Omega-3 fatty acids. **Nursing standart**, v.18, n.48, p. 38-42. 2004.

TANG-LIU, D.D.S., ACHEAMPONG, A. Ocular Pharmacokinetics and Safety of Ciclosporin a Novel Topical Treatmente for Dry Eye. **Clin Pharmacokinet**, v. 44, p. 3. p. 247 – 261, 2005.

THOMPSON, L.U. et al. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. **Nutr câncer**, v. 26, p. 159-165. 1996a.

THOMPSON, L.U. et al. Flaxseed and its lignin and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1373-1376. 1996b.

THOMPSON, L.U. Flaxseed, lignans, n-3 fatty acids, and drug synergy in the prevention and treatment of cancer. In: THOMPSON, L.U Ward WE. *Food drug synergy and safety*. Ontario, Canada: Lilian U Thompson, 2006. p. 147-73

TONATO, C. Alimentos funcionais. Einstein: **Educ Contem Saúde**, v. 5, n. 2, p. 2004.

VALE, N. B. Analgesia adjuvante e alternativa. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 56, n. 5, p. 530-555, set./out. 2006.

VAUGHAN, D.; ASBURY, T. **Oftalmologia geral**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1990. cap. 3: Exame, p. 15 – 33.

VIVINO, F. B. Síndrome de Sjögren: uma doença em evolução. **Medscape Rheumatology**, v. 5, n. 2, 2004.

WAITZBERG, D.L. **Ômega-3: o que existe de concreto?**. Disponível em: <[http://www.amway.com.br/downloads/misc/monografia\\_omega3.pdf](http://www.amway.com.br/downloads/misc/monografia_omega3.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2009.

WILLIAMS, D. Rabbit and rodent ophthalmology. **ESCAP**. v. 17, n. 3, Dec., 2007.

XIONG, C. et al. A rabbit dry model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. **Investigative Ophthalmology & visual Science**, v. 49, n. 5, May. 2008.

## ARTIGO CIENTÍFICO

**Uso de óleo de semente de linhaça no tratamento da ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos**

Magda Luzia Neves,<sup>a</sup> Silvia Franco Andrade,<sup>b</sup> Letícia Yamasaki,<sup>c</sup> Osimar de Carvalho Sanches,<sup>c</sup> Rogério Giuffrida,<sup>d</sup> Eudes Ramalho Candido,<sup>e</sup> Jonatas Eduardo Góes,<sup>e</sup> Luís Felipe da Costa Zulim,<sup>e</sup> Augusto Schweigert<sup>f</sup> e Rosimery Missuzu Fukui<sup>f</sup>

*<sup>a</sup>Discente do Curso do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposos Tavares, Km 572, CEP 19001-970, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>b</sup>Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais (UNOESTE); <sup>c</sup>Departamento de Anatomia Patológica (UNOESTE); <sup>d</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brazil, <sup>e</sup>Discente do Curso de Medicina Veterinária (UNOESTE); <sup>f</sup>Residente do Hospital Veterinário (UNOESTE).*

Endereço para contato: M. L. Neves. Tel: (18) 39032338, (18) 91186387

e-mail: magda\_lneves@yahoo.com.br

Título Abreviado: Uso óleo de linhaça na ceratoconjuntivite seca em coelhos



**RESUMO:**

**Objetivos:** Avaliar a eficácia do óleo de semente de linhaça (OL) em várias preparações (oral, tópica, oral e tópica associada) no tratamento da ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida experimentalmente em coelhos.

**Animais:** Vinte coelhos brancos machos da raça Nova Zelândia.

**Procedimento:** Os animais foram divididos em 4 grupos com 5 animais cada: Grupo C (controle); Grupo OLO (OL via oral); Grupo OLT (OL por via tópica) e Grupo OLOT (OL via oral e tópica). Os animais foram avaliados semanalmente pelo Teste de Lágrima de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF) e Teste de Rosa Bengala (TRB), uma vez por mês pelo o exame de citologia de impressão ocular, e ao final do experimento foram eutanasiados para análise histopatológica.

**Resultados:** Houve melhora significativa nos parâmetros analisados (TLS, TF e TRB) em todos os grupos que usaram OL. No TLS os grupos OLO e OLT apresentaram valores maiores do que o grupo OLOT. No TF o grupo OLT reverteu mais precocemente a presença de úlceras na córnea, do que os demais grupos. No TRB, tanto o grupo OLO como o OLT apresentaram valores negativos mais precocemente do que grupo OLOT. Nos achados citológicos o grupo OLT apresentou um maior grau de inflamação e também nos achados histopatológicos um maior grau de edema, degeneração e necrose do que os demais grupos. Não foi observado nenhum efeito colateral com o uso do OL.

**Conclusão:** Os resultados analisados demonstram que o OL, tanto por via oral como tópica, foi eficaz no tratamento de CCS induzida experimentalmente em coelhos e pode ser um adjuvante natural no tratamento desta enfermidade.

**Palavras-chave:** Coelhos, ceratoconjuntivite seca, óleo de semente de linhaça, citologia de impressão ocular, histopatológico.

## INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é caracterizada por uma inflamação crônica da córnea, conjuntiva e glândulas lacrimais, ocasionada por alterações quantitativas e/ou qualitativas da lágrima, também denominada de filme lacrimal pré-corneal (FLP), que conduz a um comprometimento no deslizamento das pálpebras, tornando deficiente ou nula a função protetora da lágrima, afetando assim, as estruturas da córnea e conjuntiva propiciando infecções secundárias que evoluem com a destruição tecidual e cegueira.<sup>1,2</sup>

O FLP é composto de três camadas: a camada externa lipídica secretada pelas glândulas tarsais ou meibomianas e glândulas de Zeiss, cuja função é retardar a evaporação e estabilizar a superfície lacrimal. A camada intermediária aquosa é secretada principalmente pela glândula lacrimal e da terceira pálpebra ou nictante, que contém inúmeros componentes como proteínas, sais inorgânicos, glicose, uréia, vitaminas, fatores de crescimento, que tem como função prover oxigênio, nutrientes, proteção e lubrificação da córnea. E a camada interna mucóide composta por mucina, é secretada pelas células caliciformes da conjuntiva, que tem a função de permitir a aderência do FLP à córnea.<sup>1-3</sup>

A literatura traz uma série de indicações terapêuticas para CCS, entre elas: substitutos da lágrima (polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, metilcelulose, ácido poliacrílico, ácido hialurônico e sulfato de condroitina), uso de imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus) e antiinflamatórios (esteróides e não-esteróides), controle de infecções secundárias com o uso de antibióticos, além de outras drogas como pilocarpina (droga parassimpatomimética lacrimomimética) e acetilcisteína (mucolítico).<sup>2,4-8</sup> Na veterinária, o tratamento mais preconizado é o uso dos imunossupressores lacrimomiméticos como a ciclosporina A, tacrolimus e pimecrolimus.<sup>5-9</sup>

Recentemente na Medicina, alguns estudos com a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega-3 ( $\omega$ -3) e ômega-6 ( $\omega$ -6), por via oral, demonstraram ser uma

terapêutica alternativa para portadores das variadas formas de deficiência lacrimal como em pacientes portadores de síndrome de Sjögren,<sup>10-12</sup> ou em pacientes portadores de CCS.<sup>13</sup> Além disso, o uso tópico de  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 mostrou ser eficiente no controle dos sinais de inflamação em ratos induzidos experimentalmente para CCS.<sup>14</sup>

Os AGE  $\omega$ -3 são encontrados em muitos alimentos como nozes, peixes de águas frias, semente de soja, óleo de canola e o óleo de linhaça.<sup>10,15,16</sup> A linhaça, *Linum usitatissimum*, da família Lineaceae, é rica em proteínas, fibras, minerais, vitaminas e lipídios, sendo composta por 57% de ácidos graxos  $\omega$ -3, 16% de  $\omega$ -6, 28% de ácido graxo monoinsaturado e somente 9% de ácidos graxos insaturados.<sup>10,17-19</sup> Estudos relatam a utilização da linhaça na prevenção de doenças coronarianas e câncer devido ao  $\omega$ -3 e compostos fenólicos, um fitoestrógeno com propriedades semelhantes ao estrógeno.<sup>15,16,20-24</sup> Em humanos, é utilizada como auxiliar no tratamento de doenças como o diabetes, problemas dermatológicos, tensão pré menstrual, osteoporose e olho seco.<sup>16,17,21-27</sup>

A inflamação é caracterizada por quatro sinais clássicos: dor, calor, rubor e edema, além disso, observa-se a presença de mais um sinal, a perda da função.<sup>24</sup> Todos esses sinais são desencadeados por mediadores inflamatórios como as aminas, os eicosanóides e as citocinas.<sup>19</sup> Os eicosanóides são substâncias biologicamente ativas na regulação de processos fisiológicos, são também mediadores dos processos inflamatórios lipídicos.<sup>27</sup> Tem como base para sua formação os ácidos dihomog- $\gamma$ -linoléico (ADGL), ácido araquidônico (AA) ambos da série  $\omega$ -6 e ácido alfa-linolênico (ALA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) da série  $\omega$ -3 (Figura 1).<sup>26-29</sup>

Os AGPI  $\omega$ -6 derivados do AA da série 2: prostaglandinas (PGE2), tromboxanos (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrienos da série 4 (LTA4, LTB4, LTC4 e LTD4) são considerados mediadores pró-inflamatórios.<sup>28,30</sup> Os eicosanóides sintetizados do AGDL da série  $\omega$ 6, concentram-se na membrana celular, bloqueando o metabolismo do AA,

transformando os mediadores dos lipídeos em eicosanóides não inflamatórios pela ação da cicloxigenase 1 (COX1), as prostaglandinas da série 1 (PG1) e tromboxano A1 (TXA1).<sup>17,24-27,29</sup> Enquanto os eicosanóides sintetizados a partir do AGPI  $\omega$ -3, ALA, DHA e EPA produzem mediadores antiinflamatórios através da ação da COX1 (PGE3 e TXA3) e da ação da lipoxigenase (LTA5, LTB5, LTC5 e LTD5) (Figura 1).<sup>10,16,25-27</sup>

A composição dos AGPI das membranas celulares depende em grande maioria, da quantidade ingerida na dieta. Alguns estudiosos consideram satisfatória a relação dietética de AGPI  $\omega$ -3: $\omega$ -6 quando em 5:1 ou até 10:1,<sup>16,19,20,31</sup> outros, no entanto, acreditam que a relação 1:3 é próxima do ideal, o que é observada na composição da linhaça.<sup>17,26</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do OL, rico em  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, por via oral, tópica, e oral e tópica associadas, no controle das alterações clínicas, citológicas e histopatológicas provocadas pela inflamação na CCS induzida experimentalmente em coelhos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário e biotério da Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. Foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNOESTE e foi aprovado com o protocolo nº 014/09.

Foram utilizados 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, da raça Nova Zelândia, adultos com idade aproximada entre 18 a 22 meses e com peso variando entre 3 a 4 kg. Estes animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais, com água e ração (ração para coelhos, Supra<sup>®</sup>) *ad libitum*.

O modelo de indução da CCS em coelhos foi baseado num estudo previamente publicado<sup>32</sup> que inclui a retirada das glândulas lacrimais e nictantes associada ao uso de sulfato de atropina colírio 1% em dose única previamente a cirurgia, e depois 3x ao dia, até

que se confirmasse o diagnóstico de ceratoconjuntivite seca (CCS) ( $TLS \leq 5\text{mm}/\text{min}$  e/ou TRB positivo) e durante todo o período de tratamento (12 semanas) para manutenção da CCS. As cirurgias para remoção das glândulas lacrimais (dacrioadenectomia) e membranas nictantes foram realizadas no Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário da UNOESTE, sempre pelo mesmo cirurgião. Como medicação pré-anestésica receberam  $1\text{mg}/\text{kg}$  de xilazina 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer) e  $6,0\text{mg}/\text{kg}$  de cloridrato de quetamina 5% (Ketalar<sup>®</sup>, Aché) por via intramuscular (IM) e anestesia geral inalatória com Halotano (Halothane<sup>®</sup>, Wyeth). No pós-operatório foi utilizado em ambos os olhos, BID, tópico, durante 5 dias, Epitezam<sup>®</sup> pomada oftálmica, Cloranfenicol<sup>®</sup> colírio, 1 gota, e Still<sup>®</sup> colírio, 1 gota.

Os momentos de avaliação foram considerados como M0 (antes da cirurgia de indução de CCS), M1 (1 semana após a indução da CCS e início do tratamento) e M2 até M12 (avaliações com intervalo de 1 semana após o início do tratamento). Dos 20 coelhos, 15 foram induzidos para a CCS conforme o protocolo já descrito e 5 foram alocados no grupo controle sem indução da CCS. Uma semana após a indução da CCS os animais foram tratados durante 12 semanas da seguinte maneira: Grupo C (n=5) controle (1 gota de placebo - solução de NaCl 0,9%) tópica, BID, em ambos os olhos; Grupo OLO (n=5) (OL líquido -Laboratório Ophthalmos-SP, por via oral, na dose de  $1\text{g}/\text{dia}$ <sup>10</sup>, Grupo OLT (n=5) (OL tópico na forma de colírio - Laboratório Ophthalmos-SP, 1 gota, BID, em ambos os olhos);<sup>14</sup> Grupo OLOT (n=5) (OL líquido, por via oral, na dose de  $1\text{g}/\text{dia}$  associado ao OL tópico na forma de colírio, 1 gota, BID, em ambos os olhos).

O Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Figura 2A) foi realizado para avaliar a quantidade de lágrima produzida, onde após limpeza ocular com algodão seco, 0,5 mm da ponta da fita de Schirmer foi introduzida no saco conjuntival por um período de 1 minuto e posteriormente retirado e a quantidade de lágrima mensurada, e considerado positivo para CCS valores  $\leq 5\text{mm}$ . O Teste de Fluoresceína (TF), (Figura 2B) foi realizado para observar a

presença ou não de úlceras coradas, com a fita de fluoresceína 1%, encostando-a no saco conjuntival, e utilizado o escore 1: negativo para úlcera de córnea; 2: positivo para úlcera de córnea. O Teste de Rosa Bengala (TRB) (Figura 2C) foi realizado para a coloração de células desvitalizadas pela CCS, onde após instilação de colírio anestésico, foi utilizada 1 gota do colírio de Rosa Bengala 0,5%, considerando-se: 1 ausência de células coradas desvitalizadas para CCS, e 2 presença de células coradas desvitalizadas para CCS. Após a utilização dos corantes os olhos foram lavados com solução fisiológica, para retirada dos mesmos, pois podem causar irritação ocular.<sup>4,33,34</sup>

A citologia de impressão (CI) ocular foi realizada uma vez por mês (M4; M8; M12). Os animais receberam colírio anestésico e então, coletou-se o material da superfície ocular de ambos os olhos, utilizando-se papel de filtro Milipore HAWP04700. O papel de filtro foi cortado manualmente, com dimensões aproximadas de 5mm de largura por 7 mm de altura. Foram analisadas amostras da conjuntiva superior e inferior. Após pressão por 5 segundos o papel filtro era removido e posteriormente fixado através da utilização da solução de álcool etílico a 70%, ácido glacial e formaldeído a 37% na proporção de 20:1:1 em tubo de ensaio por 4 dias, e submetido às técnicas de coloração de ácido periódico de Schiff (P.A.S.), hematoxilina e Papanicolau modificado.<sup>35-38</sup> Os parâmetros observados na CI foram: celularidade, relação núcleo-citoplasma, alteração de núcleo, junções intercelulares (coesão), quantidade de células caliciformes, presença de mucina e de inflamação.

Para análise histopatológica, ao final do experimento, no M12, o globo ocular após a enucleação foi colocado em solução de formol a 10% por 24 a 48 horas. Em seguida foram armazenados em álcool 70% e processados conforme a técnica para inclusão em parafina, e obtidos cortes de 5µm de espessura da córnea e conjuntiva, os quais foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (H.E.) e ácido periódico de Schieffer (P.A.S.).<sup>39</sup> Os parâmetros observados para córnea e conjuntiva foram: edema, degeneração celular, necrose,

presença de neutrófilos, células mononucleares e misto; e contagem de células caliciformes conjuntivais que foi realizada com objetiva de 40x num perímetro de 800 µm utilizando um analisador de imagens com o software Micrometrics® (SE Premium).

Para as variáveis TLS e densidade de células caliciformes foi utilizado o teste de análise variância para amostras pareadas com contrastes pelo método de Tukey. Para as variáveis TF, TRB, citologia de impressão e histopatologia foram utilizados os testes não paramétricos de Friedman, para comparação de momentos,<sup>40</sup> e Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Dunn, para comparação de grupos.<sup>41</sup> A análise estatística foi realizada utilizando o software Biostat®. Foi adotado o nível de significância de  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

Neste experimento, com o protocolo utilizado, o tempo de indução da CCS em coelhos foi em média de 7 a 10 dias. O grupo C (controle) manteve os parâmetros normais durante o período experimental em todos os testes realizados.

### 1. Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)

Os resultados do TLS estão descritos na Figura 3. A partir do primeiro dia após a indução da CCS até o final do experimento (M12) os resultados do TLS dos animais dos grupos de tratamento (OLO, OLT e OLOT) mostraram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle (C).

A partir do M1, os Grupos OLO, OLT e OLOT já apresentavam resultados positivos para CCS,  $4,9 \pm 0,1$ ;  $4,8 \pm 0,3$  e  $4,5 \pm 0,4$ , respectivamente. Estes resultados não diferiram estatisticamente entre si, mas apresentaram redução estatística quando comparado com o Grupo C. Em contraste com o Grupo C, Grupo OLO apresentou valores significativamente maiores nos momentos M4 e M5, M7 e M8, e depois do M10 ao M12. Somente o Grupo OLT

apresentou valores significativamente maiores desde o M2 até o M12. No Grupo OLOT os valores só foram significativamente maiores nos momentos M2, M3 e M10.

## **2. Teste de Fluoresceína (TF)**

Os resultados do TF estão descritos na Figura 4. No M0 todos os animais foram negativos para o TF. A partir do M1 até o M4 o teste foi positivo em todos os grupos que foram induzidos a CCS e tratados com diferentes apresentações de OL (OLO, OLT e OLOT). Apenas 1 coelho (n. 4 do grupo OLOT) apresentou uma úlcera em “melt” (Figura 5).

A partir do M5 o único grupo de tratamento negativo para o TF foi o grupo OLT, ocorrendo o mesmo com o grupo OLO no M7, e somente no M8 no grupo OLOT.

## **3. Teste de Rosa Bengala (TRB)**

Os resultados do TRB estão descritos na Figura 6. No M0 nos grupos estudados observaram-se resultados negativos para TRB. A partir do M1 até o M7 todos os grupos de tratamento mostraram-se positivos para o TRB. No M9 os grupos OLO e OLT foram negativos e isto só ocorreu com o grupo OLOT no final do experimento no M12.

## **4. Citologia de Impressão (CI)**

Os resultados da CI conjuntival estão descritos na Tabela 1. No parâmetro celularidade observou-se valores dentro da mediana no M4 e M8 e no M12 encontravam-se abaixo.

O parâmetro núcleo/citoplasma no M4 e M12 nos Grupos OLO, OLT e OLOT manteve uma proporção de 1:3, somente o Grupo OLO, no M8 observou-se uma mudança de comportamento onde a proporção foi de 1:4, enquanto os Grupos OLT e OLOT neste momento não apresentaram alterações. Quanto ao parâmetro alteração de núcleo nos três momentos, M4, M8 e M12, não apresentaram alteração quando comparados com o Grupo C. Na avaliação da coesão pode-se observar que esta se apresenta ausente no Grupo OLOT no M4 e nos Grupos OLO e OLOT no M8.



As células caliciformes apresentaram-se ausentes em todos os grupos tratados e em todos os momentos, diferenciando-se do Grupo C. Desta forma, com a ausência das células caliciformes também observou-se a ausência de seu produto, o muco, em todos os grupos tratados nos três momentos estudados.

A infiltração inflamatória foi observada nos Grupos OLO, OLT e OLOT no M4 e M8. No Grupo OLO, no M4, observou-se um aumento significativo (presença de 20 a 40 células por campo) (Figura 7), enquanto nos Grupos OLT e OLOT o número das células inflamatórias foi menor ou igual a 20 por campo. Este aumento significativo das células inflamatórias também foi observado no M8 no grupo OLOT. No M12 notou-se a ausência da infiltração de células inflamatórias em todos os grupos experimentais.

## **5. Histopatológico de córnea e conjuntiva**

Os resultados do histopatológico da córnea e conjuntiva estão descritos na Tabela 2. No Grupo C não foi observado alterações (Figura 8A). Nos achados histopatológicos da córnea observou-se um leve edema nos grupos OLO (Figura 8B), quando comparados com o grupo OLT que apresentou um edema moderado (Figura 8C e 8D e Figura 9). A presença de degeneração só foi observada no grupo OLT e foi considerada entre leve a moderada.

Os valores medianos de necrose e presença de inflamação (presença de neutrófilos, células mononucleares e processo misto), foram ausentes em todos os grupos experimentais. No Grupo OLT observou-se a presença de infiltrado inflamatório com exocitose de neutrófilos (Figura 9B e 10C).

Nos resultados histopatológicos da conjuntiva, os Grupos OLO (Figura 8B) e OLOT (Figura 10) apresentaram leve e moderada presença de edema, respectivamente, e enquanto o Grupo OLT edema acentuado. Quanto á degeneração celular não houve mudança de comportamento quando comparado com o parâmetro anterior. No item necrose o grupo OLO e o Grupo OLOT (Figura 10) apresentaram leve presença quando comparados com o Grupo

OLT que apresentou necrose moderada. Houve um discreto aumento de células caliciformes no Grupo OLT em relação aos outros grupos.

As células inflamatórias nos Grupos OLO e OLT ocorreram de forma leve. No Grupo OLOT (Figura 10A e 10B) observou-se moderada presença de células mononucleares.

## DISCUSSÃO

Estudos tem apresentado várias formas de tratamento da CCS, entre elas observa-se a crescente aplicação dos AGE  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 tanto em suplementação oral, como por via tópica.<sup>10-</sup>

<sup>14</sup> O óleo de semente de linhaça, por ser uma fonte de  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, além de uma relação  $\omega$ -3:  $\omega$ -6 de 3:1 considerada ideal, tem sido estudado nesse sentido.<sup>16,17,19,20,27</sup> Os eicosanóides sintetizados dos ácidos derivados do  $\omega$ -3, EPA e DHA, e os produzidos pelo AGDL da série  $\omega$ -6 competem com o ácido araquidônico (AA) pelas vias enzimáticas cicloxigenase e lipoxigenase, inibindo assim a formação de eicosanóides pró-inflamatórios e aumentando a formação de mediadores antiinflamatórios.<sup>10,17,24-27,29</sup>

O grupo tratado com OL via oral (Grupo OLO) apresentaram quadro de normalidade na produção de lágrima na segunda semana após iniciar o tratamento e com aumento significativo acima do grupo controle nas 3 últimas semanas do experimento. Isto está de acordo com vários estudos em pacientes humanos, principalmente com Síndrome Sögren, aonde a suplementação oral dos  $\omega$ -3 tem sido recomendada para controle dos sintomas da CCS.<sup>10-13</sup> Entretanto, o uso associado da via oral e da via tópica do OL não demonstrou benefício aditivo, sendo que até o final do experimento, o desempenho no TLS, no TF e no TRB foi abaixo dos grupos que utilizaram o OL somente pela via tópica ou pela via oral. É interessante ressaltar a evolução positiva do coelho n. 4 do grupo OLOT.

Neste estudo, a via tópica mostrou-se mais precocemente eficiente para o tratamento da CCS, no incremento da produção de lágrima e mesmo na resolução da úlcera de córnea. Os

mediadores lipídicos têm importante papel na resolução e reparação de injúrias provocadas na córnea.<sup>27</sup> Estes resultados estão de acordo com um estudo que utilizou uma formulação tópica contendo  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, ácido alfa-linolênico (ALA) e ácido linolênico (LA), em ratos experimentalmente induzidos para CCS, que apresentaram melhora dos sintomas inflamatórios da CCS,<sup>14</sup> e com outro estudo<sup>25</sup> que relata que a aplicação tópica de lipídeos derivados de  $\omega$ -3, como o DHA previnem complicações da CCS como erosão e úlceras de córnea.

Os resultados obtidos para a CI, não mostraram muitas diferenças significativas entre os grupos de tratamento, apenas no M4 a presença de uma inflamação maior detectada no grupo OLO, e no momento M8 uma relação núcleo-citoplasma 1:4 diferente do observados dos outros grupos de tratamento que foi de 1:3, o grupo OLT foi o único que apresentou coesão presente, e uma inflamação maior no grupo OLOT. O estudo das células calciformes pela CI se mostrou um método pouco confiável, visto que todos os grupos de tratamento apresentaram valores nulos, talvez pela dificuldade da técnica empregada, citologia de impressão, em obter essas células pela técnica.

Não foi encontrado na literatura estudos sobre o uso do OL na avaliação histopatológica da córnea e conjuntiva. Neste estudo os dados histopatológicos da córnea obtidos após o tratamento com OL mostrou que o Grupo OLO apresentou os melhores resultados, seguido pelo Grupo OLOT, quando comparados com o Grupo OLT. Com relação aos dados histopatológicos da conjuntiva, foi observado resultados favoráveis ao tratamento com discreto aumento do número de células calciformes no Grupo OLT. Apesar deste achado não ser estatisticamente significativo, é importante salientar sua importância clínica, pois estudos descrevem que a diminuição de células calciformes está diretamente relacionada à presença de olho seco, onde poderá ocorrer uma diminuição da produção de mucina, alterando a composição do FPL.<sup>2,11</sup>

São considerados como possíveis mecanismos de ação do OL a ação antiinflamatória, com comprovada resposta inibitória da cascata inflamatória do ácido araquidônico e possivelmente devido à essa ação uma melhora na atividade das células caliciformes e conseqüente aumento na produção de mucina, o que proporciona uma melhora na qualidade do FPL levando a diminuição da evaporação da porção lacrimal aquosa.<sup>10,11</sup>

Foi observado neste estudo que o OL não induziu nenhum efeito colateral. Além disso, o uso concomitante do OL por via oral e tópica não trouxe benefícios aditivos do que o seu uso somente por uma destas vias. Mais estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do OL em formulação tópica ocular devem ser realizados para elucidar estes resultados.

Desta maneira, com os resultados analisados, podemos concluir que o OL, tanto por via oral como tópica, foi eficaz no tratamento de CCS induzida experimentalmente em coelhos e pode ser um adjuvante natural no tratamento desta enfermidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UNOESTE pelo apoio financeiro e ao Laboratório Ophtalmos-SP pela doação de alguns materiais necessários para a execução do experimento.

## **REFERÊNCIAS**

1. Herrera D. *Oftalmologia clínica em animais de companhia*. São Paulo: Medvet Livros, 2008. p. 117 – 122.
2. Miller PE. Lacrimal system. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri, R. *Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4 ed. St Louis:Elsevier, 2008. p. 157-174.

3. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucin (Review). *Veterinary Ophthalmology* 2004;7(2):71-77.
4. Andrade SF. Terapêutica Oftálmica. In: Andrade S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008.p. 179-189.
5. Berdoulay YA, English RV, Naldelstein B. Effect of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspension on tear productin in dog with Keratoconjunctitis Sicca. *Veterinary Ophthalmology* 2005;8(4): 225-232.
6. Izci C, Celik I, Alkan F et al. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *American Journal Veterinary Research* 2002;63(5):688-694.
7. Nell B, Walde I, Billich A et al. he effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from na exploratory study. *Veterinary Ophthalmology* 2005;8(1):39-46.
8. Ofri R, Lambrou GN, Allgoewer I. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. *Veterinary Journal* 2009;179(1):70-7.
9. Tang-Liu DDS, Acheampong A. Ocular Pharmacokinetics and Safety of Ciclosporin, a Novel Topical Treatment for Dry Eye. *Clinical Pharmacokinet* 2005;44(3): 247-261.
10. Pinheiro Júnior MN, Santos PM, Santos RCR, Barros JN, Passos L.F. e Cardoso Neto J. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjögren. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2007;70(4):649-655.
11. Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010;33(2):49-54.

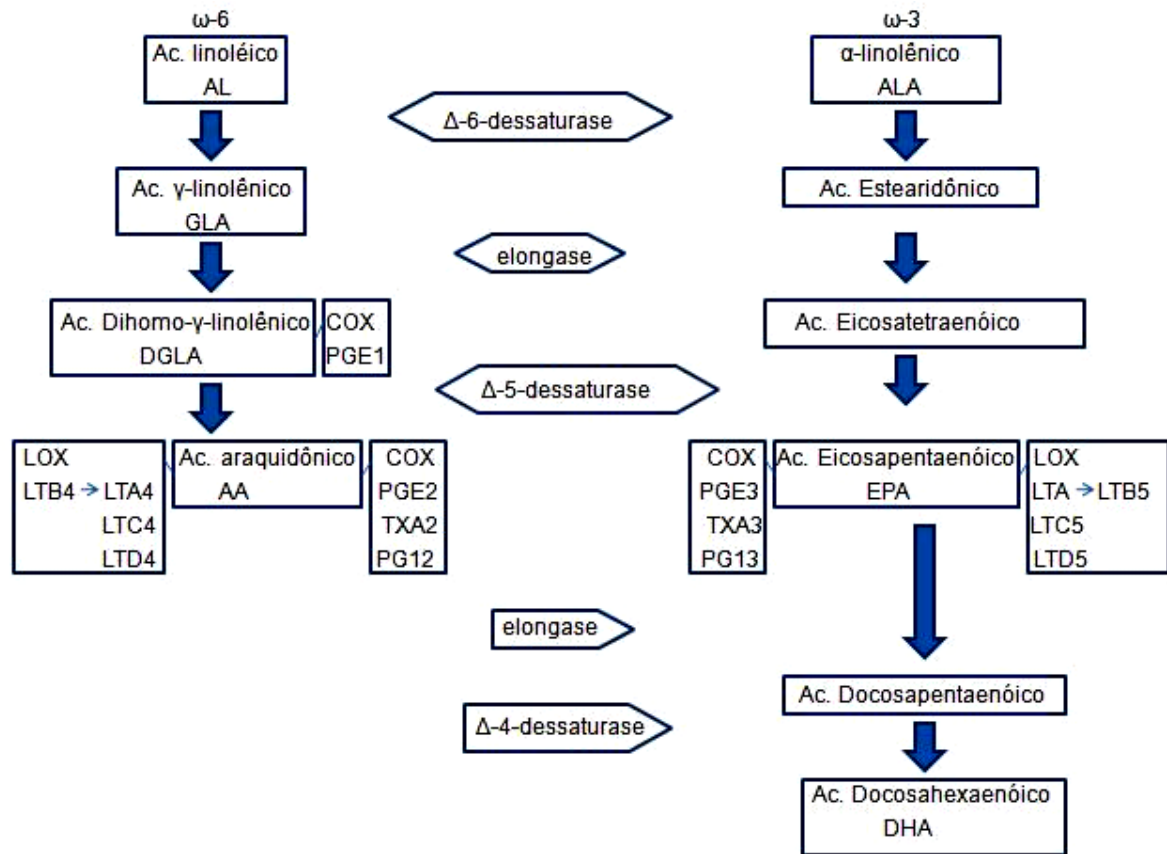
12. Sullivan B, Cermak J, Sullivan R, Papas A, Evans J, Dana M, et al. Correlation between nutrient intake and the polar lipid profiles of meibomian gland secretions in women with Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:441-7.
13. Wojtowicz JC, Butovich I, Uchiyama E. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea* 2011;30(3):308-314.
14. Rashid, S., Jin, Y., Ecoiffer, T. et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Archives of Ophthalmology* 126(2):210-225, 2008.
15. Covington MB. Omega-3 fatty acids. *American Family Physician* 2004;70(1):133-140.
16. Martins MB, Suaiden AS, Piotto RF et al. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Ômega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. *Revista Institucional das Ciências da Saúde* 2008; 26(2):153-156.
17. Oomah BD. Flaxseed as functional source. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2001;81: 889-894.
18. Hassan-Zadeh A et al. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2008;59(6):526-534.
19. Almeida KCL, Boaventura GT, Guzman-Silva MA. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico na formação da bainha mielina. *Revista de Nutrição de Nutrição*, Campinas 2009;22(5):747.
20. Lamarão RC, Navarro F. Aspectos nutricionais e protetores das doenças cardiovasculares. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, São Paulo 2007;4 (1):57-70.
21. Thompson LU, Seidl MM, Rickard SE, Orcheson LJ, Fong H. Antitumorogenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr câncer* 26:159-165. 1996a.

22. Thompson LU, Rickard SE, Seidl MM. Flaxseed and its lignin and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1996b; 17:1373-1376.
23. Thompson LU. Flaxseed, lignans, n-3 fatty acids, and drug synergy in the prevention and treatment of cancer. In: Thompson LU, Ward WE. *Food drug synergy and safety*. Ontario, Canada: Lilian U Thompson, 2006. p. 147-73
24. Carciofi AC, Bazolli RS, Prada F. Ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na alimentação de cães e gatos. *Revista Educação Continuada CRM-S*, São Paulo 2002;5(3): 268.
25. Jiucheng H, Bazan HEP. Omega-3 fatty acids in dry eye and corneal nerve regeneration after refractive surgery. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essentials Fatty Acids* 2010;82(4-6):319-325.
26. Kelly DS, Nelson GJ, Love JE et al. Dietary alpha-linolenic acid alters tissue fatty acid composition, but not blood lipids, lipoproteins or coagulation status in human. *Lipids* 1993;28:533-537.
27. Kenchegowda S, Bazan HEP. Significance of lipid mediators in corneal injury and repair. *Journal of Lipidic Research* 2010;51:879-891.
28. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum Nutr.* 2003;56:67-70.
29. Barabino S, Rolando M, Camicione P, et al. Systemic linoleic and g-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea* 2003;22:97-101.
30. Aragona P, Bucolo C, Spinella R et al. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE1 tear content in Sjögren's syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4474-4479.

31. Almeida, KCL. A incorporação de ácidos graxos ômega-3, oriundos da semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), influenciando o desenvolvimento cerebral de ratos filhotes. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Investigativa) – Universidade Federal Fluminense, Niteroi.
32. Gomes JAP, Cavalho FV, Barros OS et al. Modelo Experimental de olho seco em coelho. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 1994;57(4) p. 264-269.
33. Holmberg BJ. Ophthalmology of exotic pets. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. *Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4. ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 427-441.
34. Maggs DJ. Basic diagnostic techniques. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. *Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4 ed. St Louis:Elsevier, 2008. p. 81- 106.
35. Bounous DI et al. Conjuntival Impression Cytology from Dogs with Topical Cyclosporine. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:997-1000.
36. Camargo GB et al. Citologia de impressão na ceratoconjuntivite primaveril. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2004;67(6).
37. Barros JN, Mascaro VLDM, Gomes JAP, Freitas S D. e Lima ALH. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2001;64(2).
38. Godoy-Esteves CAL, Barros JN, Cunha LS, Mascaro VLD, Höfling-Lima AL, Barros PSM. Padronização da citologia de impressão da superfície ocular canina. *Archives of Veterinary Science* 2005;10 (1):109-115.
39. Tolosa EMC, Rodrigues, CJ, Behmer, AO et al. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. p.34.
40. Morrison DF. *Multivariate statical methods*, 3. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1990. 495p.



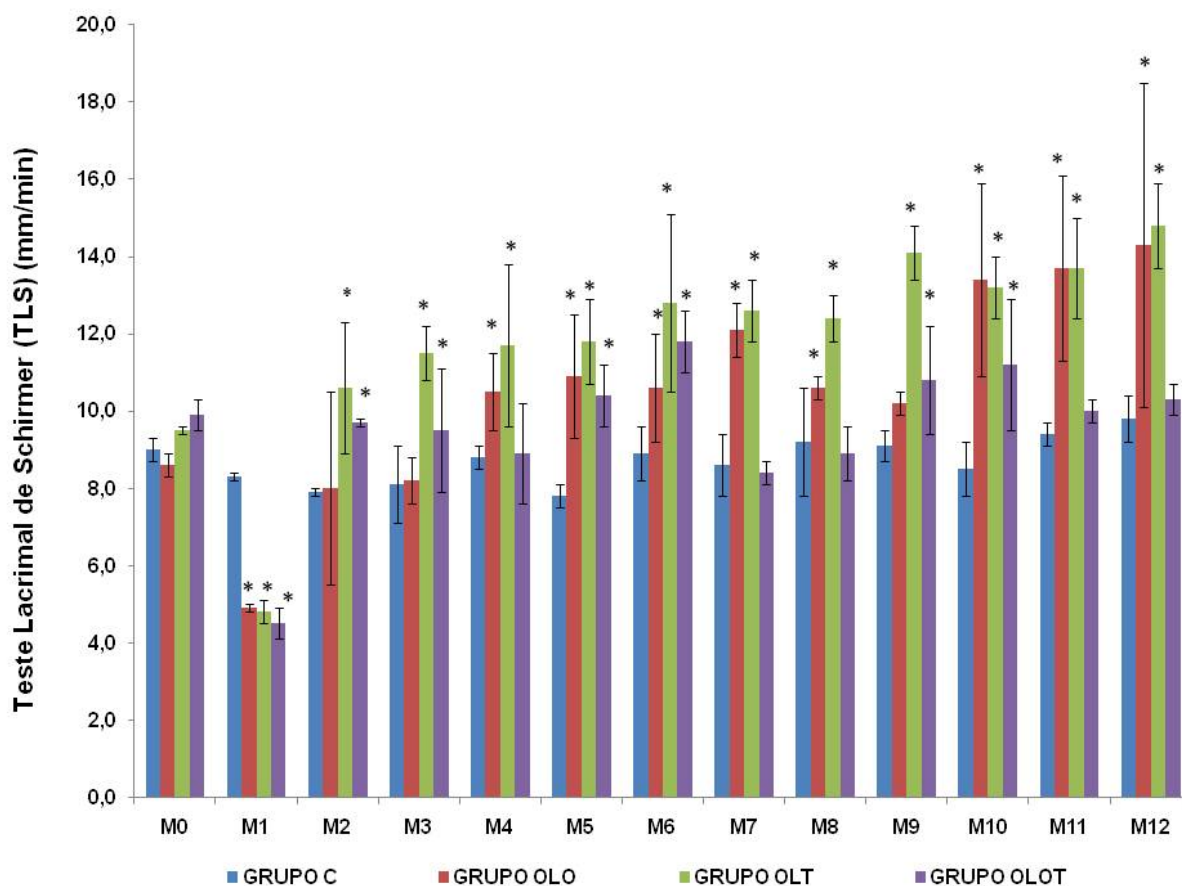
41. Siegel S. Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1975. 350p.



**Figura 1.** Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados.



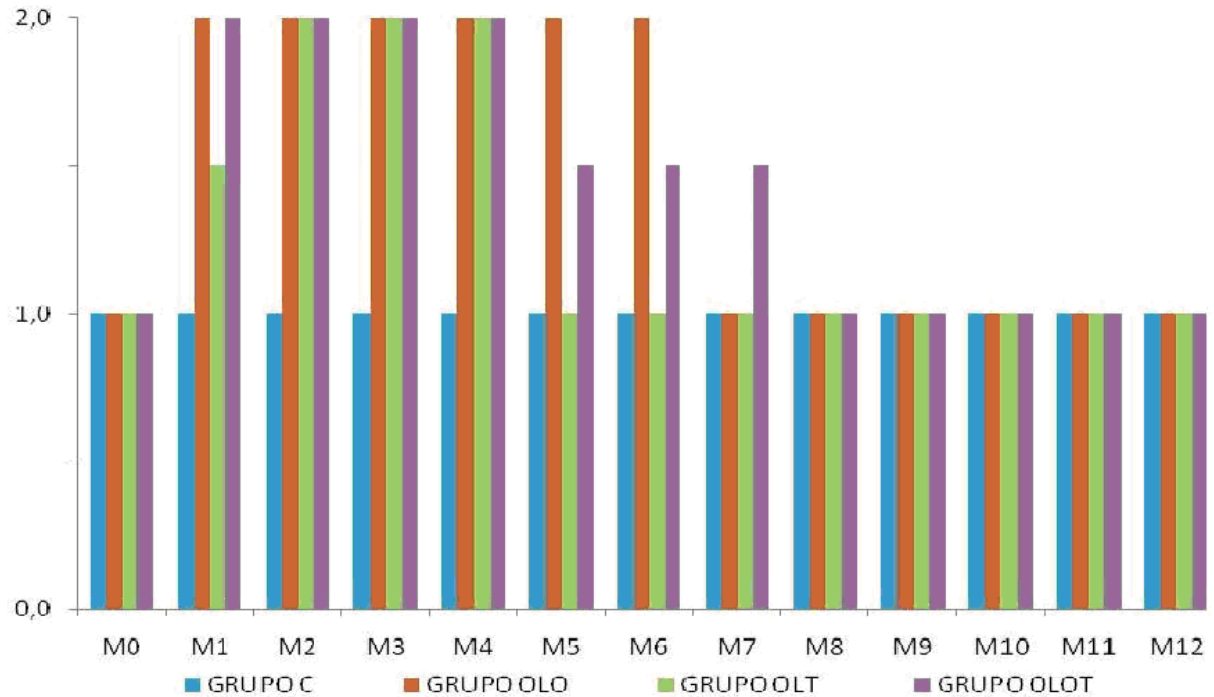
**Figura 2.** (A) TLS em OD de coelho n. 2 do grupo OLO (OL oral) no M1 apresentando valor >5mm/min. (B) TF em OE do coelho n. 1 do grupo OLT (OL tópico) no M4 corando positivo para úlcera de córnea. (C) TRB em OD do coelho n.3 do grupo OLOT (OL oral+tópico) no M4 corando positivo para células desvitalizadas.



**Figura 3.** Médias e desvios padrões dos valores obtidos do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) em mm/min em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento\* com o óleo de semente de linhaça em diversos momentos (M).

\*Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico)

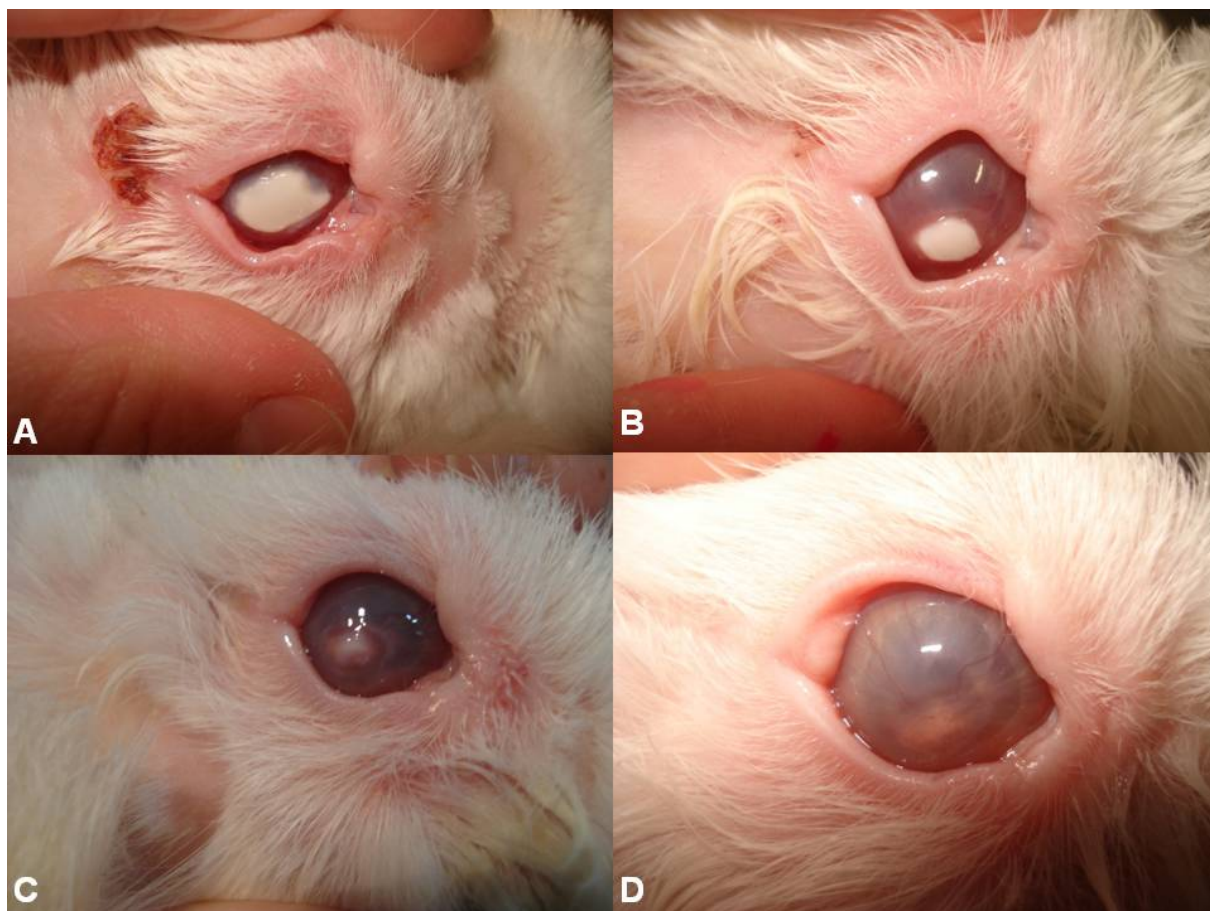
\*\*  $P < 0.05$  (Teste de Tukey)



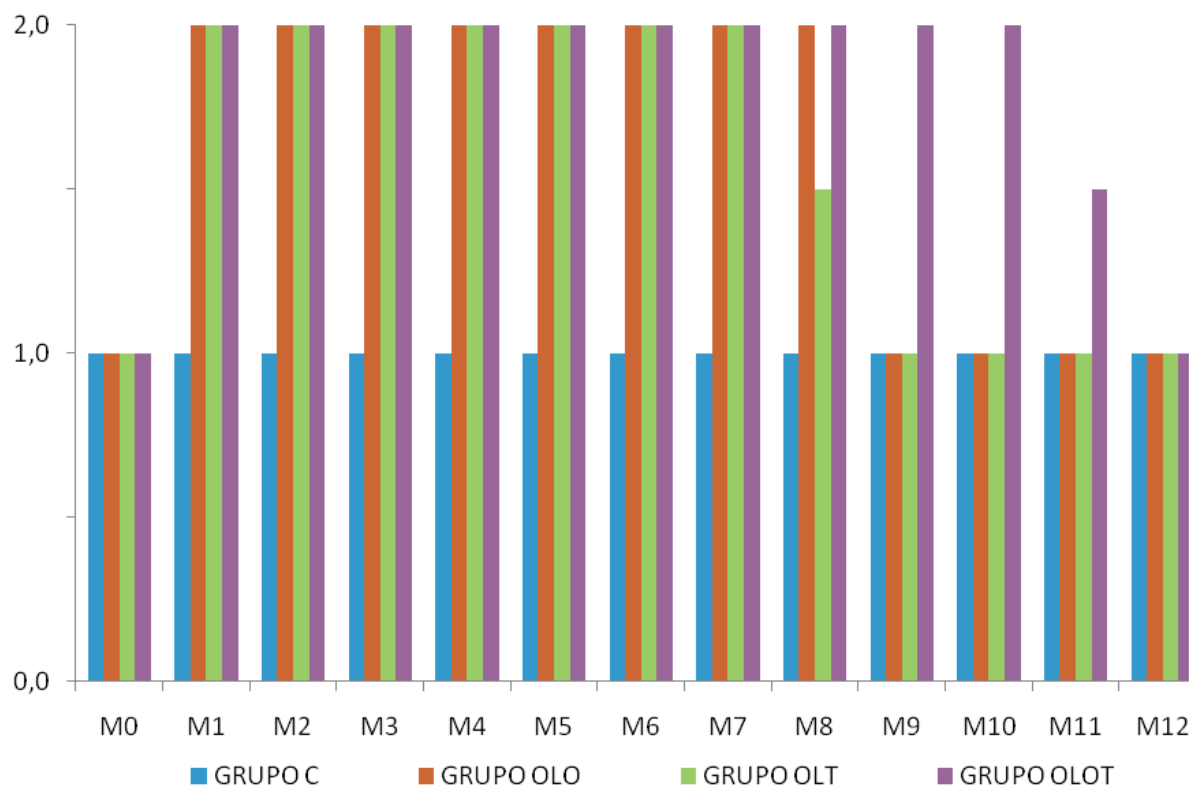
**Figura 4.** Medianas dos valores obtidos do Teste de Fluoresceína\* em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento\*\* com o óleo de semente de linhaça em diversos momentos (M).

\*1=negativo (ausência de úlcera de córnea) e 2=positivo (presença de úlcera de córnea)

\*\*Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico)



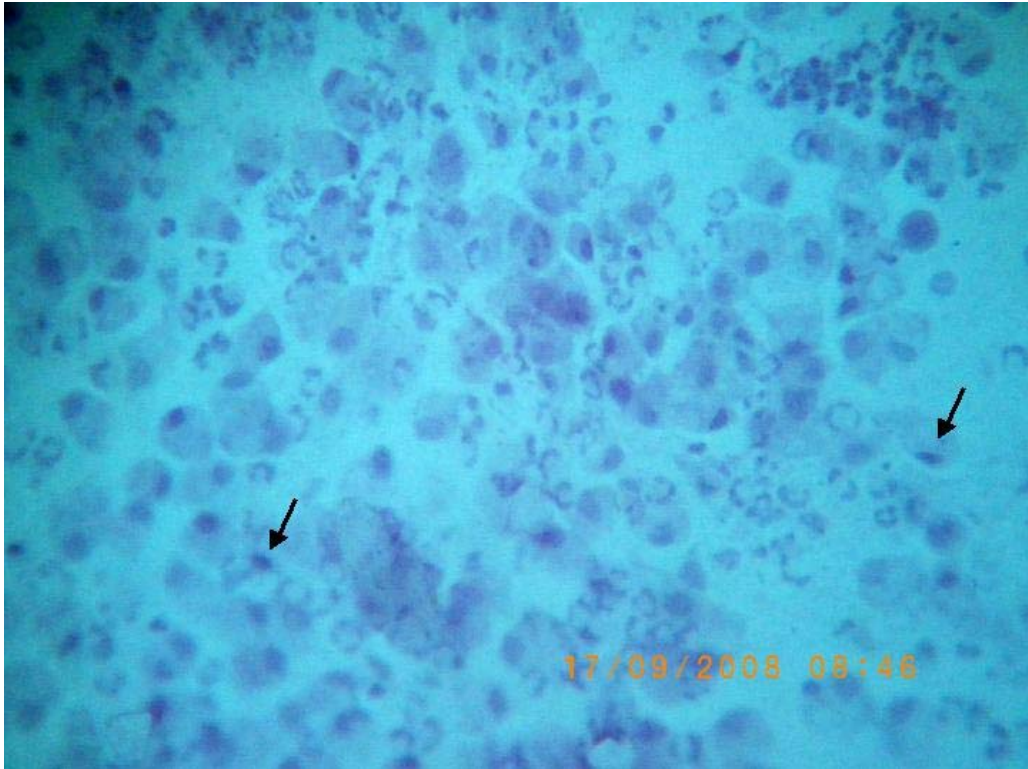
**Figura 5.** Evolução de úlcera de córnea em OD de coelho n. 4 do grupo OLOT (OL oral e tópico). (A) úlcera em “melt” extensa no M1. (B) úlcera em “melt” mediana em plano inferior da córnea com ceratite e neovascularização no M3. (C) úlcera em “melt” pequena em plano inferior da córnea ceratite e neovascularização no M6. (D) resolução da úlcera com ceratite e neovascularização no M9.



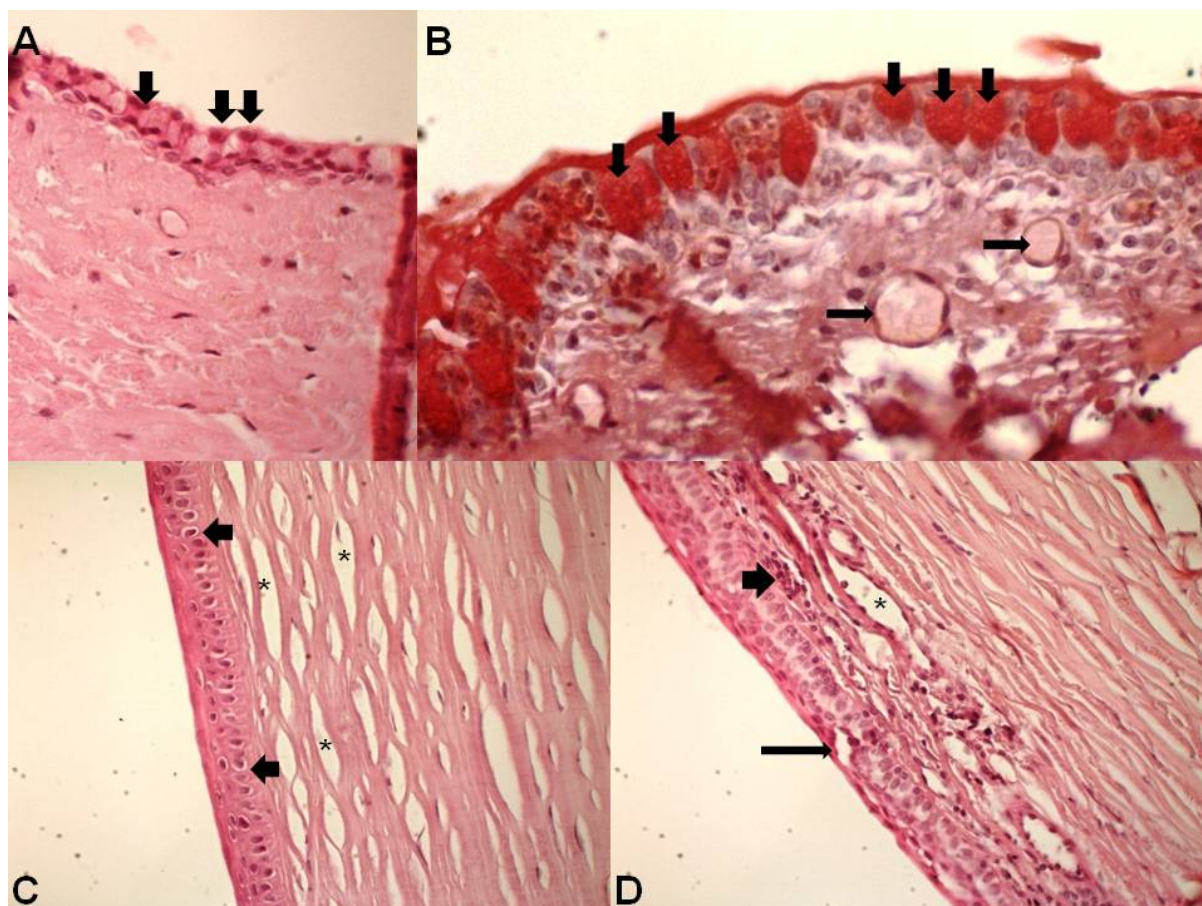
**Figura 6.** Medianas dos valores obtidos do Teste de Rosa Bengala\* em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento\*\* com o óleo de semente de linhaça em diversos momentos (M).

\*1=negativo (ausência de células coradas desvitalizadas pela CCS) e 2=positivo (presença de células coradas desvitalizadas pela CCS)

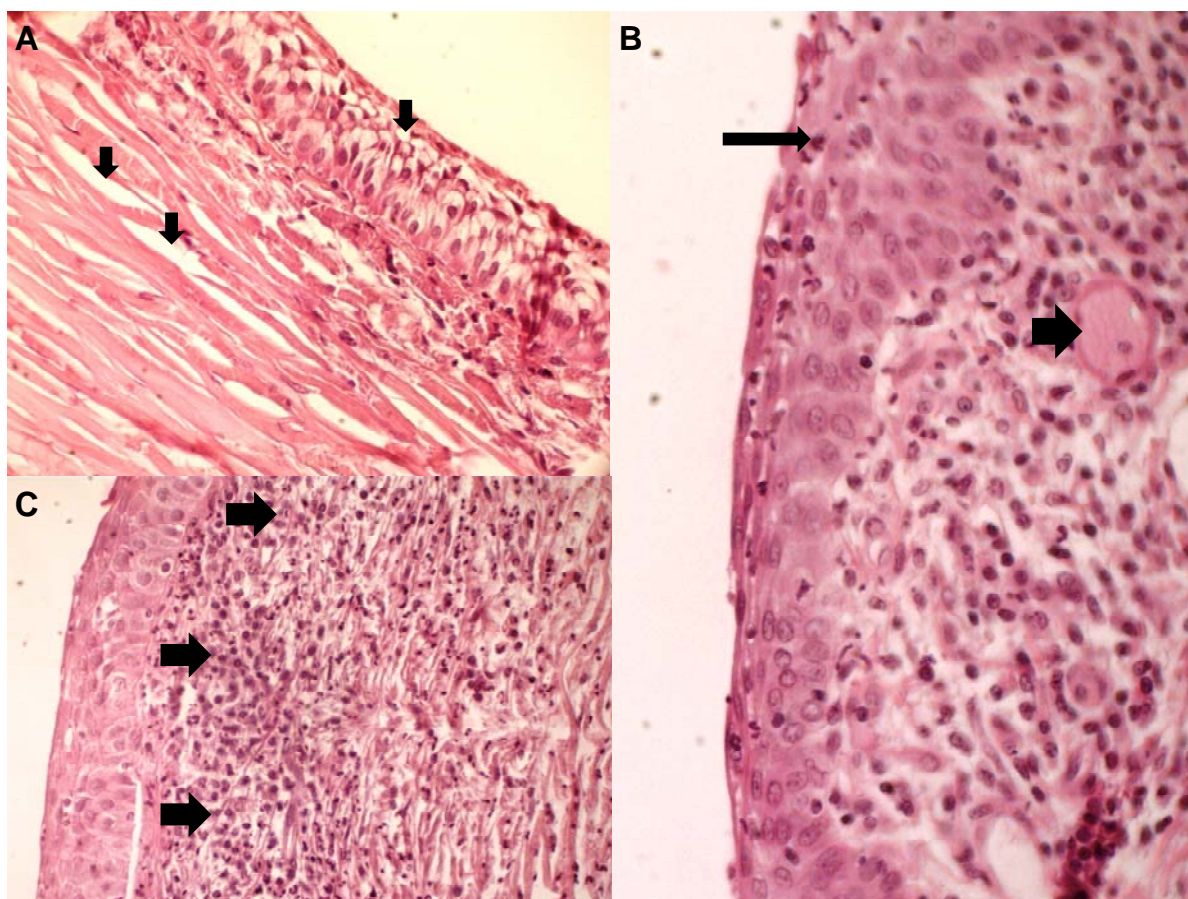
\*\*Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico)



**Figura 7.** Citologia de impressão de córnea. Presença de células polimorfonucleares (>25 células por campo) entre as células do epitélio da córnea. Observa-se falta de coesão intercelular, relação núcleo citoplasma de 1:3 com alguns núcleos picnóticos (setas). Coloração de ácido periódico de Schiff (P.A.S), hematoxilina e Papnicolau modificado, 100X magnificação.

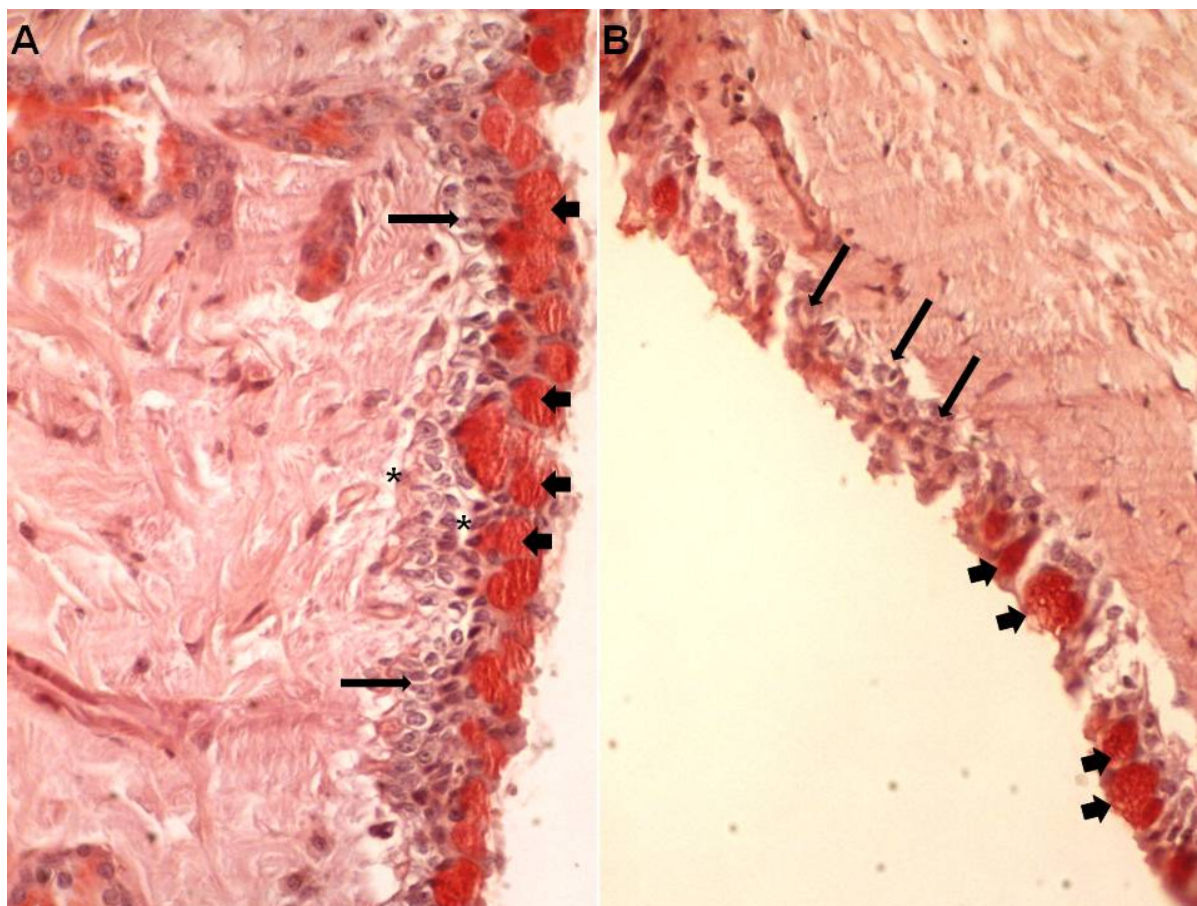


**Figura 8.** Fotomicrografia da córnea e conjuntiva. (A) OE coelho nº 1 grupo C com conjuntiva livre de processo inflamatório, observando-se células caliciformes de forma maciça (setas) P.A.S. (100x). (B) OD do coelho n. 5 do grupo OLO com presença de células caliciformes (setas largas) e edema subconjuntival (setas finas) P.A.S. (100x). (C) OE do coelho n. 1 do grupo OLT com discreta presença de edema em epitélio (setas) e em estroma corneal (\*) H.E. (100x). (D) OD do coelho n. 1 do grupo OLT epitélio corneal apresentando edema moderado (seta fina), área subcorneal evidenciando infiltrado inflamatório moderado com presença maciça de linfócitos (seta larga) e em estroma presença de vaso sanguíneo (\*) H.E. (100x).



**Figura 9.** Fotomicrografia da córnea (OE) de coelho nº 5 do grupo OLT. (A) observa-se edema acentuado em epitélio corneal e subcorneal e em estroma edema moderado (setas largas) H.E. (400x). (B) exocitose de neutrófilos em epitélio corneal com presença de neutrófilos (setas), congestão de vaso sanguíneo em estroma (seta larga) H.E. (400x). (C) epitélio corneal evidenciando exocitose de neutrófilos (seta) e estroma apresentando edema intenso H.E. (400x).





**Figura 10.** Fotomicrografia da conjuntiva do coelho n.2 (A) e n. 4 (B) do grupo OLOT. (A) OD presença de células caliciformes (setas largas), infiltração inflamatória discreta (setas finas) e edema subconjuntival (\*) P.A.S. (400x). (B) OE presença de células caliciformes (setas largas) e infiltração inflamatória basicamente linfocitária com necrose conjuntival (setas finas) P.A.S. (100x).

Tabela 1. Medianas e percentis (P25;P75) dos valores obtidos da citologia de impressão (CI) da conjuntiva em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento com o óleo de semente de linhaça (OL) na 4<sup>a</sup> (M4), 8<sup>a</sup> (M8) e 12<sup>a</sup> (M12) semana do experimento.

Momento	Grupo*	Parâmetros						
		Celularidade <sup>1</sup>	Relação núcleo/citoplasma <sup>2</sup>	Alteração núcleo <sup>3</sup>	Coesão <sup>4</sup>	Células Caliciformes <sup>5</sup>	Muco <sup>6</sup>	Inflamação <sup>7</sup>
M4	C	3 (1;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLO	2 (2;2) <sup>Ba</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;1) <sup>Aa</sup>	2 (0;2) <sup>Ba</sup>
	OLT	2 (1;3) <sup>Ba</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Ca</sup>
	OLOT	2 (2;3) <sup>Ba</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;2) <sup>Ca</sup>
M8	C	3 (2;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;2) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLO	2 (2;3) <sup>Ba</sup>	4 (3;5) <sup>Cc</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Bb</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Cb</sup>
	OLT	2 (1;2) <sup>Ba</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Ca</sup>
	OLOT	2 (1;2) <sup>Ba</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;1) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	2 (0;2) <sup>Bb</sup>
M12	C	3 (1;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;2) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLO	1 (1;3) <sup>Cb</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLT	1 (1;2) <sup>Cb</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;1) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLOT	1 (1;2) <sup>Cb</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>

\*Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico)

<sup>1</sup>Celularidade: (1) 25% do filtro; (2) 50% do filtro; (3) 75% do filtro

<sup>2</sup>Relação núcleo/citoplasma: (1) 1:1; (2) 1:2; (3) 1:3; (4) 1:4; (5) 1:5

<sup>3</sup>Alteração de núcleo: (0) picnose ou cariólise; (1) sem alteração

<sup>4</sup>Coesão: (0) ausente; (1) presente

<sup>5</sup>Células caliciformes: (0) ausente; (1) presente

<sup>6</sup>Muco: (0) ausente; (1) presente

<sup>7</sup>Inflamação (presença de células polimorfonucleares): (0) ausente; (1) ≤10 células por campo; (2) até 25 células por campo; (3) >25 células por campo (40X magnificação)

Letras maiúsculas comparam grupos em cada momento (Teste de Kruskal-Wallis)

Letras minúsculas comparam momentos em cada grupo (Teste de Friedman)

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ )

Tabela 2. Medianas e percentis (P25;P75) dos valores obtidos da histopatologia de córnea e conjuntiva em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a vários tipos de tratamento com o óleo de semente de linhaça (OL) na 12<sup>a</sup> semana do experimento (M12).

Córnea							
Momento	Grupo	Parâmetros <sup>1</sup>					
		Edema	Degeneração	Necrose	Inflamação <sup>2</sup>		
					Neutrófilo	Mononucleares	Misto
M12	c	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OLO	1 (0;1) <sup>B</sup>	0 (0;2) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OLT	2 (0;3) <sup>C</sup>	1,5 (0;2) <sup>B</sup>	0 (0;2) <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>
	OLOT	1 (1;2) <sup>B</sup>	0 (1;2) <sup>A</sup>	0 (0;1) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;1) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>

Conjuntiva								
Momento	Grupo	Parâmetros*						
		Edema	Degeneração	Necrose	Células Caliciformes <sup>3</sup>	Inflamação		
						Neutrófilo	Mononucleares	Misto
M12	c	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	9,8±1,9 <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OLO	2 (2;2) <sup>C</sup>	2 (2;2) <sup>C</sup>	0,5 (0;1) <sup>A</sup>	9,5±2,3 <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;1) <sup>A</sup>	0,5 (0;2) <sup>A</sup>
	OLT	3 (2;3) <sup>D</sup>	3 (2;3) <sup>D</sup>	2,5(1;3) <sup>D</sup>	10,7±2,7 <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>	2 (1;3) <sup>C</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OLOT	1 (1;2) <sup>B</sup>	1 (1;1) <sup>B</sup>	1 (0;1) <sup>B</sup>	9,0±3,8 <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	1 (0;2) <sup>B</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>

\*Grupo C (controle); Grupo OLO (OL oral); Grupo OLT (OL tópico); Grupo OLOT (OL oral+tópico)

<sup>1</sup>(0) ausente; (1) leve; (2) moderada; (3) acentuada

<sup>2</sup>(0) ausente; (1) ≤10 células por campo; (2) até 25 células por campo; (3) >25 células por campo (40X magnificação)

<sup>3</sup>800µm

Letras maiúsculas comparam grupos em cada momento (Teste de Kruskal-Wallis)

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ )

**ARTICLE****Use of linseed oil in the treatment of keratoconjunctivitis sicca experimentally induced in rabbits**

Magda Luzia Neves,<sup>a</sup> Silvia Franco Andrade,<sup>b</sup> Letícia Yamasaki,<sup>c</sup> Osimar de Carvalho Sanches,<sup>d</sup> Rogério Giuffrida,<sup>d</sup> Eudes Ramalho Candido,<sup>d</sup> Jonatas Eduardo Góes,<sup>d</sup> Luís Felipe da Costa Zulim,<sup>e</sup> Augusto Schweigert e <sup>e</sup>Rosimery Missuzu Fukui

<sup>a</sup> Post-graduate in Animal Science, University of Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, CEP 19001-970, Presidente Prudente, SP, Brazil, <sup>b</sup>Departament of Small Animal Medicine (UNOESTE), <sup>c</sup>Departament of Anatomy Pathology (UNOESTE), <sup>d</sup> Faculty of Veterinary Medicine (UNOESTE), <sup>e</sup>Resident of the Veterinary Hospital (UNOESTE).

Contact address: M.L. Neves. Phone: +55(18)39032338, +55(18)91186387

e-mail: magda\_lneves@yahoo.com.br

Abbreviated title: Linseed oil in the keratoconjunctivitis sicca in rabbits

## **ABSTRACT**

*Objective* To evaluate the effectiveness of linseed oil (LO) in the preparations (oral, topical, oral and topical combined) in the treatment of keratoconjunctivitis sicca (KCS) experimentally induced in rabbits.

*Animals* Twenty male New Zealand white rabbits.

*Procedure* The animals were divided into four groups, Group C (control), Group OLO (oral LO), Group TLO (topical LO) and Group OTLO (oral and topical LO). The animals were evaluated weekly by the Schirmer Tear Test (STT) Fluorescein Test (FT) and Rose Bengal Test (RBT), once a month for the examination of ocular impression cytology, and at the end of the experiment were euthanized for histopathological analysis.

*Results* There was significant improvement in the parameters analyzed (STT, FT and RBT) in all groups using LO. The STT in OLO and TLO groups showed higher values than the group OTLO. The FT in the TLO group reversed earlier the presence of corneal ulcers, than the other groups. The RBT in both TLO and OLO group were earlier negative than OTLO group. In the cytological findings in the TLO group showed a greater degree of inflammation on histopathology and also a greater degree of swelling, degeneration and necrosis than the other groups. There were no side effects observed with the use of LO.

*Conclusion* The analyzed results show that the LO, both orally and topically, was effective in the treatment of KCS induced experimentally in rabbits and can be a natural adjunct in the treatment of this disease.

**Keywords:** histopathology, keratoconjunctivitis sicca, linseed oil, ocular impression cytology, rabbits.

## **INTRODUCTION**

The keratoconjunctivitis sicca (KCS) or dry eye syndrome is characterized by chronic inflammation of the cornea, conjunctive and lacrimal glands, caused by quantitative and / or

quality changes of the tear, also called pre-corneal tear film (PTF), which leads to an impairment in the slip the eyelids, making poor or no protective function of the tear, thus affecting the structures of the cornea and conjunctive providing secondary infections that evolve with tissue destruction and blindness.<sup>1,2</sup>

The PTF is composed of three layers: the outer lipid layer secreted by the meibomian or tarsal glands and glands of Zeiss, whose function is to retard the evaporation and stabilize the tear surface. The middle aqueous layer is secreted primarily by the lacrimal gland and the third eyelid or nictitating, which contains numerous components such as proteins, inorganic salts, glucose, urea, vitamins, growth factors, whose function is to provide oxygen, nutrients, protection, and lubrication of the cornea. And the inner layer composed of mucoid mucin is secreted by conjunctival caliciform cells, whose function is to allow the adherence of the PTF to the cornea.<sup>1-3</sup>

The literature provides a variety of therapeutic indications for KCS, including: tear substitutes (polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, methylcellulose, polyacrylic acid, hyaluronic acid and chondroitin sulfate), use of immunosuppressive drugs (cyclosporine, tacrolimus and pimecrolimus) and anti-inflammatory drugs (steroids and non-steroids), control of secondary infections with antibiotics, and other drugs such as pilocarpine (lacrimomimetic parasympathomimetic drugs) and acetylcysteine (mucolytic).<sup>2,4-8</sup> In veterinary, the treatment more recommended is the use of immunosuppressive lacrimomimetic drugs such as cyclosporine A, tacrolimus and pimecrolimus.<sup>5-9</sup>

Recently in Medicine, some studies with the use of essential fatty acids (EFA), omega-3 ( $\omega$ -3) and omega-6 ( $\omega$ -6), orally, proved to be an alternative therapy for patients of various forms of tear deficiency in patients with Sjögren's syndrome,<sup>10-12</sup> or in patients with KCS. In addition, the topical use of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 proved to be effective in controlling the signs of experimentally induced inflammation in rats to KCS.<sup>14</sup>

The  $\omega$ -3 EFA are found in many foods such as nuts, cold-water fish, soybeans, rapeseed oil and linseed oil.<sup>10,15,16</sup> The Linseed, *Linum usitatissimum*, Lineaceae family, is rich in protein, fiber, minerals, vitamins and lipids, which is composed by 57% of  $\omega$ -3 fatty acids, 16%  $\omega$ -6, 28% monounsaturated fatty acid and only 9% of unsaturated fatty acids<sup>10,17-19</sup>. Studies report the use of linseed in the prevention of coronary heart disease and cancer due to  $\omega$ -3 and phenolic compounds, a phytoestrogen with similar properties to estrogen<sup>15, 16, 20-24</sup>. In humans, it is used as an aid in treating diseases like diabetes, skin problems, premenstrual tension, osteoporosis, and dry eye<sup>16, 17, 21-27</sup>.

The inflammation is characterized by four classic signs: pain, heat, redness and swelling, in addition, there is the presence of another signal, the loss of function.<sup>24</sup> All these signals are triggered by inflammatory mediators such as amines, eicosanoids and cytokines.<sup>19</sup> Eicosanoids are biologically active substances in the regulation of physiological processes, are also lipid mediators of inflammation.<sup>27</sup> Its basis for its formation acids dihomo- $\gamma$ -linoleic acid (DGLA), arachidonic acid (AA) both  $\omega$ -6 series and alpha-linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) of series  $\omega$ -3 (Figure 1).<sup>26-29</sup>

The  $\omega$ -6 EFA derived AA Series 2: prostaglandin (PGE2), thromboxane (TXA2), prostacyclin (PGI2) and 4-series leukotrienes (LTA4, LTB4, LTC4 and LTD4) are considered pro-inflammatory mediators.<sup>28,30</sup> The eicosanoids synthesized from the EFA series of  $\omega$ -6 are concentrated in the cell membrane, blocking the metabolism of AA, making the lipid mediators in non-inflammatory eicosanoids by the action of cyclooxygenase 1 (COX1), prostaglandins of series 1 (PG1) and thromboxane A1 (TXA1).<sup>17,24-27,29</sup> While eicosanoids synthesized from EFA  $\omega$ -3, ALA, DHA and EPA produce inflammatory mediators through the action of COX1 (PGE3 and TXA3) and the action of lipoxigenase (LTA5, LTB5, and LTC5 LTD5) (Figure 1).<sup>10,16,25-27</sup>

The EFA composition of cell membranes depends in large majority of the amount ingested in the diet. Some authors consider the relationship satisfactory dietary  $\omega$ -3 ,  $\omega$ -6 when in 5:1 or even 10:1<sup>16,19,20,31</sup>, others, however, believe that the 1:3 ratio is close to ideal, which is observed in the composition of linseed.<sup>17,26</sup>

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the LO, rich in  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6, oral, topical, oral and topical associated, in the control of clinical, cytological and histopathological changes caused by inflammation in the KCS induced experimentally in the rabbits.

## **MATERIALS AND METHODS**

The experiment was conducted at the Veterinary Hospital and biotherium at the University of Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. It was submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of UNOESTE and was approved with the Protocol n<sup>o</sup> 014/09.

Twenty male New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), approximately from 18 to 22 months and weighing between 3-4 kg. These animals were kept in individual metal cages, with water and food ad libitum.

The model of induction of the KCS in rabbits was based on a previously published study that includes the removal of the lacrimal glands and nictitating associated with the use of atropine sulphate 1% eye drops in a single dose before surgery, and then 3x a day until they confirm the diagnosis of dry eye syndrome (KCS) ( $\leq 5$ mm/min SST and / or RBT positive) and throughout the treatment period (12 weeks) for maintenance of the KCS. The surgery for removal of the lacrimal glands (dacryo-adenectomy) and nictitating membranes were performed in the Surgical Center of the Veterinary Hospital of UNOESTE, by the same surgeon. As premedication received 1mg/kg xylazine 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer) and 6.0 mg/kg of 5% ketamine hydrochloride (Ketalar<sup>®</sup>, Aché) intramuscularly (IM) and inhalational anesthesia



with Halothane (Halothane<sup>®</sup>, Wyeth). In the postoperative period was used in both eyes, 1 drop, BID, topical for 5 days, Epitezam<sup>®</sup> ophthalmic ointment, Chloramphenicol<sup>®</sup> eye drops, and Still<sup>®</sup> eye drops.

The moments of evaluation were considered as M0 (prior to surgery to induce KCS), M1 (1 week after induction of KCS and the beginning of treatment) and M2 to M12 (with interval assessments 1 week after initiation of treatment). Of the 20 rabbits, 15 were induced to the KCS protocol as described above and 5 were allocated to the control group without induction of KCS. A week after the induction of KCS animals were treated for 12 weeks as follows: Group C (n = 5) control (1 drop of placebo - 0.9% NaCl solution) topically BID in both eyes; Group OLO (n = 5) (liquid LO - Laboratory Ophthalmos-SP orally at a dose of 1g/day)<sup>10</sup>, TLO group (n = 5) (LO topic in the form of eye drops - Laboratory Ophthalmos-SP, 1 drop BID in both eyes); OTLO Group 14 (n = 5) (OL liquid, orally at a dose of 1g/day topic associated with the LO in the form of eye drops, 1 drop BID in both eyes).

Schirmer Tear Test (SST) (Figure 2A) was performed to evaluate the amount of tears produced, without anesthetic eye drops, which after cleaning the eye with dry cotton, 0.5 mm from the tip of the Schirmer strip was introduced into the conjunctival sac for a period of 1 minute and then removed and the amount of tears measured and considered positive for KCS values  $\leq 5$ mm/min. The fluorescein test (FT) (Figure 2B) was performed to observe the presence or absence of ulcers colored with fluorescein tape 1%, touching it into the conjunctival sac, and used the score: (1) negative for corneal ulcer and (2) positive corneal ulcer. The Rose Bengal Test (RBT) (Figure 2C) was performed to stained cells devitalized by KCS, where after instillation of anesthetic eye drops, we used 1 drop of Rose Bengal drops 0.5%, considering: (1) absence of stained cells devitalized by KCS and (2) presence of stained cells devitalized by KCS. After the use of colorants eye drops, the eyes were washed with saline solution to remove it, because they can cause eye irritation.<sup>4,33,34</sup>

The eye impression cytology (IC) was held once a month (M4, M8, M12). The animals received anesthetic eye drops and then the material was collected from the eye surface of both eyes using Millipore filter paper HAWP04700. The filter paper was cut manually with approximate dimensions of 5 mm wide by 7 mm high. We analyzed samples of upper and lower conjunctiva. After 5 seconds the pressure filter paper was removed and subsequently fixed by using solution of ethyl alcohol 70% glacial acid and formaldehyde at 37% in the proportion of 20:1:1 in a test tube for 4 days and submitted to stained techniques with periodic acid-Schiff (PAS), hematoxylin and modified Papanicolaou test<sup>35-38</sup>. The parameters were observed at CI: cellularity, nuclear-cytoplasmic ratio, nucleus alteration, change in core junctions (cohesion), number of calciform cells, presence of mucin and inflammation.

For histopathological analysis, at the end of the experiment (M12), the eyeball was placed after enucleation in a solution of 10% formaldehyde from 24 to 48 hours. They were then stored in 70% alcohol and processed according to the technique for inclusion in paraffin, and obtained 5µm thick cuts of the cornea and conjunctiva, which were colored with hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schieffer (PAS )<sup>39</sup>. The parameters observed for conjunctival and corneal were: edema, cell degeneration, necrosis, neutrophils, mononuclear cells and mixed; and conjunctival calciform cell count was performed with a 40x objective on a perimeter of 800 µM using an analyzer images with the software Micrometrics ® (SE Premium).

For STT variables and density of calciform cells, we used the variance analysis test for paired samples contrasts with the Tukey method. For the variables TF, TRB, impression cytology and histopathology were used nonparametric Friedman for comparison of moments<sup>40</sup>, and Kruskal-Wallis with Dunn's method contrasts to compare groups<sup>41</sup>. The statistical analysis was performed using the software Biostat ®. We adopted the significance level of  $P < 0.05$ .

## RESULTS

In this experiment, with the protocol used, the induction time of the KCS in rabbits was in average 7 to 10 days. Group C (control) parameters remained normal during the experimental period in all tests.

### 1. Schirmer Tear Test (STT)

The results of the STT are described in Figure 3. Since the first day after the induction of KCS until the end of the experiment (M12) the results of the TLS of the animals in the treatment groups (OLO, TLO and OTLO) showed significant differences when compared to the control group (C).

From the M1, the Groups OLO, TLO and OTLO already had positive results for KCS,  $4,9\pm 0,1$ ;  $4,8\pm 0,3$  e  $4,5\pm 0,4$  respectively. These results do not differ statistically, but statistics showed a reduction when compared with Group C. In contrast to Group C OLO group presented significantly larger values in the moments M4 and M5, M7 and M8, and then in the M10 to M12. Only the TLO group presented significantly larger values from the M2 to the M12. In Group OTLO, the values were significantly higher only in the moments M2, M3 and M10.

### 2. Fluorescein Test (FT)

The results of the TF are shown in Figure 4. In the M0 all animals were negative for TF. From the M1 to the M4 the test was positive in all groups that were induced to KCS and treated with different presentations of OL (OLO, TLO and OTLO). Only one rabbit (No. 4 OTLO group) had a melting ulcer (Figure 5).

Since the M5 the only treatment group that was negative for TF was the TLO group, the same happened with the OLO group in the M7, and the group OTLO only in the M8.

### **3. Rose Bengal Test (RBT)**

The results of the RBT are described in Figure 6. In the M0 in both groups there were negative results for RBT. From the M1 to the M7 all treatment groups were positive for the RBT. In the M9 OLO and TLO groups were negative, and this only occurred with the group at the end of the experiment OTLO in the M12.

### **4. Impression cytology (IC)**

The results of the IC are described in Table 1. On the cellularity parameter, it was observed values within the median in the M4 and M8, and in the M12 this value was below the median.

The parameter nucleus/cytoplasm, in the M4 and M12, in Groups OLO, TLO and OTLO maintained a ratio of 1:3, only the Group OLO, in the M8 it was observed a change of behavior where the ratio was 1:4, while Groups TLO and OTLO at this time showed no changes. The parameter changes in the core in the three moments M4, M8 and M12, did not change when compared to the Group C. In the evaluation of cohesion, it can be observed that this appears absent in Group OTLO in the M4 and in the Groups OLO and OTLO in the M8.

The caliciform cells showed to be absent in all treated groups and at all times, being different from Group C. In this way with the absence of caliciform cells also noted the absence of its product, the mucus, in all treated groups in the three moments studied.

The inflammatory infiltration was observed in Groups OLO, TLO and OTLO in the M4 and M8. In Group OLO in the M4 it was observed a significant increase (presence from 20 to 40 cells per field) (Figure 7), while in Groups TLO and OTLO the number of inflammatory cells was less than or equal to 20 per field. This significant increase in inflammatory cells was also observed in the group OTLO M8. In the M12 it was found the absence of infiltration of inflammatory cells in all experimental groups.

## 5. Histopathology of cornea and conjunctiva

The results of the histopathology of the cornea and conjunctiva are described in Table 2. In Group C, no changes were observed (Figure 8A). On histopathology of the cornea there was a slight edema in groups OLO (Figure 8B) compared with the TLO group that presented a moderate edema (Figure 8C and 8D and Figure 9). The presence of degeneration was only observed in the group TLO and was considered between slight to moderate.

The median values of necrosis and the presence of inflammation (neutrophils, mononuclear cells and mixed process), were absent in all experimental groups. In the TLO group it was observed the presence of an inflammatory infiltrate with exocytosis of neutrophils (Figure 9B and 10C).

In the histopathological results of the conjunctiva, the OLO (Figure 8B) and OTLO (Figure 10) groups had mild to moderate edema, respectively, while Group TLO had a severe edema. The cell degeneration did not change in behavior when compared to the previous parameter.

In item necrosis the group OLO and the group OTLO (Figure 10) showed mild presence when compared to the TLO group that showed moderate necrosis. There was a slight increase in calciform cells in the TLO group when compared to the other groups.

The inflammatory cells in groups OLO and TLO occurred in a mild way. In Group OTLO (Figure 10A and 10B) it was observed moderate presence of mononuclear cells.

## DISCUSSION

Studies have shown various forms of treatment of KCS among them it can be observed the increasing application of EFA  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 supplementation in both oral and topically<sup>10-14</sup>. The linseed oil, as a source of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6, and  $\omega$ -3:  $\omega$ -6 ratio of 3:1 is considered ideal, it has been studied in this regard<sup>16, 17,19,20,27</sup>. The eicosanoids synthesized from acids derived from  $\omega$ -3 EPA and DHA, and those produced by EFA  $\omega$ -6 series compete with arachidonic

acid (AA) by the enzyme pathways cyclooxygenase and lipoxygenase, thereby inhibiting the formation of pro-inflammatory eicosanoids and increasing the formation of anti-inflammatory mediators<sup>10,17,24-27,29</sup>.

The group treated with oral LO (OLO Group) had a normal state in tear production in the second week after starting treatment and a significant increase above the control group at 3 weeks of the experiment. This is consistent with several studies in human patients, especially Sjögren syndrome, where oral supplementation of  $\omega$ -3 has been recommended for controlling symptoms of KCS<sup>10-13</sup>. However, the combined use of oral and topical LO showed no additive benefit, and by the end of the experiment, the performance in the STT, the FT and the RBT was below the groups using the LO only via topical or orally. It is interesting to note the positive evolution of rabbit No. 4 from OTLO group.

In this study, topically was more effective for early treatment of KCS in increased production of tears and even the resolution of the corneal ulcer. The lipid mediators play an important role in the resolution and repair of injuries caused to the cornea<sup>27</sup>. These results are consistent with a study which used a topical formulation containing  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6, alpha-linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA) in rats experimentally induced to KCS, which showed improvement of the symptoms of inflammatory KCS<sup>14</sup>, and another study<sup>25</sup> reports that topical application of lipids derived from  $\omega$ -3, DHA and prevent complications of KCS as erosion and ulcers of the cornea.

The results obtained for the IC did not show many significant differences between treatment groups, only in M4 the presence of an major inflammation detected in the OLO group, and in the M8 the nuclear-cytoplasmic 1:4 different from the observed in the other treatment groups which was 1:3, the TLO group was the one who presented this cohesion, and greater inflammation in the group OTLO. The study of calciform cells by IC showed an

unreliable method, since all treatment groups had null values, perhaps for the difficulty of the technique used, impression cytology, in obtaining these cells by the technique.

It was not found in the literature studies about the use of LO in the histopathological evaluation of the cornea and conjunctiva. In this study the histopathological data obtained from the cornea after the treatment with LO showed that the OLO group presented the best results, followed by Group OTLO compared with the TLO group. Regarding the histopathological data of the conjunctiva it was observed favorable results to treatment with a slight increase in the number of caliciform cells in the TLO group. Although this finding was not statistically significant, it is important to emphasize its clinical importance, because studies have reported that the decrease in caliciform cells is directly correlated to the presence of dry eyes, where there may be a decreased production of mucin by altering the composition of pre-corneal tear film (PTF)<sup>2, 11</sup>.

They are considered as possible mechanisms of action of the LO as anti-inflammatory, with proven inhibitory response of the inflammatory cascade of arachidonic acid and possibly due to this action an improvement in the activity of caliciform cells and a consequent increase in the production of mucin, which provides an improvement in PTF quality leading to reduced tear evaporation in the aqueous portion.<sup>10, 11</sup>

It was observed in this study that the LO did not induce any side effects. In addition, the concomitant use of LO orally and topically has not brought benefits to its use by only one of these pathways. More pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the LO in ocular topical formulation should be conducted to clarify these results.

Thus, with the results analyzed, we conclude that the LO, both orally and topically, was effective in the treatment of KCS experimentally induced in rabbits and can be a natural adjunct in the treatment of this disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The Post Graduate Program in Animal Science of UNOESTE for financial support and Laboratory Ophthalmos - SP for the donation of some materials necessary for the execution of the experiment.

## REFERENCES

1. Herrera D. Oftalmologia clínica em animais de companhia. São Paulo: Medvet Livros, 2008. p. 117 – 122.
2. Miller PE. Lacrimal system. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri, R. Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 4 ed. St Louis:Elsevier, 2008. p. 157-174.
3. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucin (Review). Veterinary Ophthalmology 2004;7(2):71-77.
4. Andrade SF. Terapêutica Oftálmica. In: Andrade S.F. Manual de terapêutica veterinária. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008.p. 179-189.
5. Berdoulay YA, English RV, Naldelstein B. Effect of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspension on tear productin in dog with Keratoconjunctivitis Sicca. Veterinary Ophthalmology 2005;8(4): 225-232.
6. Izci C, Celik I, Alkan F et al. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. American Journal Veterinary Research 2002;63(5):688-694.
7. Nell B, Walde I, Billich A et al. he effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from na exploratory study. Veterinary Ophthalmology 2005;8(1):39-46.

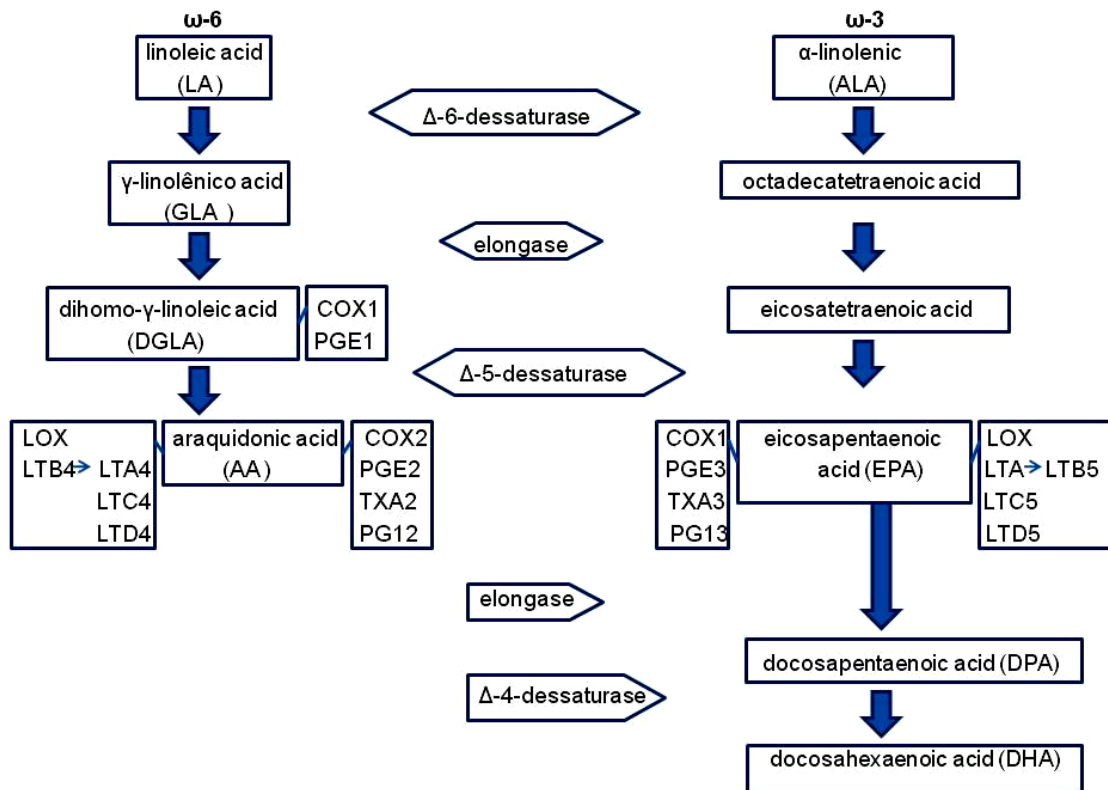


8. Ofri R, Lambrou GN, Allgoewer I. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. *Veterinary Journal* 2009;179(1):70-7.
9. Tang-Liu DDS, Acheampong A. Ocular Pharmacokinetics and Safety of Ciclosporin, a Novel Topical Treatment for Dry Eye. *Clinical Pharmacokinet* 2005;44(3): 247-261.
10. Pinheiro Júnior MN, Santos PM, Santos RCR, Barros JN, Passos L.F. e Cardoso Neto J. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjögren. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2007;70(4):649-655.
11. Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010;33(2):49-54.
12. Sullivan B, Cermak J, Sullivan R, Papas A, Evans J, Dana M, et al. Correlation between nutrient intake and the polar lipid profiles of meibomian gland secretions in women with Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:441-7.
13. Wojtowicz JC, Butovich I, Uchiyama E. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea* 2011;30(3):308-314.
14. Rashid, S., Jin, Y., Ecoiffer, T. et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Archives of Ophthalmology* 126(2):210-225, 2008.
15. Covington MB. Omega-3 fatty acids. *American Family Physician* 2004;70(1):133-140.
16. Martins MB, Suaiden AS, Piotto RF et al. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Ômega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. *Revista Institucional das Ciências da Saúde* 2008; 26(2):153-156.
17. Oomah BD. Flaxseed as functional source. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2001;81: 889-894.

18. Hassan-Zadeh A et al. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2008;59(6):526-534.
19. Almeida KCL, Boaventura GT, Guzman-Silva MA. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico na formação da bainha mielina. *Revista de Nutrição de Nutrição, Campinas* 2009;22(5):747.
20. Lamarão RC, Navarro F. Aspectos nutricionais e protetores das doenças cardiovasculares. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, São Paulo* 2007;4 (1):57-70.
21. Thompson LU, Seidl MM, Rickard SE, Orcheson LJ, Fong H. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr câncer* 26:159-165. 1996a.
22. Thompson LU, Rickard SE, Seidl MM. Flaxseed and its lignin and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1996b; 17:1373-1376.
23. Thompson LU. Flaxseed, lignans, n-3 fatty acids, and drug synergy in the prevention and treatment of cancer. In: ThompsonLU, Ward WE. *Food drug synergy and safety*. Ontario, Canada: Lilian U Thompson, 2006. p. 147-73
24. Carciofi AC, Bazolli RS, Prada F. Ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na alimentação de cães e gatos. *Revista Educação Continuada CRM-S, São Paulo* 2002;5(3): 268.
25. Jiucheng H, Bazan HEP. Omega-3 fatty acids in dry eye and corneal nerve regeneration after refractive surgery. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essentials Fatty Acids* 2010;82(4-6):319-325.
26. Kelly DS, Nelson GJ, Love JE et al. Dietary alpha-linolenic acid alters tissue fatty acid composition, but not blood lipids, lipoproteins or coagulation status in human. *Lipids* 1993;28:533-537.

27. Kenchegowda S, Bazan HEP. Significance of lipid mediators in corneal injury and repair. *Journal of Lipidic Research* 2010;51:879-891.
28. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum Nutr.* 2003;56:67–70.
29. Barabino S, Rolando M, Camicione P, et al. Systemic linoleic and g-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea* 2003;22:97-101.
30. Aragona P, Bucolo C, Spinella R et al. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE1 tear content in Sjögren's syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4474–4479.
31. Almeida, KCL. A incorporação de ácidos graxos ômega-3, oriundos da semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), influenciando o desenvolvimento cerebral de ratos filhotes. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Investigativa) – Universidade Federal Fluminense, Niteroi.
32. Gomes JAP, Cavalho FV, Barros OS et al. Modelo Experimental de olho seco em coelho. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 1994;57(4) p. 264-269.
33. Holmberg BJ. Ophthalmology of exotic pets. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. Slater's *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4. ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 427-441.
34. Maggs DJ. Basic diagnostic techniques. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. Slater's *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4 ed. St Louis:Elsevier, 2008. p. 81- 106.
35. Bounous DI et al. Conjunctival Impression Cytology from Dogs with Topical Cyclosporine. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:997-1000.
36. Camargo GB et al. Citologia de impressão na ceratoconjuntivite primaveril. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2004;67(6).

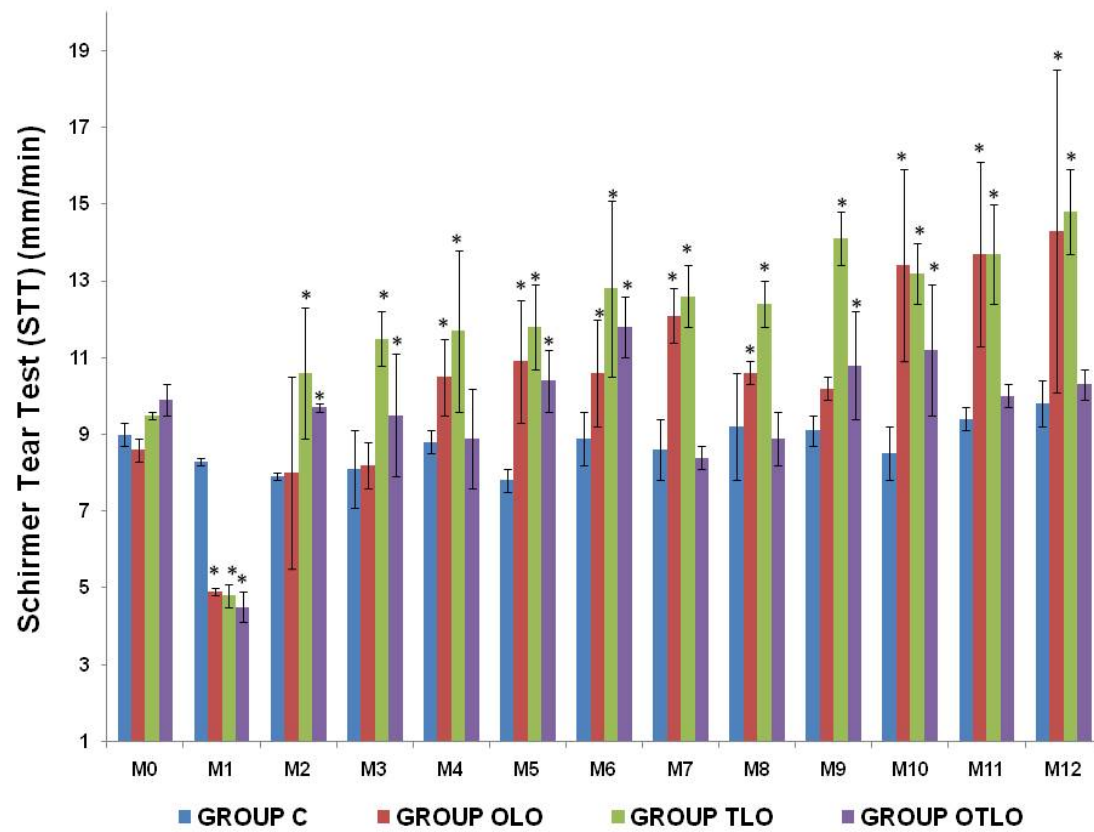
37. Barros JN, Mascaro VLDM, Gomes JAP, Freitas S D. e Lima ALH. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2001;64(2).
38. Godoy-Esteves CAL, Barros JN, Cunha LS, Mascaro VLD, Höfling-Lima AL, Barros PSM. Padronização da citologia de impressão da superfície ocular canina. *Archives of Veterinary Science* 2005;10 (1):109-115.
39. Tolosa EMC, Rodrigues, CJ, Behmer, AO et al. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. p.34.
40. Morrison DF. *Multivariate statical methods*, 3. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1990. 495p.
41. Siegel S. *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1975. 350p.



**Figure 1.** Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids (PUFA).

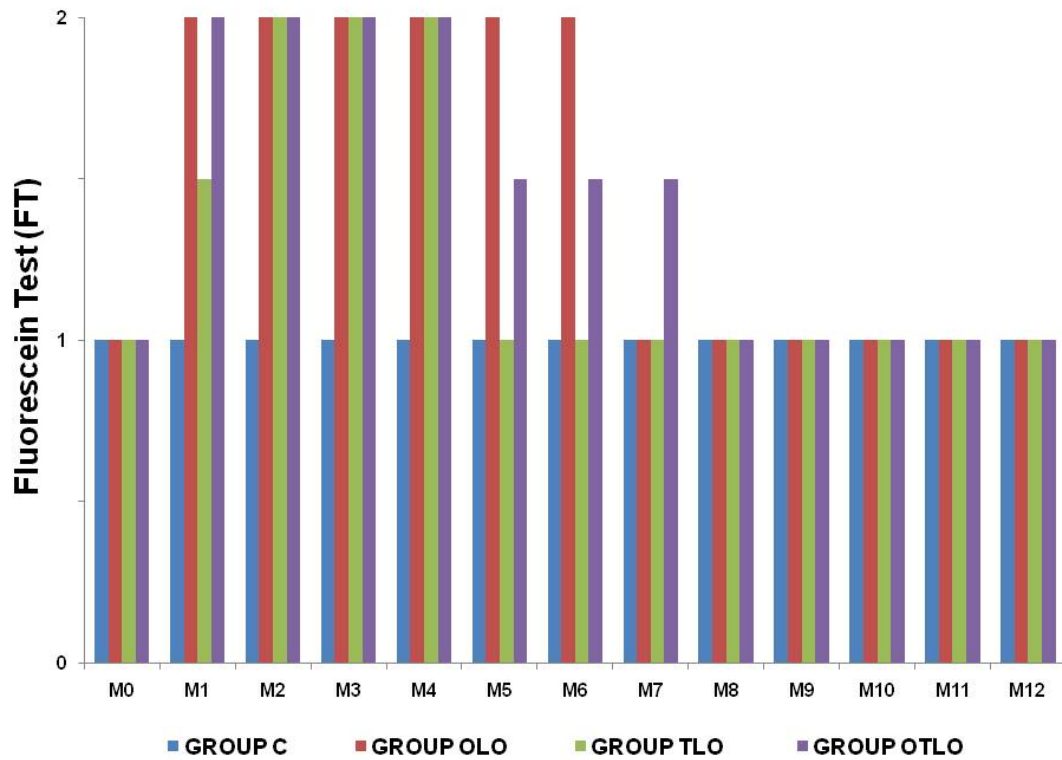


**Figure 2.** (A) STT in the right eye (OD) from rabbit No.2 OLO group (oral LO) in the M1 showing value  $> 5\text{mm/min}$ . (B) TF in the left eye (OS) from rabbit No.1 from group TLO (topic LO) in the M4 colored positive for the corneal ulcer. (C) RBT (OD) from rabbit No. 1 from group OTLO (oral + topically LO) in the M4 colored positive for devitalized cells.



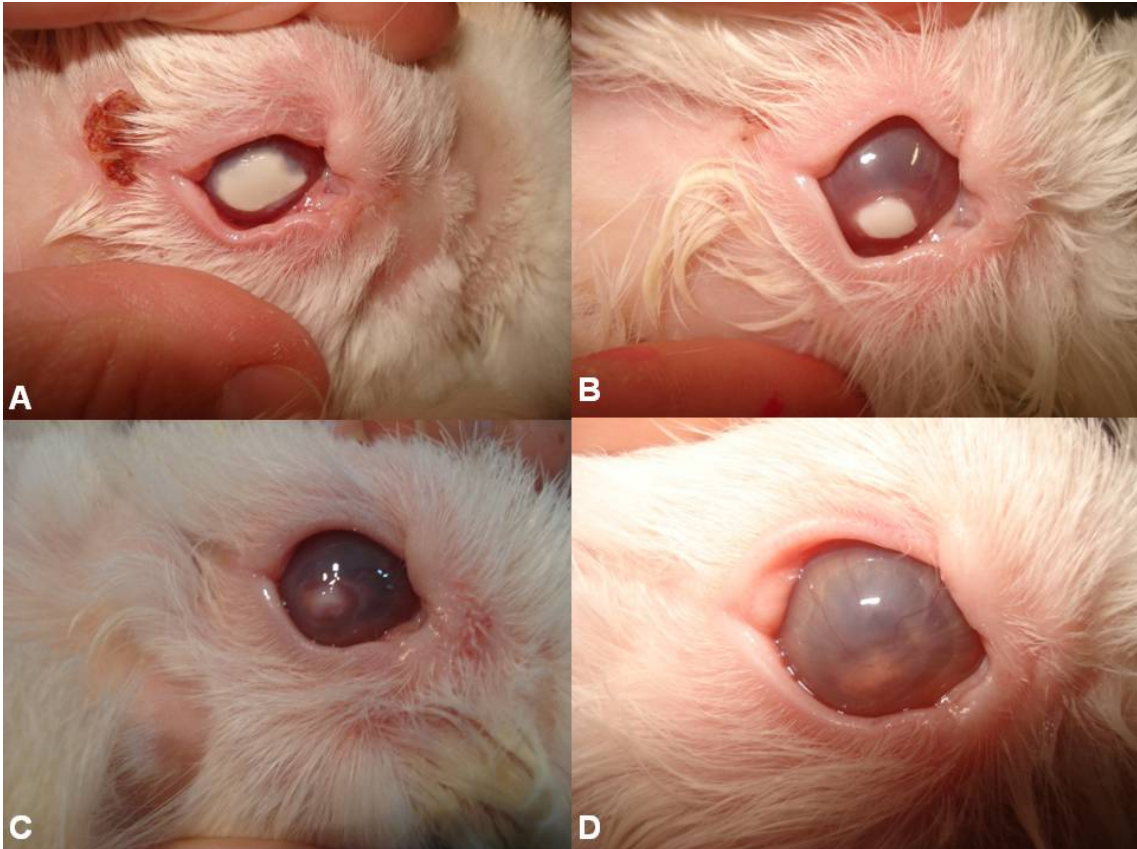
**Figure 3.** Mean  $\pm$  SD from Schirmer Tear Test (STT) values in mm/min in rabbits experimentally induced to keratoconjunctivitis sicca (KCS) and submitted to various types of treatment\*\* with linseed oil at various moments (M).

\* $P < 0.05$  (Tukey's test). \*\*Group C (control), Group OLO (OL oral), Group OLT (OL topically) and Group OLOT (OL oral+topically).



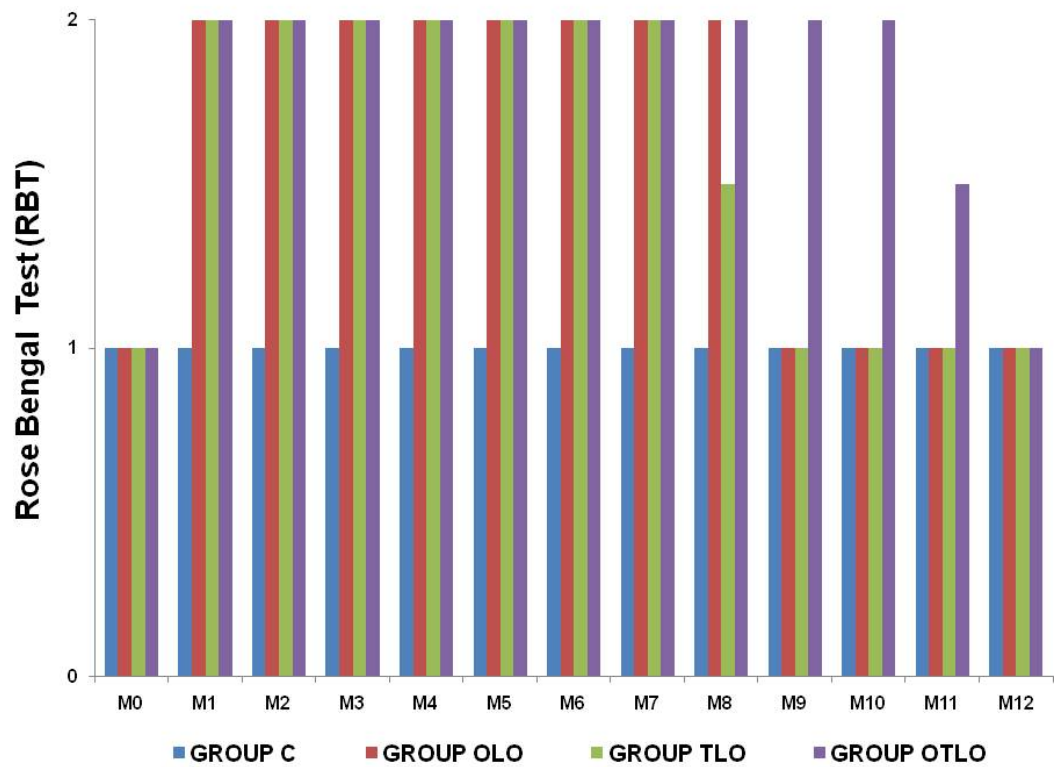
**Figure 4.** Median values of the fluorescein test (FT)\* in rabbits experimentally induced for keratoconjunctivitis sicca (KCS) and submitted to various types of treatment\*\* with linseed oil at various times (M).

\*(1) negative - absence of corneal ulcers and (2) positive - presence of corneal ulcers. \*\*Group C (control), Group OLO (OL oral), Group OLT (OL topically) and Group OLOT (OL oral+topically)



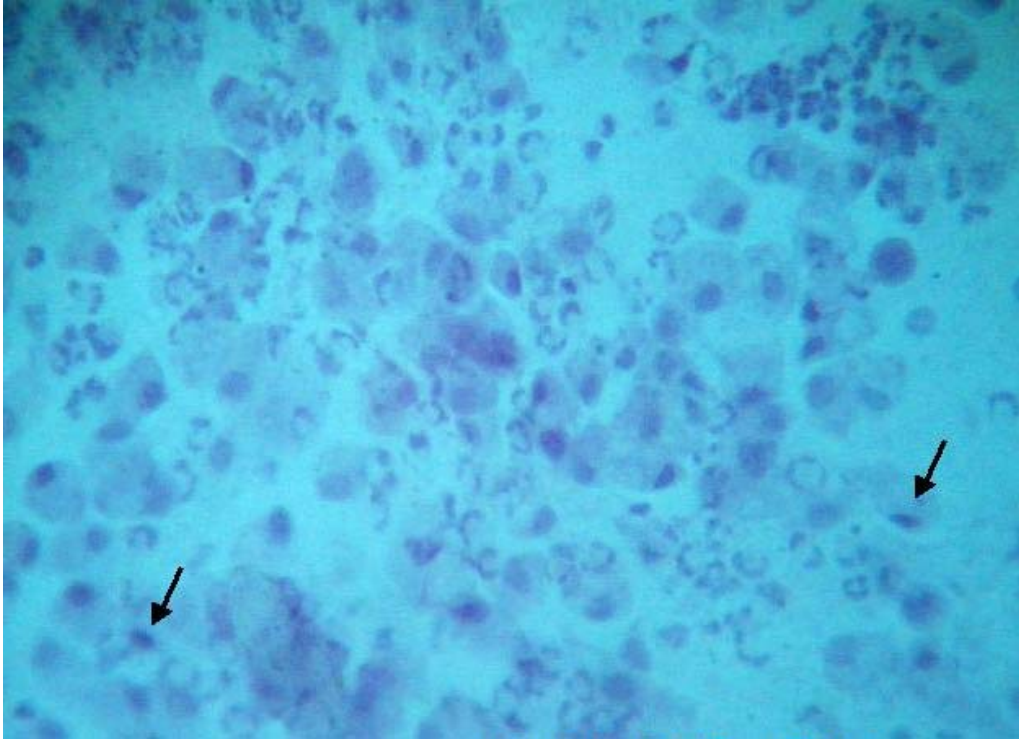
**Figure 5.** Evolution of corneal ulcer in the right eye of rabbit No Group 4 OTLO (oral and topical LO). (A) extensive melting ulcer in M1. (B) median melting ulcer in the lower plane of the cornea with keratitis and neovascularization in M3. (C) small melting ulcer in lower plane of the corneal keratitis and neovascularization in M6. (D) resolution of the ulcer with keratitis and neovascularization in M9.



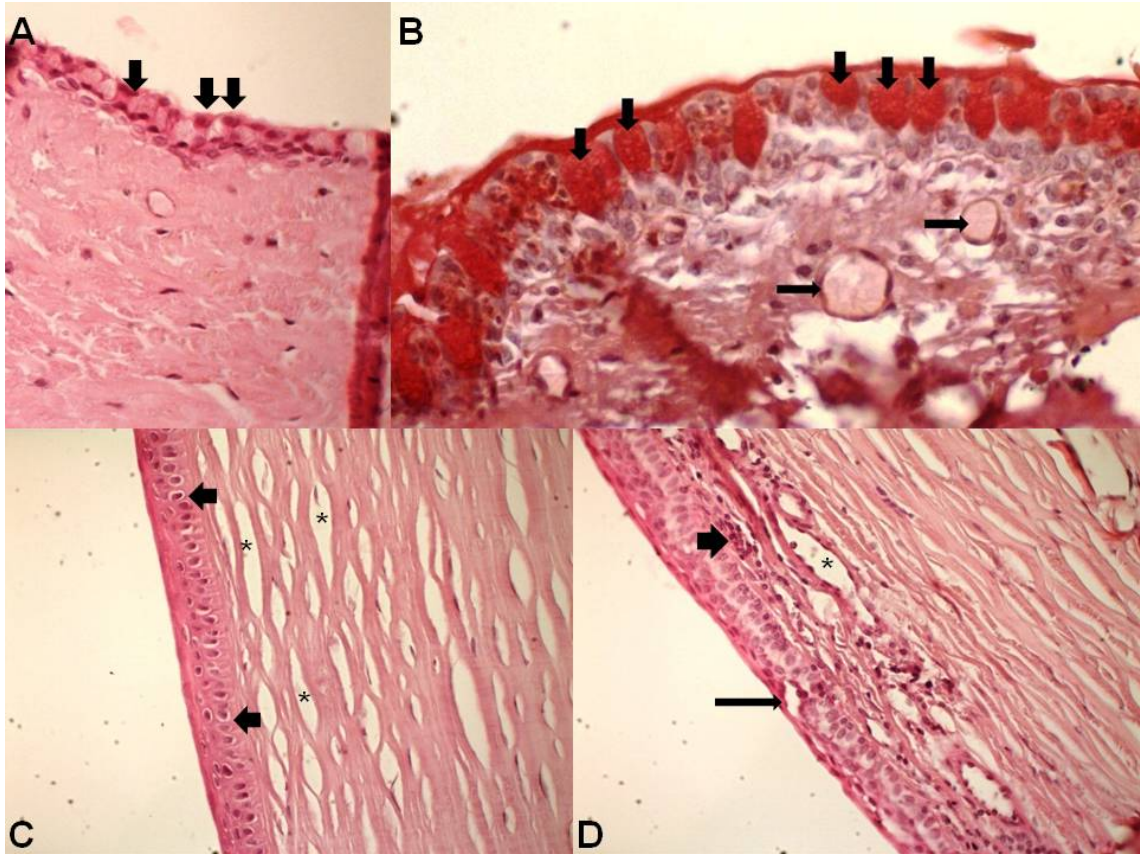


**Figure 6.** Medians values from the Rose Bengal Test (RBT)\* in rabbits experimentally induced for keratoconjunctivitis sicca (KCS) and submitted to several types of treatment \*\* with linseed oil in different moments (M).

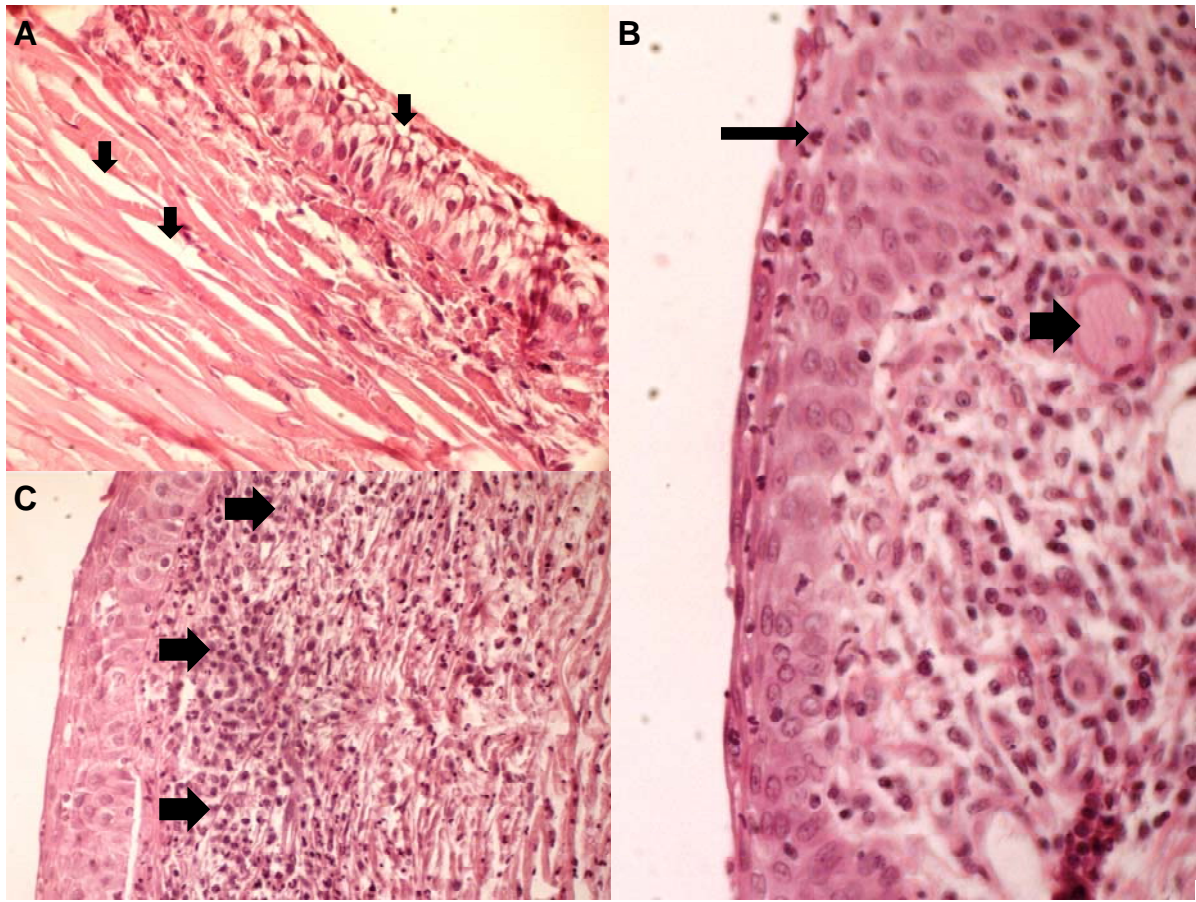
\*(1) absence of stained cells devitalized by KCS and (2) presence of stained cells devitalized by KCS.\*\* Group C (control), Group OLO (oral OL), Group OLT (OL topical); Group OLOT (OL oral + topical)



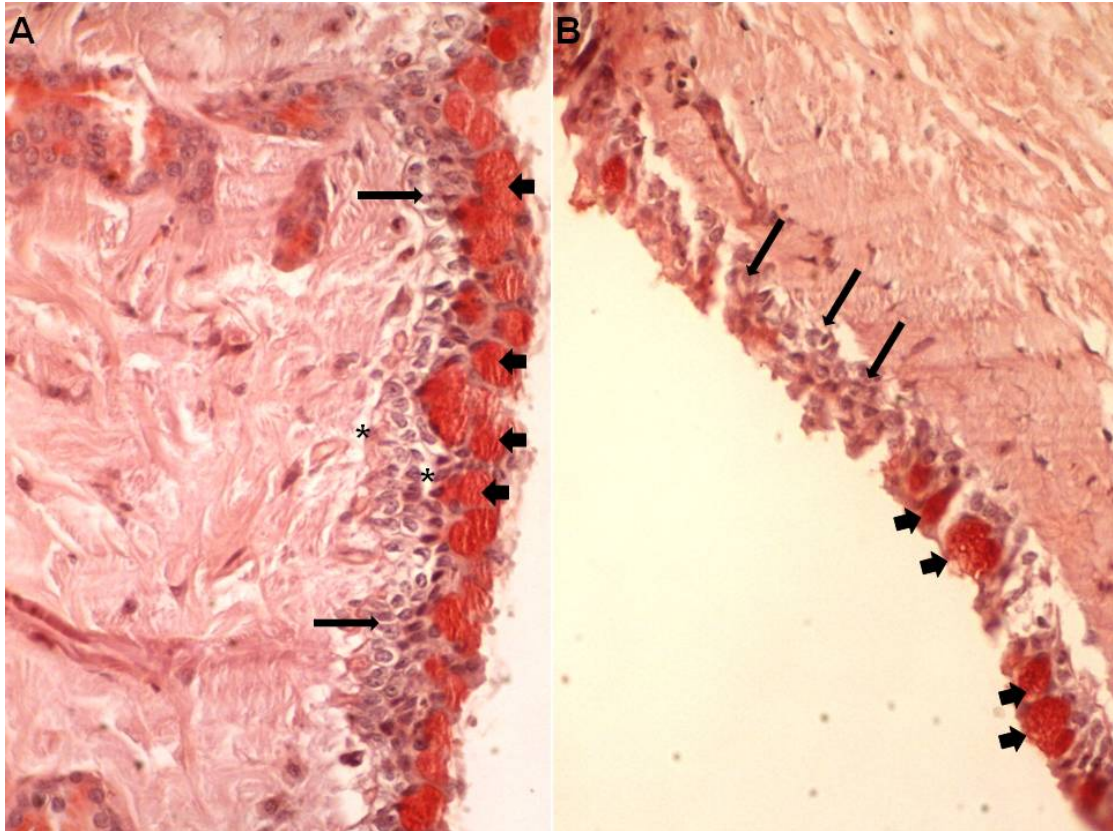
**Figure 7.** Corneal impression cytology. Presence of polymorphonuclear cells (> 25 cells per field) between the cells of the corneal epithelium. There is a lack of intercellular cohesion, the nuclear cytoplasm ratio of 1:3 with a few pyknotic nuclear (arrows). Stained with periodic acid-Schiff (PAS), hematoxylin and modified Papanicolaou test, 100X magnification.



**Figure 8.** Photomicrograph of cornea and conjunctiva. (A) Left eye of rabbit No. 1 Group C without conjunctival inflammation, caliciform cells were seen in a mass (arrows) PAS (100x). (B) Right eye of rabbit No 5 OLO group with presence of caliciform cells (large arrows) and subconjunctival edema (thin arrows) PAS (100x). (C) Left eye of rabbit No 1 OLT group with mild edema of the epithelium (arrows) and corneal stroma (\*) HE (100x). (D) Right eye of rabbit No1 OLT group corneal epithelium showing moderate edema (thin arrow), subcorneal area showing moderate inflammatory infiltration with massive presence of lymphocytes (large arrow) and stroma in the presence of blood vessel (\*) HE (100x).



**Figure 9.** Photomicrograph of the cornea left eye from rabbit No. 5 OLT group. (A) There is severe edema in the corneal and subcorneal epithelium and moderate edema stroma (large arrows) HE (400x). (B) Exocytosis of neutrophils in the corneal epithelium with the presence of neutrophils (arrows), congestion of blood vessel in the stroma (large arrow) HE (400x). (C) Corneal epithelium showing exocytosis of neutrophils (arrow) and stroma showing intense edema HE (400x).



**Figure 10.** Photomicrograph of the conjunctiva of the rabbit no.2 (A) and No 4 (B) group OLOT. (A) Right eye presence of caliciform cells (large arrows), mild inflammatory infiltration (thin arrows) and subconjunctival edema (\*) SAP (400x). (B) Left eye presence of caliciform cells (large arrows) and lymphocytic inflammatory infiltration with conjunctival necrosis (thin arrows) PAS (100x).

Table 1. Medians and percentiles (P25, P75) values obtained from impression cytology (CI) of the conjunctiva in rabbits experimentally induced to keratoconjunctivitis sicca (KCS) and submitted to various types of treatment with linseed oil (OL) in 4th (M4), 8th (M8) and 12th (M12) weeks of the experiment.

Moment	Group*	Parameters						
		Cellularity <sup>1</sup>	Nuclear/ Cytoplasm ratio <sup>2</sup>	Nucleus alteration <sup>3</sup>	Cohesion <sup>4</sup>	Caliciform Cells <sup>5</sup>	Mucus <sup>6</sup>	Inflammation <sup>7</sup>
M4	C	3 (1;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLO	2 (2;2) <sup>Ba</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;1) <sup>Aa</sup>	2 (0;2) <sup>Ba</sup>
	TLO	2 (1;3) <sup>Ba</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Ca</sup>
	OTLO	2 (2;3) <sup>Ba</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;2) <sup>Ca</sup>
M8	C	3 (2;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;2) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLO	2 (2;3) <sup>Ba</sup>	4 (3;5) <sup>Cc</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Bb</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Cb</sup>
	TLO	2 (1;2) <sup>Ba</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Ca</sup>
	OTLO	2 (1;2) <sup>Ba</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;1) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	2 (0;2) <sup>Bb</sup>
M12	C	3 (1;3) <sup>Aa</sup>	1 (1;2) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OLO	1 (1;3) <sup>Cb</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	TLO	1 (1;2) <sup>Cb</sup>	3 (2;4) <sup>Ba</sup>	1 (1;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;1) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>
	OTLO	1 (1;2) <sup>Cb</sup>	3 (2;5) <sup>Ba</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	1 (0;1) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Ba</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>	0 (0;0) <sup>Aa</sup>

\* Group C (control), Group OLO (oral OL), Group TLO (OL topic); Group OTLO (OL oral + topical)

WBC 1: (1) 25% of the filter, (2) 50% of the filter, (3) 75% of the filter

<sup>2</sup> nucleus/cytoplasm ratio: (a) 1:1, (2) 1:2, (3) 1, 3, (4) 1:4, (5) 1:5

<sup>3</sup> nucleus alteration: (0) karyolysis or pyknosis; (1) no change

<sup>4</sup> Cohesion (0) absent; (1) present

<sup>5</sup> caliciform cells: absent (0), (a) present

<sup>6</sup> Mucus: (0) absent; (1) present

<sup>7</sup> Inflammation (presence of polymorphonuclear cells): (0) absent; (1) ≤ 10 cells per field (2) up to 25 cells per field (3) > 25 cells per field (40X magnification)

Capital letters compare groups at each time (Kruskal-Wallis)

Lowercase letters compare times within each group (Friedman test)

Different letters indicate statistically significant difference (P <0.05)

Table 2. Medians and percentiles (P25, P75) of the values obtained from the histopathology of the cornea and conjunctiva in rabbits experimentally induced keratoconjunctivitis sicca (KCS) and submitted to various types of treatment with linseed oil (OL in the 12th week of the experiment (M12).

Cornea							
Moment	Group	Parameters <sup>1</sup>					
		Edema	Degeneration	Necrosis	Inflammation <sup>2</sup>		
					Neutrophil	Mononuclears	Mixed
M12	C	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OLO	1 (0;1) <sup>B</sup>	0 (0;2) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	TLO	2 (0;3) <sup>C</sup>	1,5 (0;2) <sup>B</sup>	0 (0;2) <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>
	OTLO	1 (1;2) <sup>B</sup>	0 (1;2) <sup>A</sup>	0 (0;1) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;1) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>

Conjunctiva								
Moment	Group	Parameters*						
		Edema	Degeneration	Necrosis	Caliciform Cells <sup>3</sup>	Inflammation		
						Neutrophil	Mono-nuclears	Mixed
M12	C	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	9.8±1,9 <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OLO	2 (2;2) <sup>C</sup>	2 (2;2) <sup>C</sup>	0.5 (0;1) <sup>A</sup>	9.5±2,3 <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	0 (0;1) <sup>A</sup>	0.5 (0;2) <sup>A</sup>
	TLO	3 (2;3) <sup>D</sup>	3 (2;3) <sup>D</sup>	2.5(1;3) <sup>D</sup>	10.7±2,7 <sup>A</sup>	0 (0;3) <sup>A</sup>	2 (1;3) <sup>C</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>
	OTLO	1 (1;2) <sup>B</sup>	1 (1;1;) <sup>B</sup>	1 (0;1) <sup>B</sup>	9.0±3,8 <sup>A</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>	1 (0;2) <sup>B</sup>	0 (0;0) <sup>A</sup>

\* Group C (control), Group OLO (oral OL), Group TLO (OL topic); Group OTLO (OL oral + topical)

<sup>1</sup> (0) absent, (1) mild, (2) moderate, (3) sharp

<sup>2</sup> (0) absent; (1) ≤ 10 cells per field (2) up to 25 cells per field (3) > 25 cells per field (40X magnification)

<sup>3</sup>800µm

Capital letters compare groups at each time (Kruskal-Wallis)

Different letters indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ )

**ANEXO**



# Veterinary Ophthalmology

Published on behalf of

**Edited by:**

David A. Wilkie

**Print ISSN:** 1463-5216

**Online ISSN:** 1463-5224

**Frequency:** Bi-monthly

**Current Volume:** 13 / 2010

**ISI Journal Citation Reports® Ranking:** 2008: 26/134 Veterinary Sciences

**Impact Factor:** 1.559

## TopAuthor Guidelines

*Veterinary Ophthalmology* publishes original material relating to all aspects of clinical and investigational veterinary and comparative ophthalmology. The following types of material will be published:

- Original articles including clinical (prospective and retrospective clinical studies) and investigational studies. Research studies involving animals must have the approval of the institution's animal care and use committee and be acceptable to the Editor.
- Review articles (including papers which clarify, summarize and critically evaluate the current literature). These will be invited by the Editor or a member of the editorial board.
- Case reports (patient-based studies; either single or multiple animals).
- Viewpoint articles (papers which challenge existing concepts or present an alternative interpretation of available information) are usually invited by the Editor or a member of the editorial board.
- Short communications: Brief research and clinical communications (limited to 6 pages and 12 references).
- Letters to the editor.

All original research and review articles will be peer reviewed by at least two independent referees. Submission

Beginning January 1, 2007, *Veterinary Ophthalmology* accepts manuscripts only through our submission website. To submit a manuscript, please follow the instructions below:

### Getting Started

1. Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the *Veterinary Ophthalmology* ScholarOne Manuscripts homepage <http://mc.manuscriptcentral.com/vop>
2. Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user of ScholarOne Manuscripts.
3. If you are creating a new account:
  - After clicking on 'Create Account' enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as prompted then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID) and then select your area of expertise.
  - Click 'Finish' when done.
4. Log-in and select 'Author Center.'

### Submitting Your Manuscript

1. After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link on the Author Center screen.
2. Enter data and answer questions as prompted.
3. Click on the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
4. You will be prompted to upload your files:
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Select the description of the file in the drop down next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload' button.
5. Review your submission (in both PDF and HTML formats) before sending to the Editors. Click the 'Submit' button when you are done reviewing.

You may stop a submission at any phase and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation via e-mail. You can also log-on to ScholarOne Manuscripts at any time to check the status of your manuscript. The Editors will send you information via e-mail once a decision has been made. A covering letter, signed by all authors, must be included. This should state that the work has not been published and is not being considered for publication

elsewhere, and that all authors meet the journal's criteria for authorship (see below). Information on any financial or other conflict of interest which may have biased the work should be provided (even if precautions were taken and authors are satisfied that bias was avoided).

On acceptance, papers become the copyright of the Journal and all accepted papers must be accompanied by a copyright assignment form.

Authors will be required to assign copyright in their paper to the Journal Title. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. To assist authors an appropriate copyright assignment form will be supplied by the editorial office. (Government employees in both the US and the UK need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned.) The form can be found [here](#).

### Manuscript Style

The manuscripts must be in Microsoft Word format (.doc or .docx). The manuscript (including footnotes, references, figure legends, and tables) must be double-space typed, using 12-point Times New Roman font, 1-inch margins, and left justification. Original Research papers and Review Articles should usually not be longer than 5000 words. Viewpoint articles will not normally exceed 2000 words, and reviews of books and information materials should be less than 1000 words long.

#### Title Page

The title page should include a descriptive title for the article, the names [first name, initials of middle name(s), surnames], qualifications and affiliations of all authors, and the full postal address, fax, e-mail (if available), and telephone number of the author to whom correspondence should be addressed. A suggested running title of not more than 50 characters including spaces should be included.

#### Abstract and Keywords

The abstract should be on a separate page and should not exceed 250 words. Where possible, the abstract should be structured. Suggested headings for abstracts of primary research are: Objective; Animal studied, Procedure(s), Results, and Conclusions.

Key words are used by indexes and electronic search engines, and should appear after the abstract. Use the heading 'Key words', typed in bold and followed by a colon, and then the key words separated by commas. Include up to six key words. Also enter the key words where prompted during the submission process.

#### Main Text

This should begin on a separate page. Sections within the main text should be appropriately sub-headed: Introduction; Materials and methods, Results, and Discussion. Abbreviations and footnotes should be avoided where possible.

#### References

These should be in the Vancouver style. References should be numbered sequentially as they occur in the text and identified in the main text by arabic numbers in brackets after the punctuation. The reference list should be typed on a separate sheet from the main text, and references should be listed numerically. The following are examples of the style. All authors should be listed and journal titles and page ranges should not be abbreviated.

1. Bagley LH, Lavach JD. Comparison of postoperative phacoemulsification results in dogs with and without diabetes mellitus: 153 cases (1991-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; 205: 1165-1169.
2. Barnett KC. *Color Atlas of Veterinary Ophthalmology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1990.
3. Davidson MG. Equine ophthalmology. In: *Veterinary Ophthalmology* 2nd edition (ed. Gelatt KN). Lea and Febiger: Philadelphia, 1991; 576-610
4. Maggs DJ, Nasisse MP. Effects of oral L-lysine supplementation on the ocular shedding rate of feline herpesvirus (FHV-1) in cats (abstract). *28th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists* 1997; 101: 67-78.

Please note that work that has not been accepted for publication and personal communications should not appear in the reference list, but may be referred to in the text (e.g. M. van der Burgh, personal communication). Also, it is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication.

### Electronic Artwork

Figures must be uploaded as separate files and not be embedded in the main text file. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available on the Wiley Homepage at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

The figures should be referred to as 'Fig.' and numbered consecutively in the order in which they are referred to in the text. Captions to figures, giving the appropriate figure number, should be typed on a separate page at the end of the manuscript; captions should not be written on the original drawing or photograph. In the fulltext online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100

characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure. Further guidelines regarding the submission of artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

#### Video Files

The journal will consider up to 2 video files to accompany articles. For video files to be accepted, they must clearly show a dynamic condition that can not be adequately captured in still images. The Editor and/or Associate Editors will scrutinize all video submissions very carefully to assure they meet the intent of providing unique information. Video files of routine imaging findings will not be accepted. Up to 2 video files will be considered for each paper. Video files must be submitted in Quicktime format and each file must be less than 5MB in size. The video files will accompany the online version of the manuscript only; reference to the video file should be made in the print version of the paper.

#### Tables

Clear tables which contain essential data are welcome. Format tables with the table function in a word processor, such as MS Word, on a separate page with the legend typed above. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. All abbreviations must be defined in footnotes to the table. Number tables consecutively in the order they occur in the text, with Arabic numerals.

#### Acknowledgements

Acknowledgements should be brief and must include reference to sources of financial and logistical support. Author(s) should clear the copyright of material they wish to reproduce from other sources and this should be acknowledged.

#### Author Editing Services

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission or during the review process. Authors wishing to pursue a professional English-language editing service should make contact and arrange payment with the editing service of their choice. For more details regarding the recommended services, please refer to [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

#### Peer Review

All articles submitted for consideration as original clinical and investigational papers or review articles will be peer reviewed by at least two independent referees, one of which is an editorial board member, and a statistician, if appropriate. We aim to give authors a decision (rejection, rejection with encouragement to rework and resubmit, or acceptance subject to revision/copy editing) within three months of manuscript submission.

#### Page Proofs and Offprints

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Page proofs must be returned to Wiley Periodicals within 3 days of receipt, by fax if international or convenient, and by express mail: only typographical errors can be corrected at this stage.

Authors will be provided with electronic offprints of their paper. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise. Consequently, please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper. Paper offprints may be purchased using the order form supplied with proofs.

#### Further Information

If you wish to discuss prospective submissions or to clarify the guidance outlined above, please contact Dr. David A Wilkie at the editorial office (Tel: 1-614-292-8664; Fax 1-614-292-7667; email: [wilkie.1@osu.edu](mailto:wilkie.1@osu.edu)).

Further details about the peer review process and arrangements for the final submission of accepted articles and proofs will be sent to authors of accepted manuscripts and are available from the editorial office.