

**COMPARAÇÃO DO USO DO TACROLIMUS 0,03% COLÍRIO DISSOLVIDO EM ÓLEO  
DE AMÊNDOA E DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DE  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTAL EM COELHOS**

**MARCOS ROGERIO SGRIGNOLI**

**COMPARAÇÃO DO USO DO TACROLIMUS 0,03% COLÍRIO DISSOLVIDO EM ÓLEO  
DE AMÊNDOA E DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DE  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTAL EM COELHOS**

**MARCOS ROGERIO SGRIGNOLI**

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

Presidente Prudente – SP

2011

636.392 2  
S523c

Sgrignoli, Marcos Rogerio

Comparação do uso do tacrolimus 0,03% colírio dissolvido em óleo de amêndoa e de semente de linhaça no tratamento de ceratoconjuntivite seca experimental em coelhos / Marcos Rogerio Sgrignoli. – Presidente Prudente, 2011.

63 f.: il.

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

Bibliografia.

Orientadora: Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

1. Tecido conjuntivo – doenças. 2. Ceratoconjuntivite seca. 3. Coelho. 4. Citologia esfoliativa ocular. 5. Histopatológico. 6. Óleo de amêndoa. 7. Óleo de semente de linhaça. 8. Tacrolimus. I. Título.

**MARCOS ROGERIO SGRIGNOLI**

**COMPARAÇÃO DO USO DO TACROLIMUS 0,03% COLÍRIO DISSOLVIDO EM ÓLEO DE AMÊNDOA E DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTAL EM COELHOS**

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

Presidente Prudente, 13 de dezembro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Aline Adriana Bolzan  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da –  
Universidade de São Paulo - USP  
São Paulo - SP

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha noiva Danielle, que nunca mediu esforços e esteve sempre presente em todos os momentos de sua realização e seu apoio auxiliou-me a transpassar barreira que pareciam intransponíveis, e as minhas filhas, Sabrina e Sarah.*

*Ao meu irmão Vlademir Pascoal, pelo carinho, confiança e pelo exemplo de vida, bondade e superação e exemplo de esperança.*

*Aos meus pais, Lídia e Vlademir in memoriam pelos ensinamentos que me transmitiram, quando ainda era apenas uma criança, os quais aplico até os dias de hoje, ensinamentos esses que me guiaram a ser um vencedor.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço e a Deus, pois sem Ele não seria possível a realização deste trabalho, serei eternamente grato a Ele por ter colocado minha noiva Danielle em minha vida, por ela ser uma mulher linda, inteligente, compreensiva, amável, e porque não dizer cheirosa e vitaminada, ou seja, a pessoa mais importante do mundo para mim, sem dúvida o maior e melhor presente que eu poderia receber de Deus.*

*A professora orientadora, Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade que, na rigidez de seus ensinamentos, fez aprimorar meus conhecimentos em todas disciplinas, inclusive a disciplina da vida real.*

*Ao professor, Dr. Osimar de Carvalho Sanches que, na rigidez de seus ensinamentos, fez aprimorar meus conhecimentos.*

*A professora, Dr<sup>a</sup>. Letícia Yamasaki, pela auxílio nos momentos em que eu necessitei.*

*A noiva, Dr<sup>a</sup> Danielle Antonelli Motta, pelo companheirismo e os muitos momentos de alegria compartilhados.*

*“Nenhuma barreira é intransponível aos olhos de Deus”*

Marcos Rogerio Sgrignoli

## RESUMO

### COMPARAÇÃO DO USO DO TACROLIMUS 0,03% COLÍRIO DISSOLVIDO EM ÓLEO DE AMÊNDOA E DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTAL EM COELHOS

A ceratoconjuntivite seca é um distúrbio oftálmico que afeta a lágrima. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tacrolimus dissolvido em óleo amêndoa (OA) e de semente de linhaça (OSL) no tratamento da ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida em coelhos. Neste experimento foram utilizados vinte e cinco coelhos brancos machos da raça Nova Zelândia. Os animais foram alocados em 5 grupos, Grupo C (controle), Grupo TA (tacrolimus em OA), Grupo TL (tacrolimus em OSL), Grupo A (OA) e Grupo L (OSL), sendo avaliados semanalmente pelo Teste de Lágrima de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF) e Teste de Rosa Bengala (TRB), mensalmente pelo o exame de citologia esfoliativa da superfície ocular (CESO), e análise histopatológica ao final do experimento. Os valores obtidos foram significativo nos TLS com aumento em todos os grupos de tratados após a indução da CCS, apresentando melhor desempenho, o grupo L. No TF, houve resolução mais precoce das úlceras de córnea com os grupos A e L, enquanto no TRB o desempenho dos grupos foi similar. Os grupos TA e TL apresentaram menos edema e degeneração de córnea e conjuntiva. Ocorreu aumento significativo no número de células caliciformes em todos os grupos de tratados, principalmente nos grupos TA e TL. A avaliação dos resultados demonstram que não somente o tacrolimus, com seu efeito imunossupressor, mas também os veículos oleosos utilizados para sua diluição, possivelmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias, foram responsáveis na melhora dos sintomas do olho seco induzidos em coelhos.

**Palavras-chave:** Ceratoconjuntivite seca, citologia esfoliativa da superfície ocular, coelhos, óleo de amêndoa, óleo de semente de linhaça, histopatológico, tacrolimus.



## ABSTRACT

### COMPARISON OF THE USE OF TACROLIMUS 0,03% EYE DROPS DISSOLVED IN ALMOND OIL AND LINSEED IN EXPERIMENTAL TREATMENT OF KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA IN RABBITS

Keratoconjunctivitis sicca is an ophthalmic disorder that affects the tear. The objective of this study was to evaluate the efficacy of tacrolimus dissolved in almond oil (OA) and linseed (OSL) in the treatment of dry eye syndrome (CCS) induced in rabbits. This study used twenty-five white male rabbits of New Zealand race. The animals were divided into five groups, Group C (control), Group TA (tacrolimus OA), Group TL (OSL tacrolimus), Group A (OA) and Group L (OSL), and were evaluated weekly by Tear Test Schirmer (TLS), Fluorescein Test (TF) and Rose Bengal Test (TRB), monthly by the exfoliative cytology of the ocular surface (CESO), and histopathology at the end of the experiment. The values were significant in TLS with an increase in all treated groups after induction of CCS, featuring improved performance, the group L. In TF, was earlier resolution of corneal ulcers with groups A and L, while in the performance of TRB groups was similar. The TA and TL groups showed less edema and degeneration of the cornea and conjunctiva. Significant increase in the number of goblet cells in all treated groups, especially in groups TA and TL. The evaluation results show that tacrolimus not only with its immunosuppressive effect, but also oily vehicles used for dilution, possibly due to their anti-inflammatory properties, were responsible in improving symptoms of dry eye induced in rabbits.

**Key-words:** Keratoconjunctivitis sicca, cytology of the ocular superface, rabbits, amond oil, seed linseed oil, histopathological, tacrolimus.

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1	- Teste Lacrimal de Schirmer realizado em coelho.	21
FIGURA 2	- Teste de Fluoresceína realizado em coelho.	21
FIGURA 3	- Teste de rosa Bengala realizado em coelhos.	22
FIGURA 4	- Coleta de células da superfície ocular de coelho.	23
FIGURA 5	- Transferência das células colhidas para lâmina de microscópio.	23
FIGURA 6	- Resposta imunológica desencadeada por antígenos (AG) (endógenos ou exógenos).	27
FIGURA 7	- Processo de ativação da síntese de citocinas (CL) e interleucinas (IL) pelo Linfócito T.	28
FIGURA 8	- Processo de ativação da síntese de citocinas (CL) e interleucinas (IL) pelo linfócito T inibido pela ligação do tacrolimus ao complexo calcineurina.	28
FIGURA 9	- Principais etapas do metabolismo dos ômega-6 ( $\omega$ -6) e ômega-3 ( $\omega$ -3).	30

## LISTA DE QUADROS DA REVISÃO DE LITERATURA

QUADRO 1	- Camada, classificação, glândula produtora, localização da glândula produtora, componente e função do filme lacrimal pré-corneal (FLP).	24
----------	--	----

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- FIGURA 1 - Delineamento experimental. 52
- FIGURA 2 - Médias e desvios padrões dos valores obtidos do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) em mm/min dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL). 53
- FIGURA 3 - Medianas e percentis dos valores obtidos\* do teste de fluoresceína (TF) dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL). 54
- FIGURA 4 - Medianas e percentis dos valores obtidos\* do teste de Rosa Bengala (TRB) dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL). 55

- FIGURA 5 - Fotomicrografia de citologia esfoliativa da superfície ocular (CESO) da conjuntiva de coelho. (A) coelho n. 1 do grupo TL no M1 presença de células parabasais, (B) coelho n. 1 do grupo TL no M1 presença de células superficiais e (C) coelho n. 1 do grupo TL no M3 presença de células caliciformes – May-Grunwald-Giemsa (MGG) 400x. 56
- FIGURA 6 - (A) Foto micrografia olho direito (OD) de córnea do coelho n. 3 do grupo A no M12, com processo inflamatório leve e edema moderado (seta), membrana de Descemet (MD), estroma (E) – Hematoxilina-Eosina (H.E.) 100x. (B) Foto de micrografia olho direito (OD) de córnea do coelho n. 2 do grupo L no M12, evidenciando a separação da membrana de Descemet ao estroma (seta), devido ao edema moderado (cabeça de seta) – Hematoxilina-Eosina (H.E.) 400x. 57

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

- TABELA 1 - Medianas e percentis dos valores obtidos na citologia esfoliativa (CE) referente aos parâmetros de tipo de célula\* e celularidade\*\* dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL). 58
- TABELA 2 - Medianas e percentis dos valores obtidos\* na histopatologia da córnea e conjuntiva referente aos parâmetros edema, degeneração, necrose e células inflamatórias, e médias e desvio padrão do número de células caliciformes, em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL). 59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Antígeno
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CCS	Ceratoconjuntivite seca
CESO	Citologia esfoliativa da superfície ocular
CP450	Citocromo p450
CT	Citocina
FLP	Filme lacrimal pré-corneal
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e Eosina
IL	Interleucina
LB	Linfócito B
LC	Leucotrieno
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LT	Linfócito T
LTc	Linfócito T citotóxico
LTh	Linfócito T helper
MGG	May Grunwald Giemsa
MHC	Principal complexo de histocompatibilidade
OA	Óleo de amêndoa
OSL	Óleo de semente de linhaça
PG	Prostaglandina
TCR	Receptor de célula T
TF	Teste de fluoresceína
TLS	Teste lacrimal de Schirmer
TNF	Fator de necrose tumoral
TRFLP	Teste de ruptura do filme lacrimal pré-corneal
TX	Tromboxano
$\omega$ -3	Ômega 3
$\omega$ -6	Ômega 6

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Ceratoconjuntivite seca (CCS) .....	18
2.1.1 Etiologia .....	18
2.1.2 Fisiopatologia .....	19
2.1.3 Sinais Clínicos .....	20
2.1.4 Diagnóstico .....	20
2.1.4.1 Teste lacrimal de Schirmer .....	20
2.1.4.2 Teste de fluoresceína .....	21
2.1.4.4 Teste de rosa Bengala .....	22
2.1.4.4 Citologia esfoliativa da superfície ocular .....	22
2.1.5 Órgão e função afetada pela CCS .....	24
2.1.6 Tratamento .....	25
2.1.6.1 Tacrolimus .....	26
2.1.6.2 Óleo de semente de linhaça .....	29
2.1.6.3 Óleo de amêndoa .....	31
REFERÊNCIAS .....	33
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	37
RESUMO .....	38
INTRODUÇÃO .....	39
MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
RESULTADOS .....	44
DISCUSSÃO .....	45
AGRADECIMENTOS .....	47
REFERÊNCIAS .....	48
<b>ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA</b> Veterinary Ophthalmology .....	60



## 1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), conhecida popularmente por olho seco, causada principalmente por distúrbio autoimune que destrói as glândulas produtoras do filme lacrimal pré-corneal (FLP), tanto em animais quanto em seres humanos. (BARABINO, 2003; BERDOULAY, 2005; NELL, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; RASHID, 2008; WESTERMEYER, 2009; HE, 2010; RONCONE, 2010; WOJTOWICZ, 2011).

A CCS é muito comum e afeta a produção da lágrima, diminuindo a quantidade ou deixando-a disfuncional (ESTEVEZ, 2004; BERDOULAY, 2005; XIONG, 2008; WESTERMEYER, 2009; ANDRADE, 2010; RONCONE, 2010; WOJTOWICZ, 2011), pela ausência de uma de suas três camadas: uma camada externa lipídica que tem a função de evitar a evaporação precoce do FLP; uma camada intermediária aquosa que tem a função de lubrificação, nutrição, defesa, manutenção do epitélio corneal; uma camada interna de mucina que tem a função de aderência do FLP e lubrificação da córnea (KIRK, 1984; MOORE, 1987; GOMES, 2000; PINHEIRO JR, 2007; XIONG, 2008; HE, 2010).

Os sinais clínicos iniciais da CCS são: secreção mucóide a mucopurulenta, conjuntivite bacteriana, blefarite, hiperemia, quemose, úlcera de córnea e prurido (IZCI, 2002; BERDOULAY, 2005). Na CCS crônica, ocorre vascularização, pigmentação, queratinização, fibrose e opacificação da córnea que levar à cegueira (BARABINO, 2004).

O diagnóstico deve ser clínico com anamnese, exame físico focado na suspeita de CCS e exame ocular com os testes: Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste da Fluoresceína (TF), Teste do Rosa Bengala (TRB); Teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal Pré-corneal (TRFLP) e citologia esfoliativa da superfície ocular (CESO) (TOLOSA, 2003).

O tratamento mais preconizado é o uso de imunossupressores como a ciclosporina, o tacrolimus e o pimecrolimus (ESTÉVEZ, 2004; BARABINO, 2003; BERDOULAY, 2005; ANDRADE, 2010). Além disso, também são utilizadas as lágrimas artificiais, os corticosteróides, os mucolíticos, os lacrimoestimulantes (pilocarpina) e os antibióticos (GELATT, 1999).

O uso do tacrolimus vem crescendo atualmente devido ao bom desempenho em tratar a CCS e por ter algumas vantagens sobre a ciclosporina. O tacrolimus apresenta três efeitos terapêuticos que auxiliam no tratamento da CCS: seu efeito antibactericida que previne e trata infecções primárias e secundárias; seu efeito imunossupressor que diminuí a destruição causada por auto-anticorpos das glândulas produtoras de lágrima e seu efeito antiinflamatório que auxilia no tratamento do sintoma mais comum da CCS (ESTÉVES, 2004; RAMOS, 2008).

Assim como o tacrolimus o óleo de semente de linhaça (OSL) vem sendo muito usado no tratamento de processo inflamatório crônico pelo seu efeito antiinflamatório constatado por vários pesquisadores (HAIDAMUS, 2007). O óleo de amêndoa (OA) é vastamente utilizado em diversas formulações, mais ainda há poucos estudos que comprovem os seus efeitos terapêuticos relatados popularmente (SPILLER, 1992; DAVIS, 2001; SULTANA, 2007; AHMAD, 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do colírio a base de tacrolimus, potente imunossupressor, com dois tipos de veículos, o OA que já é utilizado como veículo do tacrolimus e o OSL, que possui propriedades imunomoduladora e antiinflamatória, além do uso isolado de cada óleo, no controle das alterações clínicas, citológicas e histopatológicas provocadas na CCS induzida experimentalmente em coelhos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Ceratocunjuntivite seca (CCS)**

A CCS é um dos distúrbios oftalmológicos mais frequentes que afeta tanto animais quanto seres humanos (BARABINO, 2003; BERDOULAY, 2005; NELL, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; RASHID, 2008; WESTERMEYER, 2009; HE, 2010; RONCONE, 2010; WOJTOWICZ, 2011). Ela acomete os olhos comprometendo a lágrima ou o filme lacrimal pré-corneal (FLP), nos parâmetros qualitativo e quantitativo (ESTEVEZ, 2004; BERDOULAY, 2005; XIONG, 2008; WESTERMEYER, 2009; ANDRADE, 2010; RONCONE, 2010; WOJTOWICZ, 2011), distribuição (PINHEIRO JR, 2007; RONCONE, 2010) ou drenagem pelo ducto lacrimal (GILBARD, 1987), causando um ressecamento da superfície ocular que leva à um aumento do atrito no movimento de piscar. Por ser uma doença de ciclo-vicioso (GOMES, 2000; BARABINO, 2003; PINHEIRO JR, 2007) causada comumente por distúrbios imunológicos (BERDOULAY, 2005; PINHEIRO JR, 2007; WESTERMEYER, 2009; ANDRADE, 2010), as terapias levam somente ao alívio temporário dos sintomas, fato que frustra os proprietários, pois dificilmente o animal chega a cura definitiva, sendo, na maioria dos casos, CCS crônica (BARABINO, 2003; PINHEIRO JR, 2007; RASHID, 2008; WESTERMEYER, 2009; RONCONE, 2010).

#### **2.1.1 Etiologia**

A CCS possui um leque enorme de etiologias podendo ser de origem primária ou secundária.

Nas causas primárias, devido a fatores genéticos (má formação das glândulas), idade (perda hídrica natural) as glândulas têm deficiência na produção do FLP, este fator levará a distúrbios com úlcera de córnea, processos inflamatórios e infecciosos, e perda da visão, em casos mais agressivos (IZCI, 2002; SAITO, 2004; BERDOULAY, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; GALERA, 2009).

Na maioria dos casos, a CCS é secundária sendo causada por um distúrbio de base, entre os mais comuns as doenças imunológicas onde há destruição das glândulas secretoras da lágrima (estudos imunohistoquímicos mostraram o acúmulo de linfócitos T helper - CD4 (LTh) na superfície ocular (TANG-LIU, 2005), levando à uma deficiência da porção aquosa, que acarreta conjuntivite mucopurulenta persistente, ulceração e formação de cicatriz corneanas); virais (cinomose); fármacos (sulfas, anestésicos, atropina); doenças metabólicas (hipotireoidismo); ambientais (exposição excessiva à luz, ventiladores, ar condicionado); traumas; processos inflamatórios e infecciosos oculares; doenças neurológicas; tumores e remoção da glândula da terceira pálpebra (IZCI, 2002; SAITO, 2004; BERDOULAY, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; GALERA, 2009).

### **3.1.1 Fisiopatologia**

Como citado previamente, as causas da CCS são variadas, mas levam à mesma consequência, à uma lágrima disfuncional ou à falta dela na superfície ocular que acarreta o seu ressecamento (KIRK, 1984; PINHEIRO JR, 2007), que causa irritação no local que leva a um processo inflamatório que diminui mais a produção do FLP, esta diminuição causa um aumento da irritação local, e o aparecimento de lesões e infecções secundárias fatores que elevam mais o processo inflamatório inicial causando um ciclo-vicioso (GOMES, 2000; BARABINO, 2003; PINHEIRO JR, 2007).

Outros agravantes podem aparecer devido às alterações causadas pela CCS, segundo KIRK (1984); PINHEIRO JR (2007); ANDRADE (2010) o processo inflamatório pode levar à queratinização do tecido glandular com diminuição na quantidade e/ou qualidade do FLP (PINHEIRO JR, 2007; RONCONE, 2010). O processo inflamatório também pode causar o fechamento do ducto lacrimal causando alteração no FLP (GILBARD, 1987) ou causar alterações no tônus muscular palpebral causando ressecamento da superfície ocular, devido à evaporação do FLP (KIRK, 1984; GOMES, 2000; RONCONE, 2010). A deficiência do FLP causa redução da proliferação celular dificultando a regeneração tecidual (PINHEIRO JR, 2007).

#### **4.1.1 Sinais clínicos**

Os sinais clínicos da CCS são variados causando um grande desconforto ao paciente, e consistem em sensação de areia ao piscar, ardor, prurido, hiperemia conjuntival, secreção mucóide a mucopurulenta, conjuntivite bacteriana, blefarite, quemose, úlcera de córnea (IZCI, 2002; BERDOULAY, 2005).

Na CCS crônica, ocorre vascularização, pigmentação, queratinização, fibrose e opacificação da córnea que podem levar à cegueira (BARABINO, 2004). Um sintoma comum a todos os tipos de ceratoconjuntivite, independente da sua etiologia, é o processo inflamatório ocular (PINHEIRO JR, 2007; RASHID, 2008). Estes sintomas no período da noite tendem a ficar mais intenso e ficar mais brando pelo amanhecer (FREITAS, 2004).

Fêmeas e animais idosos tem maior predisposição a desenvolver a CCS (FREITAS, 2004; PINHEIRO JR, 2007; RASHID, 2008; XIONG, 2008; WESTERMEYER, 2009; HE, 2010; RONCONE, 2010), nas fêmeas isto ocorre devido aos fatores hormonais e nos animais idosos é devido a perda hídrica decorrente do envelhecimento (PINHEIRO JR, 2007).

#### **5.1.1 Diagnóstico**

O diagnóstico clínico é feito com anamnese, exame físico focado na suspeita de CCS e exame ocular com os testes:

##### **2.2.5.1. Teste lacrimal de Schirmer (TLS)**

Teste lacrimal de Schirmer (Figura 1) é realizado para avaliar a quantidade de lágrima produzida, onde após limpeza ocular com algodão seco, 0,5 mm da ponta da fita de Schirmer é introduzida no saco conjuntival por um período de um minuto nos animais e posteriormente retirado e a quantidade de lágrima mensurada, e considerado positivo para CCS valores  $\leq 5$ mm (NELL, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; XIONG, 2008; WESTERMEYER, 2009; RONCONE, 2010).



Figura 1 – Teste lacrimal de Schirmer realizado em coelho.  
Fonte: Arquivo pessoal

#### 2.2.5.2. Teste de fluoresceína (TF)

Teste de fluoresceína (Figura 2) é realizado para observar a presença ou não de úlceras coradas, com a tira de fluoresceína 1%, encostando-a no saco conjuntival (NELL, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; XIONG, 2008; WESTERMEYER, 2009; RONCONE, 2010).



Figura 2 – Teste de fluoresceína realizado em coelho.  
Fonte: Arquivo pessoal

### 2.2.5.3. Teste de rosa Bengala (TRB)

Teste de rosa Bengala (Figura 3) é realizado para a coloração de células desvitalizadas pela CCS, onde após instilação de colírio anestésico, é utilizada 1 gota do colírio de Rosa Bengala 0,5%. Após a utilização dos corantes, os olhos devem ser lavados com solução fisiológica, pois pode ocorrer irritação ocular (NELL, 2005; PINHEIRO JR, 2007; EL-SHAZLY, 2008; XIONG, 2008; WESTERMEYER, 2009; RONCONE, 2010).



Figura 3 – Teste de rosa Bengala realizado em coelhos.  
Fonte: Arquivo pessoal

### 2.2.5.4. Citologia esfoliativa da superfície ocular (CESO)

Citologia esfoliativa da superfície ocular é realizada para avaliar o processo inflamatório e a regeneração celular. Os animais recebem colírio anestésico e então, são colhidas amostras de células da conjuntiva superior, inferior, lateral, medial e córnea, de ambos os olhos. A coleta das células é feita com uso de swab umedecido em solução fisiológica (figura 4) e transferidas para as lâminas microscópicas (Figura 5). Em seguida as lâminas são fixadas em álcool metílico, e posteriormente coradas pela técnica de May-Grunwald-Giemsa ( TOLOSA, 2003).



Figura 4 – Coleta de células da superfície ocular de coelho.  
Fonte: Arquivo pessoal

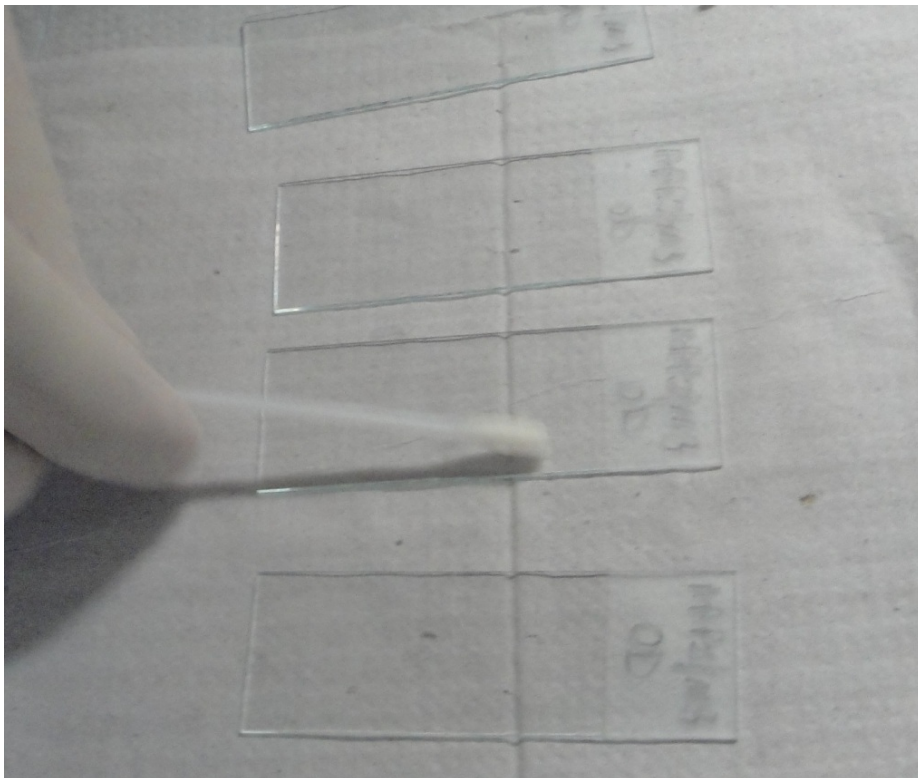


Figura 5 – Transferência das células colhidas para lâmina de microscópio.  
Fonte: Arquivo pessoal



O diagnóstico diferencial pode ser feito com testes imunológicos pouco usado em animais.

### 6.1.1 Órgão e função afetada pela CCS

O órgão afetado pela CCS são olhos e a função comprometida é a produção do FLP, que é composto de três camadas exercendo varias funções (KIRK, 1984; MOORE, 1987; GOMES, 2000; PINHEIRO JR, 2007; XIONG, 2008; HE, 2010). Atualmente, há pesquisadores que afirmam ter somente duas camadas (PINHEIRO JR, 2007). Esta classificação, camadas, localização das glândulas, componentes e funções do FLP estão relacionados no quadro 1.

Quadro 1 – Camada, classificação, glândula produtora, localização da glândula produtora, componente e função do filme lacrimal pré-corneal (FLP).

Camada		Glândula produtora	Localização	Componentes	Função
1ª classificação	2ª classificação				
Externa	Lipídica 0,02%	Glândulas sebáceas conhecidas como glândulas de Meibômius e Zeis	Pálpebras superior e inferior	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ésteres</li> <li>• Trilicerídeos</li> <li>• Ácidos graxos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar Evaporação</li> <li>• Lubrificação</li> </ul>
Intermediária	Aquosa 99,78%	Glândula lacrimal Principal (nictitante)	Abaixo do osso frontal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxigênio</li> <li>• Gás Carbônico</li> <li>• Anticorpos</li> <li>• Fatores de Crescimento</li> <li>• Glicose</li> <li>• Enzimas</li> <li>• Hormônios</li> <li>• Insulina</li> <li>• Eletrólitos: Na+, Ca+</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lubrificação</li> <li>• Hidratação</li> <li>• Transporte de: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nutrição</li> <li>▪ Defesa</li> <li>▪ Manutenção</li> </ul> </li> </ul>
		Glândulas 3ª palpebra	3ª palpebra		
		Glândulas lacrimais acessórias	Pálpebras superior e inferior		
Interna	Mucina 0,2%	Glândulas conjuntivas (Células calciformes)	Epitélio conjuntival	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicoproteínas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aderência (a mucina torna a superfície ocular (córnea) que é hidrofóbica em hidrofílica, que possibilita a adesão da lagrima</li> <li>• Lubrificação</li> </ul>

A diferença da primeira para a segunda classificação é somente de nomenclatura, pois na classificação atual os autores citam que existem duas camadas: uma camada lipídica e uma camada gel-mucosa ou gel-aquosa, onde as camadas intermediária (aquosa) e interna (mucina) se tornam uma só, chamada de gel-aquosa. Como vimos a lágrima é uma substância bem complexa que é produzida ininterruptamente e exerce varias funções, portanto qualquer alteração no filme lacrimal, por menor que seja, poderá causar irritação ocular (PINHEIRO JR, 2007), podendo acarretar a CCS. Pinheiro Jr (2007) em seu trabalho afirma que substâncias como a histamina e prostaglandina regulam a secreção de mucina da camada interna do FLP, já Gomes (2000) descreve que as glândulas secretoras do FLP podem sofrer um processo cicatricial ou obstrutivo causando uma diminuição na secreção destas glândulas.

Outro fator é o mecanismo de piscar que é de fundamental importância para o bem estar dos olhos. Quando as pálpebras superior e inferior piscam elas exercem as funções de limpeza e proteção da superfície ocular, retirar o FLP anterior direcionando-o para o ducto lacrimal para sua drenagem e espalhar homogeneamente o novo FLP sobre superfície ocular (PINHEIRO JR, 2007; GILBARD, 1987), para que o FLP exerça suas funções acima citada. O mecanismo de piscar é muito sensível necessitando que todos os fatores envolvidos nesta ação estejam funcionando corretamente, a quantidade e qualidade do FLP, o epitélio superficial das pálpebras e córnea, o tônus muscular (KIRK, 1984; GOMES, 2000; RONCONE, 2010), entre outras, uma falha em qualquer um destes componentes poderá ser o gatilho para o início de uma CCS, pois qualquer alteração deste mecanismo leva ao ressecamento da superfície ocular, podendo causar processo inflamatório levando a um ciclo vicioso já descrito (RASHID, 2008). As alterações mais comuns no mecanismo de piscar são alteração do tônus muscular que causará deficiência em espalhar uniformemente o FLP sobre a córnea; obstrução do ducto naso lacrimal que afetara a troca do FLP (PINHEIRO JR, 2007; RONCONE, 2010).

### **7.1.1 Tratamento**

O sucesso do tratamento depende de um diagnóstico preciso, que em muitos dos casos é dificultado devido ao grande leque de etiologias que levam à CCS (PINHEIRO JR, 2007). Utilizando de uma visão geral o tratamento da CCS

consiste em tratar a causa e os sintomas, as terapias mais comuns utilizam para diminuir o processo inflamatório, corticoides em pacientes que não apresentam úlcera de córnea ou anti-inflamatório não esteroidais para pacientes que apresentam úlcera de córnea, cirurgia de desobstrução do ducto naso lacrimal (KIRK, 1984), antibióticos em pacientes que apresentam processo infeccioso bacteriano primário e/ou secundário, estimulador da produção de lágrima (pilocarpina), lágrima artificial em pacientes que não produzem ou produzem em pequena quantidade, controle dos fatores externos como não permanecer em locais com ventiladores e ar condicionados. Nos casos onde a causa é imunológica associa-se imunossupressores como a ciclosporina, o pimecrolimus e o tacrolimus (BARABINO, 2003; BERDOULAY, 2005).

#### **2.2.7.1. Tacrolimus**

O tacrolimus é um antibiótico macrolídeo da classe das lactonas (ESTEVEZ, 2004; RAMOS, 2008), extraído do caldo de cultura do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, achado no solo, que apresenta efeitos terapêuticos que auxiliam no tratamento da CCS. Entre estes efeitos podemos citar:

- Estabilização do FLP (BERDOULAY, 2005);
- Ação imunossupressora que se dá pela inibição da ativação dos linfócitos T (LT) e B (LB), no estágio inicial. Este mecanismo ocorre da seguinte forma: na presença de um antígeno (AG) (endógeno ou exógeno) as células apresentadoras de antígenos (APCs) (macrófagos, linfócitos B e células dendríticas) fagocitam os antígenos que depois de fagocitados serão processado (fragmentados) por uma organela localizada no citoplasma celular chamada proteosoma (no caso do antígeno ser endógeno) ou fagolisossoma (no caso do antígeno ser exógeno). Este processo de fragmentação manda uma mensagem ao retículo endoplasmático (organela localizada no citoplasma celular) para que comece a sintetizar uma molécula de maior complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe um (MHC I), nos casos de antígeno endógenos e de classe dois (MHC II) nos casos de antígeno exógenos. Após processados, os fragmentos migram até o retículo endoplasmático se ligam-se à molécula de MHC. Após a ligação antígeno (fragmentado) com a molécula de MHC, este complexo migra para a

membrana celular e apresenta o antígeno para os linfócitos T (linfócito T citotóxico – CD8 (LTc) nos casos de antígeno endógeno, e linfócito T helper – CD4 (LTh) nos casos de antígenos exógenos), que liga-se a APC por uma molécula chamada receptor de célula T (TCR). Esta ligação APC e linfócito T manda uma informação ao núcleo do linfócito T para que ele comece a sintetizar citocinas (CT) e interleucinas (IL). Estas CT e IL exercem várias funções na resposta imunológica e no processo inflamatório, entre algumas funções podemos citar: proliferação dos linfócitos T e B; fator de necrose tumoral (TNF) (Figura 6).

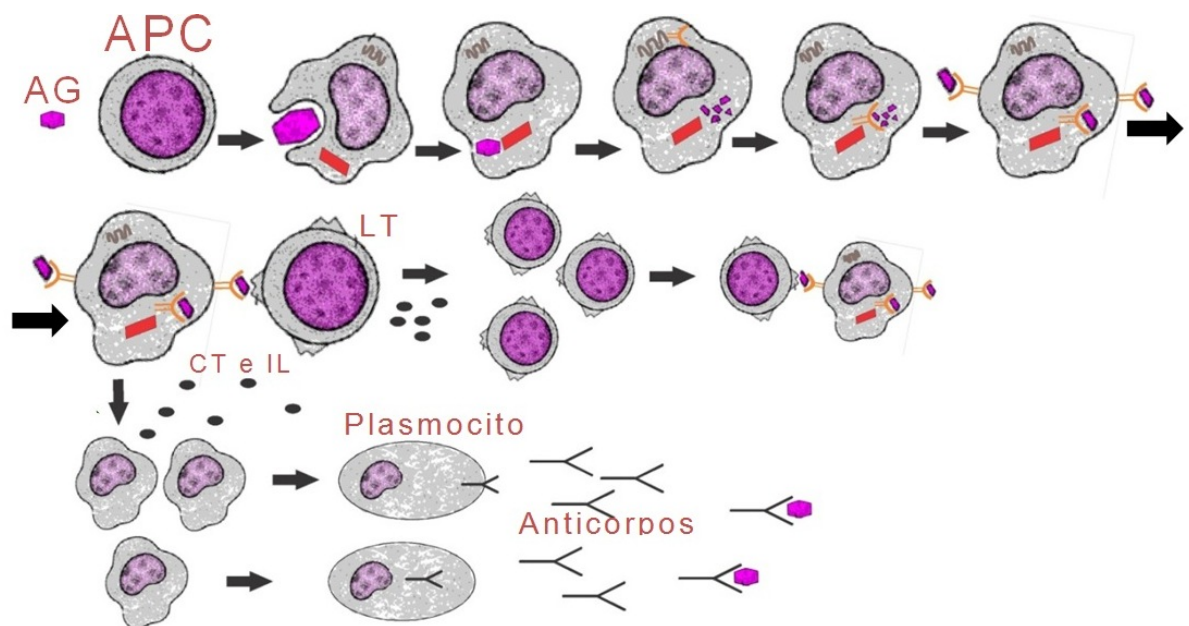


Figura 6 – Resposta imunológica desencadeada por antígenos (AG) (endógenos ou exógenos).

Fonte: Arquivo pessoal

Após a ligação APC+LT desencadeia a produção de um complexo formado por uma molécula de calcineurina ligada a uma imunofilina e a três moléculas de fósforo esta substância formada serve como um complexo “chave-fechadura” ativando o núcleo do LT para comande a síntese de CT e IL (Figura 7). O tacrolimus age neste complexo (calcineurina+imunofilina+3-fósforo) retirando uma molécula de fósforo para ligar-se a este complexo formando um novo complexo calcineurina+imunofilina+2-fósforo+tacrolimus. Este novo complexo formado não tem afinidade química aos receptores nucleares, com isto não a informação para que o núcleo comande a síntese e liberação de CT e IL (Figura 8), inibindo assim a ativação dos LT e LB (ESTEVEZ, 2004; RAMOS, 2008);

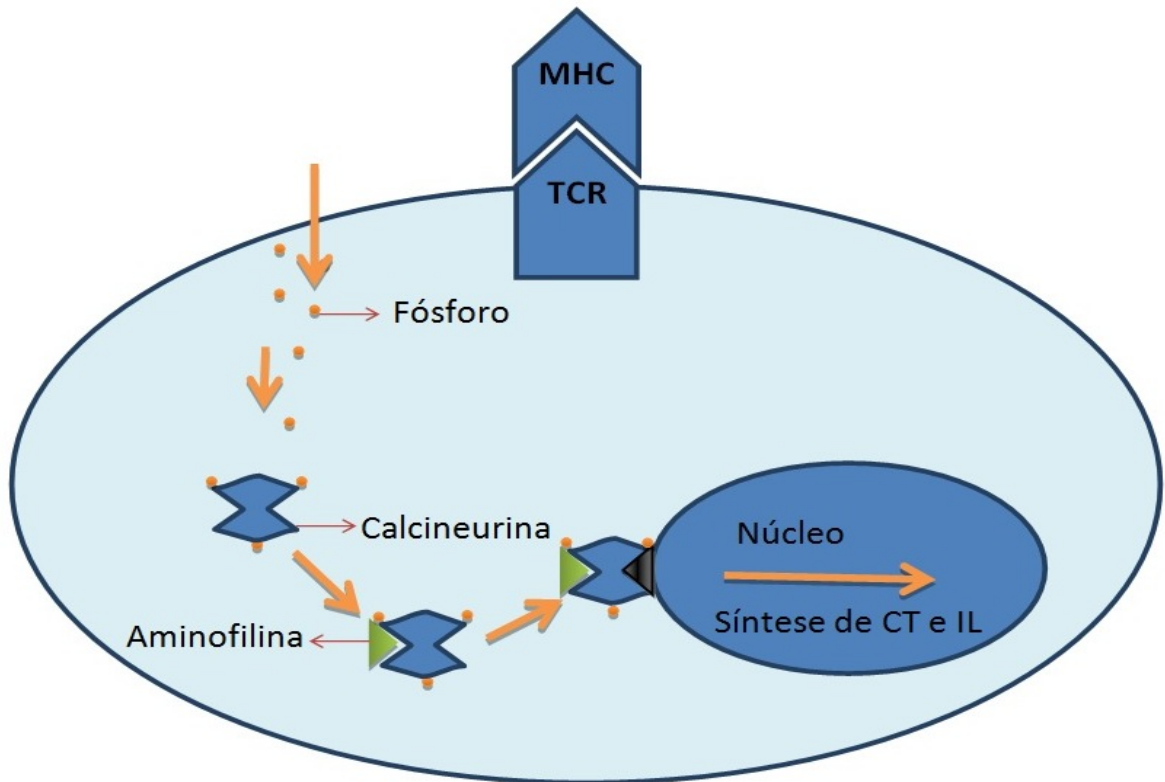


Figura 7 – Processo de ativação da síntese de citocinas (CL) e interleucinas (IL) pelo Linfócito T.

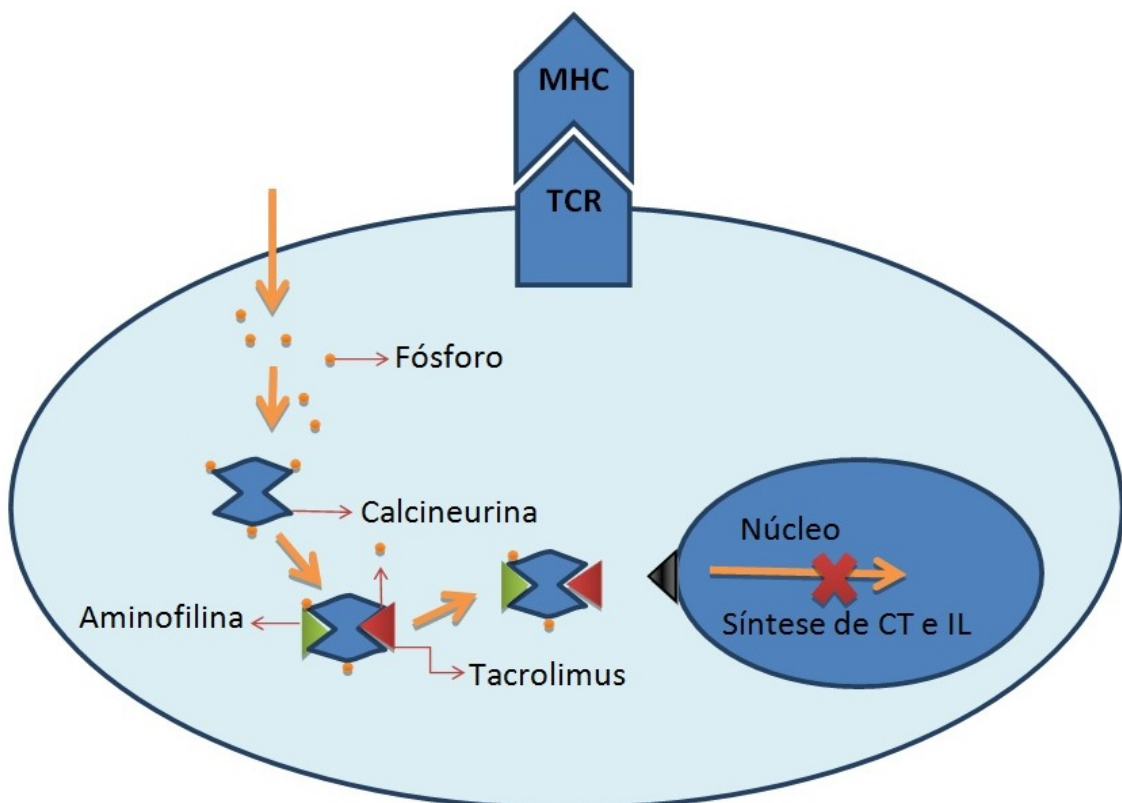


Figura 8 – Processo de ativação da síntese de citocinas (CL) e interleucinas (IL) pelo linfócito T inibido pela ligação do tacrolimus ao complexo calcineurina.

- Ação antiinflamatória ocorre pelo mesmo mecanismo da ação imunossupressora descrita acima, pois o tacrolimus inibe a liberação de CT, IL e TNF (ESTEVEZ, 2004; RAMOS, 2008), apesar de BERDOULAY (2005) relatar em seu trabalho que esta ação antiinflamatória do tacrolimus ainda é incerta.

O tacrolimus é um pó branco que quando ingerido é rapidamente absorvido, ligando-se a proteínas plasmáticas (principalmente albumina) para ser distribuído, metabolizado no fígado pelo citocromo p450 (CP450) onde ocorre a desmetilação e hidroxilação que torna a molécula mais hidrossolúvel para facilitar a excreção via renal (ESTEVEZ, 2004), por ser metabolizado pela CP450 uma enzima envolvida no metabolismo de vários medicamento e substâncias o tacrolimus pode sofrer interação medicamentosa.

O tacrolimus apresenta como efeitos colaterais no rim, elevação da uréia (ESTEVEZ, 2004; RAMOS, 2008), no pâncreas diminui a secreção e no sistema nervoso alguns efeitos periféricos. O tacrolimus, se associado com a ciclosporina, causa sinergismos tanto no efeito imunossupressor quanto nos efeitos colaterais (ESTEVEZ, 2004; BERDOULAY, 2005).

As vantagens do tacrolimus sobre a ciclosporina são: “In vitro” o tacrolimus teve absorção mais rápida do que a ciclosporina presumidamente pelo seu menor peso molecular e por ser mais hidrossolúvel (BERDOULAY, 2005), “In vitro” é de 50 a 100 vezes mais potente (ESTEVEZ, 2004; BERDOULAY, 2005), a ciclosporina apresenta efeitos colaterais mais graves (ESTEVEZ, 2004), A ciclosporina causa irritação tópica (RAMOS, 2008).

#### **2.2.7.2. Óleo de semente de linhaça (OSL)**

A linhaça, uma planta da família Linaceae, chamada *Linum usitatissimum* que cresce em vários países (PINHEIRO JR, 2007; HASSAN-ZADEH, 2009), tem na composição de sua semente 16% de ácidos graxos linolênico (ômega-6), 57% de ácidos graxos alfa-linolênico (ômega-3), 18% de ácidos graxos monoinsaturados, 9% de ácidos graxos insaturados que exercem as seguintes ações terapêuticas relatadas por vários pesquisadores (PINHEIRO JR, 2007; MARTINS, 2008; RASHID, 2008; HASSAN-ZADEH, 2009; ANDRADE, 2010; HE,

2010) quando ingeridos via oral, num período de 180 dias, mas não tinha sido testados se estes efeitos quando usado por via tópica, ou seja se a absorção dos ômega 3 e 6 por via tópica (PINHEIRO JR, 2007). Os efeitos terapêuticos relatados que auxiliam no tratamento da CCS são:

- Ação imunomoduladora: o OSL diminui 90% da produção das CT, IL-1-beta, TNF-alfa (BARABINO, 2003; PINHEIRO JR, 2007; RASHID, 2008; HE, 2010). A ação imunomoduladora ocorre pela inibição da IL-10 e IL-1 que inibe a produção e liberação de TNF por macrófagos inibindo a função acessória do macrófago que é de ativar os linfócitos T através da redução da expressão de MHC classe II (RASHID, 2008);
- Ação anti-inflamatória, para que haja esta ação os ômega-6 e ômega-3 devem ser ingeridos em proporção adequada sem uma porção de ômega-6 para quatro porções de ômega-3 (1:4) (KELLEY, 1988; MARTINS, 2008; RASHID, 2008; ANDRADE, 2010; RONCONE, 2010). Os ômega são ácidos graxos essenciais poli-insaturados com cadeia de 20 carbonos e 3 insaturações. Estes ômega podem estar de forma livre na circulação ou fazer parte da membrana celular (fosfolipídeos) (MARTINS, 2008). Do metabolismo do ômega-6, originam dois tipos de mediadores químicos (prostaglandinas (PG), leucotrienos (LC), tromboxanos (TX)), os da série 1 fisiológicos (anti-inflamatório) ou da série 2 (pró-inflamatório). Já do metabolismo do ômega-3, originam mediadores químicos da série 3 e 5 (pouco eficaz no processo inflamatório) (MARTINS, 2008). A figura 9 mostra as principais enzimas e fases do metabolismo dos ômega até a formação dos mediadores químicos.

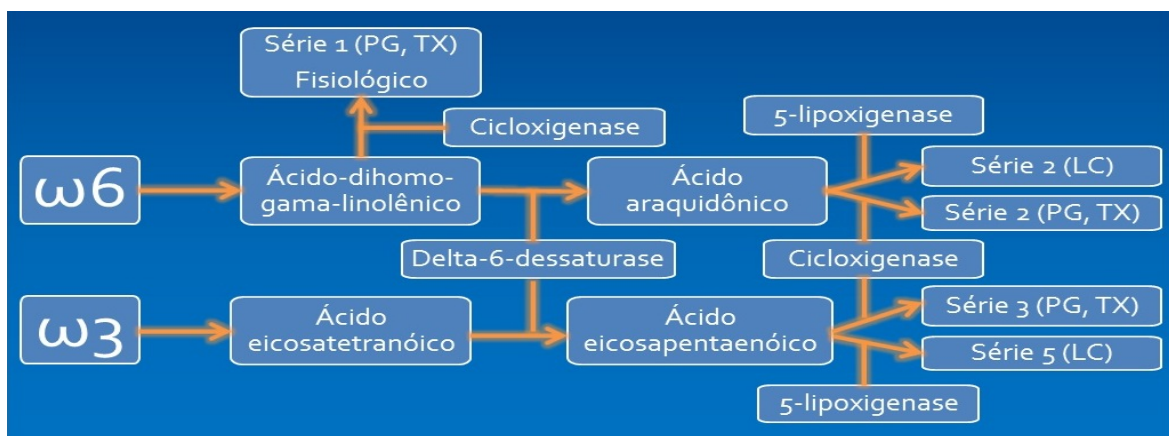


Figura 9 – Principais etapas do metabolismo dos ômega-6 ( $\omega$ -6) e ômega-3 ( $\omega$ -3).  
Fonte: Arquivo pessoal

A enzima delta-6-dessaturase está envolvida no metabolismo de ambos os ômega-6, mas apresenta afinidade maior pelo ômega-3 (MARTINS, 2008) por isto quando os ômega-6 são ingeridos na proporção considerada adequada de 1:4 (ômega-6 e ômega-3 respectivamente), a enzima por ter maior afinidade pelo ômega-3 que está em maior quantidade do que o ômega-6, passa a metabolizar praticamente só o ômega-3 dando origem a metabólitos da série 3 e 5 que não irão causar muitas alterações no processo inflamatório. Em decorrência da enzima delta-6-dessaturase estar metabolizando o ômega-3, o metabolismo do ácido-dihomo-gama-linolênico está diminuído deixando de formar ácido araquidônico, com isto a formação de mediadores químicos da série 2 também esta diminuída. O acúmulo de ácido-dihomo-gama-linolênico começa ser metabolizado pela enzima cicloxigenase dando origem a mediadores químicos da série 1 fisiológicos (antiinflamatórios) (BARABINO, 2003; HAIDAMUS, 2007; MARTINS, 2008).

O óleo de semente de linhaça tem a proporção de ômega-6 e ômega-3 muito próxima do ideal (1:3 repectivamente) (PINHEIRO JR, 2007; ANDRADE, 2010; RONCONE, 2010), por este motivo é considerado uma das fontes mais importantes de ômega-6 e ômega-3 conhecida (MARTINS, 2008; RONCONE, 2010). Baseado nestas informações, entende-se por que vários autores afirmam a eficácia dos ômega-6 e ômega-3 na terapia antiinflamatória, inclusive em processo inflamatórios oculares causados pela CCS (BARABINO, 2003; PINHEIRO JR, 2007; RONCONE, 2010; HE, 2010; WOJTOWICZ, 2011; RASHID, 2008).

### **2.2.7.3. Óleo de amêndoa (OA)**

Óleo de amêndoa é utilizado há muito tempo na medicina chinesa, ayurvedica, grega e persa para tratar condições de pele secas, como psoríases e eczema (AHMAD, 2010). Embora nenhum dado científico conclusivo exista atualmente, o óleo de amêndoa contém agentes fitatos e fenólicos que conferem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de reduzirem níveis de lipídeos e inibição da atividade de tripsina e amilase (GARRIDO, 2008; AHMAD, 2010). Alguns estudos sugerem que o óleo de amêndoas reduz sintomas de síndrome de intestino irritável e a incidência de câncer de colón (DAVIS, 2001). Além disso, também foram identificados benefícios cardiovasculares com elevação dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e redução de lipoproteínas de baixa



densidade (LDL) (SPILLER, 1992). O óleo de amêndoa tem ação emoliente e tem sido usado para melhorar aparência e tom de pele causados pelos danos induzidos pela irradiação ultravioleta e para redução de cicatrizes pós-operatórias (SULTANA, 2007; AHMAD, 2010). Andrade (2010) ainda relata sua utilização como veículo de alguns colírios por conferir conforto ocular.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, Z. The uses and properties of almond oil. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 16, p. 10-12. 2010.

ANDRADE, S. F.; BRAVO, B.; FUKUI, R. M. Uso de óleo de semente de linhaça por via tópica no tratamento de ceratoconjuntivite seca: relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 31., 2010. **Anais...** Belém, 2010.

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

BARABINO, S.; DANA, M. R. Animal models of Dry Eye: A Critical Assessment of Opportunities and Limitations. **Investigaive Ophthalmooogy and Visual Science**, v. 45, p. 1641-1646, 2004.

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

DAVIS, P. A.; IWAHASHI, C. K. Whole almonds and almond fractions reduce aberrant crypt foci in a rat model of colon carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 165, p. 27-33. 2001.

EL-SHAZLY, A. H. M.; EL-GOHARY, A. A.; EL-SHAZLY, L. H. M.; EL-HOSSARY, G. G. Comparison beteeen two cyclooxygenase inhibitors in an experimental dry eve model in albino rabbits. **Acta Pharmacology**, v. 58, p. 163-173, 2008.

ESTÉVEZ, R. A. **Ação do *tacrolimus* na reepitelização corneana em coelhos**. 2004. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais , Belo Horizonte.

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.

GARRIDO, I. et al. Polyphenols and antioxidante properties of almond skins: influence of industrial processing. **Jornal of Food Science**, v. 73, p. 106-115, 2008.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. São Paulo: Roca, 2009, p.69-96.

GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 3<sup>th</sup> edn. 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. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, 2000.

HADAMUS, 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.

JIUCHENG, H; BAZAN, H. E. P. Omega-3 fatty acids in dry eye and corneal nerve regeneration after refractive surgery. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 82, p. 319–325. 2010.

IZCI C. 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**, v. 63, p. 688-694. 2002.

KELLEY, D. S. et al. Effects of type of dietary fat on indices of immune status of rabbits. **The Journal of Nutrition**, v. 850, p. 1376-1384. 1988.

KIRK, R. W. **Atualização terapêutica veterinária pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1984.

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.

MOORE, C. P. et al. Density and distribution of canine conjunctive goblet cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, p. 1925-1932, 1987.

NELL, B. et al. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, p. 39-46. 2005.

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.

RAMOS, A. F. L. H. et al. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tacrolimus durante a fase de pré-implantação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, p. 119-223, 2008.

RASHID, S. et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. **Archives of Ophthalmology**, v. 126, p. 210-225. 2008.

RONCONE, M.; BARTLETT, H.; EPERJESI, F. Essential fatty acids for dry eye: A review. **Contact Lens & Anterior Eye**, v. 33, p. 49-54. 2010.

SAITO, A.; WATANABE, Y.; KOTANI, T. Morphologic changes of the anterior corneal epithelium caused by third eyelid removal in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, p. 113-119. 2004.

SPILLER, G. A.; JENKINS, D. J.; CRAGEN, L. N.; GATES, J. E.; BOSSELLO, O.; BERRA, K.; RUDD, C.; STEVENSON, M.; SUPERKO, R. Effect of a diet high in monounsaturated fat from almonds on plasma cholesterol and lipoproteins. **Journal of American College of Nutrition**, v.11, p. 126-130. 1992.

SULTANA, Y. et al. Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. **Journal of Comestic Dermatology**, v. 6, p.14-19. 2007.

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.

TOLOSA, E. M. C. et al. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. p.34.

WESTERMEYER, H. D.; WARD, D. A.; ABRAMS, K. Breed predisposition to congenital alacrima in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 1, p. 1–5. 2009.

WOJTOWICZ, J. C.; BUTOVICH, I.; UCHIYAMA, E. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. **Cornea**, v. 30, p. 308-314. 2011.

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

## ARTIGO CIENTÍFICO

### **Comparação do uso do tacrolimus 0,03% colírio dissolvido em óleo de amêndoa e de semente de linhaça no tratamento de ceratoconjuntivite seca experimental em coelhos**

Marcos Rogerio Sgrignoli,<sup>a</sup> Leticia Yamasaki,<sup>b</sup> Osimar de Carvalho Sanches,<sup>b</sup> Rogério Giuffrida,<sup>c</sup> Claudia Lizandra Ricci,<sup>d</sup> Gabriela de Campos Santos,<sup>d</sup> Heloisa Ferreira Duarte do Valle,<sup>d</sup> Luis Felipe da Costa Zulim,<sup>d</sup> Daniele Alves Silva,<sup>e</sup> Karina Maria Basso,<sup>e</sup> Mariele Catherine Alves Silva<sup>e</sup> e Silvia Franco Andrade<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 Anatomia Patológica (UNOESTE); <sup>c</sup>Faculty of Veterinary Medicine, University of Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brazil, <sup>d</sup>Discente do Curso de Medicina Veterinária (UNOESTE); <sup>e</sup>Residente do Hospital Veterinário (UNOESTE); <sup>f</sup>Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais (UNOESTE).*

Endereço para contato:

S. F. Andrade

Tel.: +55 18 3229 2067

Fax: +55 18 3229 2036

e-mail: [silviafranco@unoeste.br](mailto:silviafranco@unoeste.br)

Título Abreviado: Tacrolimus, óleo de amêndoa e linhaça tratamento olho seco

**RESUMO:**

**Objetivos** Avaliar a eficácia do uso tópico do tacrolimus dissolvido em dois tipos de veículos, óleo de amêndoa (OA) e óleo de semente de linhaça (OSL), e dos óleos isoladamente, no tratamento da ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida em coelhos.

**Animais** Vinte e cinco coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia.

**Procedimento** Os animais foram alocados em 5 grupos, Grupo C (controle), Grupo TA (tacrolimus em OA), Grupo TL (tacrolimus em OSL), Grupo A (OA) e Grupo L (OSL), sendo avaliados durante 12 semanas semanalmente pelo Teste de Lágrima de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF) e Teste de Rosa Bengala (TRB), mensalmente pelo o exame de citologia esfoliativa (CE) e análise histopatológica ao final do experimento.

**Resultados** Houve aumento significativo nos valores de TLS em todos os grupos de tratamento após a indução da CCS, apresentando um desempenho melhor o grupo L. Com relação aos parâmetros TF, houve resolução mais precoce das úlceras de córnea com os grupos A e L, enquanto no TRB, o desempenho dos grupos foi similar. Os grupos TA e TL apresentaram menos edema e degeneração de córnea e conjuntiva. Houve um aumento significativo no número de células calciformes em todos os grupos de tratamento, principalmente nos grupos TA e TL.

**Conclusão** Os resultados analisados demonstram que, não somente o tacrolimus com seu efeito imunossupressor, mas também os veículos oleosos utilizados para sua diluição, possivelmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias, foram responsáveis na melhora dos sintomas do olho seco induzidos em coelhos.

**Palavras-chave** Ceratoconjuntivite seca, coelhos, óleo de amêndoa, óleo de semente de linhaça, tacrolimus.

## INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou síndrome do olho seco é uma doença caracterizada pela diminuição da quantidade, modificação da qualidade e/ou diminuição da estabilidade da lágrima ou filme lacrimal pré-corneal (FLP) que afeta tanto seres humanos quanto animais, sendo que na maioria dos casos não há cura definitiva somente o controle dos sintomas.<sup>1-3</sup>

Os sinais clínicos iniciais da CCS consistem em secreção mucóide a mucopurulenta, conjuntivite bacteriana, blefarite, hiperemia, quemose, úlcera de córnea, prurido, vascularização, pigmentação, queratinização, fibrose e opacificação da córnea, que levam a cegueira.<sup>3,4</sup> O diagnóstico se baseia na anamnese, exame físico e exame ocular com os testes: teste lacrimal de Schirmer (TLS), teste de fluoresceína (TF), teste de rosa Bengala (TRB); tempo de ruptura do filme lacrimal pré-corneal (TRFLP) e citologia esfoliativa (CE) da superfície ocular.<sup>3-5</sup>

Uma das causas mais frequentes da CCS são as reações imunomediadas nas glândulas lacrimais e da terceira pálpebra.<sup>3,6,7</sup> Estudos imunohistoquímicos mostraram o acúmulo de CD4 (T-helper) na superfície ocular, levando à uma deficiência da porção aquosa, por isto o tratamento mais preconizado atualmente é o uso de imunossupressores como a ciclosporina, o tacrolimus e o pimecrolimus,<sup>6-14</sup> além do uso de lágrimas artificiais, corticosteróides, mucolíticos, parassimpatomiméticos lacrimoestimulantes, como a pilocarpina, e os antibióticos.<sup>3,4</sup> Outras causas importantes de CCS em animais são virais (cinomose), uso de fármacos (sulfas, anestésicos, atropina), doenças metabólicas (hipotireoidismo), ambientais, traumáticas, processos inflamatórios e infecciosos oculares, doenças neurológicas, tumores e remoção da glândula da terceira pálpebra.<sup>1,3,4</sup>

O tacrolimus é um antibiótico macrolídeo da classe das lactonas, extraído do caldo de cultura do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, achado no solo, com ação regulatória mitótica



que auxilia na regeneração do epitélio corneal devido ao seu efeito catalizador, estabilização do filme lacrimal pré-corneal (FLP), ação imunossupressora pela inibição da ativação dos linfócitos-T e linfócitos-B, no estágio inicial, inibindo a calcineurina, uma molécula essencial na liberação de interleucina-2 para proliferação dos linfócitos na resposta imunológica. O tacrolimus é comercializado para uso tópico ocular em suspensão aquosa 0.02%, ou em solução oleosa ou unguento a 0.03% utilizando principalmente o óleo de oliva ou de amêndoas como veículo oleoso.<sup>7,12,14</sup>

O óleo de amêndoa é utilizado há muito tempo na medicina chinesa, ayurvedica, grega e persa para tratar condições de pele secas, como psoríases e eczema.<sup>15</sup> Embora nenhum dado científico conclusivo exista atualmente, o óleo de amêndoa contém agentes fitatos e fenólicos que conferem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de reduzirem níveis de lipídios e inibição da atividade de tripsina e amilase.<sup>16</sup> Alguns estudos sugerem que o óleo de amêndoas reduz sintomas da síndrome de intestino irritável e a incidência de câncer de colón.<sup>17</sup> Além disso, também foram identificados benefícios cardiovasculares com elevação dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e redução de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).<sup>18</sup> O óleo de amêndoa possui ação emoliente e hidratante sendo muito utilizado na cosmetologia e como veículo de vários produtos por via tópica.<sup>15,19</sup>

A linhaça, uma planta da família Linaceae, chamada *Linum usitatissimum*, cresce em vários países e tem na composição de sua semente 16% de ácidos graxos linolênico (ômega-6), 57% de ácidos graxos alfa-linolênico (ômega-3), que corresponde à proporção de 1:3, sendo considerada a fonte mais importantes de ômega-6 e ômega-3 conhecida.<sup>20,21</sup> Dois efeitos terapêuticos da linhaça são importante para o tratamento da CCS: sua ação imunomoduladora e anti-inflamatória. Sua ação imunomoduladora dá-se pela inibição da interleucina-10 que inibe a interleucina-1 que inibe a produção e liberação de fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos.<sup>22,23</sup> Sua ação anti-inflamatória ocorre devido a formação de

mediadores eicosanóides não inflamatórios através do metabolismo do ômega-6 com a formação de prostaglandina 1 (PG1) e tromboxano A1 (TXA1) e do metabolismo do ômega-3 com a formação de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) e docosahexaenóico (DHA). Na medicina humana o uso de ômega-3 e ômega-6 oral têm sido utilizados como uma alternativa no tratamento de pacientes com síndrome de Sjögren's e KCS,<sup>22-25</sup> além do uso tópico dos ômegas 3 e 6 ter controlado com sucesso os sintomas inflamatórios em KCS experimentalmente induzida em ratos.<sup>26</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do colírio tacrolimus, potente imunossupressor utilizado no tratamento da CCS, com dois tipos de veículos oleosos, o óleo de amêndoas (OA) que já é utilizado como veículo do tacrolimus e o OSL, além do uso isolado de cada óleo, no tratamento da CCS induzida experimentalmente em coelhos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNOESTE (protocolo nº 165). Foram utilizados 25 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 individuais, com água e ração (Supra<sup>®</sup>) *ad libitum*.

O modelo de indução da CCS, em coelhos, foi baseado em estudos previamente publicados<sup>27,28</sup> com uso de sulfato de atropina colírio 1%, três vezes ao dia, até que se confirmasse o diagnóstico de CCS (TLS  $\leq$  5mm/min e/ou TRB positivo) e depois durante todo o período de tratamento (12 semanas), para manutenção da CCS (Fig. 1)

Os momentos de avaliação foram considerados como M0 (antes da indução de CCS), M1 (1 semana após o início da indução da CCS) e M2 até M12 (avaliações com intervalo de 1 semana após, o início do tratamento) (Fig. 1). Dos 25 coelhos, 20 foram induzidos para a CCS conforme o protocolo já descrito e 5 foram alocados no grupo controle, sem indução da CCS. Após uma semana do início da indução da CCS, os animais foram tratados, por 12 semanas da seguinte maneira: Grupo C (n=5): controle, 1 gota de placebo (solução de NaCl 0,9%), em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo TA (n=5): tacrolimus 0,03% dissolvido em AO, em forma de colírio (Laboratório Ophthalmos), 1 gota, em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo TL (n=5): tacrolimus 0,03% dissolvido em OSL, em forma de colírio (Laboratório Ophthalmos), 1 gota, em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo A (n=5): colírio a base de OA puro (Laboratório Ophthalmos), 1 gota, em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo L (n=5): colírio a base de OSL puro (Laboratório Ophthalmos), 1 gota, em ambos os olhos, 2 vezes ao dia.

O TLS foi realizado para avaliar a quantidade de lágrima produzida. 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  $\leq 5$ mm. O TF 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 e 2 = positivo para úlcera de córnea. O TRB foi realizado para a coloração de células desvitalizadas pela CCS. 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.<sup>5</sup>

A citologia esfoliativa (CE) foi realizada no M0, uma semana após, no M1, e, depois, uma vez por mês nos M4; M8 e M12. Os animais receberam colírio anestésico e então, foram

colhidas amostras de células da conjuntiva superior, inferior, lateral, medial e da córnea, de ambos os olhos. A coleta das células foi feita com uso de swab umedecido em solução fisiológica e transferidas para as lâminas microscópicas. Em seguida, as lâminas foram fixadas em álcool metílico e, posteriormente, coradas pela técnica de May-Grunwald-Giemsa (MGG), conforme o protocolo do laboratório de patologia veterinária da Unoeste. O tipo de célula e a celularidade foram os parâmetros observados na CE.<sup>29</sup>

Para análise histopatológica, ao final do experimento, no M12, foi realizada eutanásia dos coelhos, utilizando-se tiopental sódico a 2,5%, na dose de 200mg/kg, por via intravenosa, para obtenção de biópsia dos olhos. O bulbo ocular, após a enucleação, foi colocado em solução de formalina tamponada a 10%, por 24 a 48 horas. Em seguida, foram lavados em água corrente, por trinta minutos, e armazenados em álcool 70% e processados conforme a técnica de inclusão em parafina. Foram 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 Schiff (P.A.S.). Os parâmetros observados para córnea e conjuntiva foram: edema, degeneração celular, necrose, infiltrado inflamatório (neutrofílico, mononucleares e misto) e contagem de células caliciformes conjuntivais (conjuntiva bulbar), com objetiva de 40x num perímetro de 800 µm, utilizando um analisador de imagens com o software da Micrometrics® (SE Premium).<sup>30</sup>

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. Nos testes acima citados, os pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram validados respectivamente pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS v.13.0. Foi adotado o nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

O grupo C (controle) manteve os parâmetros normais durante todo período do experimento. No M1 os valores do TLS ficaram abaixo de 5mm/min, já no M2 todos os grupos apresentaram aumento estatisticamente significativo ( $P<0,05$ ) nos valores de TLS, principalmente o grupo L de M2 a M12 e grupo A e TA no M12. O Grupo A esteve a baixo dos valores do Grupo C nos momentos M6 e M7 (Fig. 2).

Apenas alguns animais do Grupo TL apresentaram úlceras de córnea no M1 e M2. Nos demais grupos não houve o desenvolvimento de úlceras até o final do experimento (M12) (Fig. 3). Todos os grupos apresentaram TRB positivo a partir do M2 nos resultados analisados do TRB. O grupo TA a partir do M4 não apresentava mais TRB positivo e o grupo TL a partir do M7 e os demais grupos a partir do M8 (Fig. 4).

Na análise dos resultados obtidos da CESO quanto ao tipo de célula a tabela 1 mostra no M1 que os grupos A e L apresentaram células superficiais (normal para este parâmetro) em todos os momentos, o grupo TL no M1 alguns animais apresentaram células parabasais (Figura 5A) e outros apresentaram células superficiais (Figura 5B), no M4 apresentaram somente células parabasais e a partir do M8 células superficiais, o grupo TA apresentou células parabasais nos M1 e M4 e células superficiais no M8 em diante. A presença de células caliciformes está apresentada na figura 5C no grupo TL.

Com relação à celularidade analisada na CESO no M1 os grupos A, L, TA tiveram valores de escores moderados e o grupo TL apresentou valor normal (escore leve) em todos os momentos. O grupo A e L retornou ao valor normal entre os M4 a M8, o grupo TA retornou ao valor normal entre os M1 a M4 (Tabela 1).

Nos achados histopatológicos da córnea os grupos A (Figura 6A) e L (Figura 6B) apresentaram edema moderado e degeneração leve, os grupos TL e TA alguns animais

apresentaram edema leves e outro moderados, o grupo TL apresentou degeneração leve, o grupo TA não apresentou degeneração e nenhum grupo apresentou necrose. Os grupos A e L não apresentaram processo inflamatório (Tabela 2), o grupo TL apresentou escore leve para o parâmetro células mistas do processo inflamatório e o grupo TA alguns animais apresentaram escore leve e outros escore moderado para este mesmo parâmetro.

Nos achados histopatológicos da conjuntiva (Tabela 2) os grupos A, TL e TA apresentaram edema moderado, o grupo L alguns animais apresentaram edema leves e outros moderados, o grupo A apresentou degeneração moderada, os grupos L e TL apresentaram degeneração leve e o grupo TA não apresentou degeneração, o grupo A apresentou necrose moderada, o grupo L apresentou necrose leve, o grupo TL alguns animais apresentaram necrose leve e outros não apresentaram necrose e os animais do grupo TA não apresentaram necrose. Para o parâmetro presença de células mista do processo inflamatório os grupos A e TA apresentaram escore leve, o grupo L apresentou escore moderado e o grupo TL apresentou escore acentuado. Em todos os grupos de tratamento foi observado um aumento estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) no número de células caliciformes.

## **DISCUSSÃO**

Os animais do grupo A apresentaram melhora gradativa respectivamente nos TLS, TF e TRB a partir da segunda semana de tratamento até o final do experimento. Isto pode ter ocorrido devido às propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do óleo de amêndoa.<sup>15,16</sup>

Os animais do grupo L também tiveram a mesma evolução na melhora dos sintomas da CCS começando na segunda semana até a nona semana, o que pode ser justificado pela concentração ideal em ômega 3 e 6 existente no OSL que possuem ação anti-inflamatória capaz de controlar os sintomas da KCS.<sup>20-26</sup> Estes resultados estão de acordo com um estudo

que utilizou uma formulação tópica contendo ômega-6 e ômega-3, em ratos experimentalmente induzidos para CCS, que apresentaram melhora dos sintomas inflamatórios da CCS,<sup>26</sup> e com outro estudo<sup>31</sup> que relata que a aplicação tópica de lipídeos derivados de ômega-3, como o ácido docosahexanóico (DHA) previnem complicações da CCS como erosão e úlceras de córnea.

Os grupos que utilizaram o tacrolimus, TA e TL, demonstraram melhora nos parâmetros de degeneração e necrose da córnea e conjuntiva, além de um aumento significativo no número de células caliciformes. Isto ocorre devido à sua ação imunossupressora, que minimiza os danos inflamatórios induzidos pela CCS na córnea, conjuntiva e células caliciformes.<sup>7,14</sup> A diminuição da quantidade de células caliciformes pode induzir deficiência de mucina no FLP e resultar em córneas secas com superfície irregular.<sup>32</sup>

Resumidamente, houve aumento significativo nos valores de TLS em todos os grupos de tratamento após a indução da CCS, apresentando um desempenho melhor o grupo L. Com relação aos parâmetros TF, houve resolução mais precoce das úlceras de córnea com os grupos A e L, enquanto no TRB o desempenho dos grupos foi similar. Os grupos TA e TL apresentaram menos edema e degeneração de córnea e conjuntiva. Houve um aumento significativo no número de células caliciformes em todos os grupos de tratamento, principalmente nos grupos TA e TL.

Podemos concluir que, no tratamento da CCS induzida em coelhos, o tacrolimus diluído em óleo de amêndoas e em óleo de linhaça foi mais eficiente na diminuição do edema e degeneração da córnea e conjuntiva e no aumento do número de células caliciformes, enquanto os óleos isoladamente foram mais eficientes em aumentar a produção aquosa lacrimal, principalmente o de linhaça, e na resolução mais precoce das úlceras de córnea. Desta maneira, este estudo revela que não somente o tacrolimus, com seu efeito imunossupressor, mas também os veículos oleosos utilizados para sua diluição, possivelmente

devido às suas propriedades anti-inflamatórias, são responsáveis na melhora dos sintomas do olho seco.

### **AGRADECIMENTOS**

À UNOESTE e à FAPESP, pelo apoio financeiro, e ao Laboratório Ophthalmos-SP, pela doação dos materiais necessários para a execução do experimento.



## REFERÊNCIAS

1. Miller PE. Lacrimal system. In: *Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4 th ed. (eds Maggs DJ, Miller PE, Ofri, R.) Saunders Elsevier, St. Louis, 2008:157–174.
2. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Archives of Ophthalmology* 2012; **130**:90–100.
3. Carter R, Colitz CMH. The causes, diagnosis, and treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Medicine* 2002; **97**:683–694
4. Gelatt KN. *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania, 1999.
5. Maggs DJ. Basic diagnostic techniques. In: *Slater's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4 th ed. (eds Maggs DJ, Miller PE, Ofri, R.) Saunders Elsevier, St. Louis, 2008:81–106.
6. Vaden SL. Cyclosporine and tacrolimus. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* 1997; **12**: 161–166.
7. 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**:225–232.
8. Tang-Liu DDS, Acheampong A. Ocular Pharmacokinetics and Safety of Ciclosporin, a Novel Topical Treatment for Dry Eye. *Clinical Pharmacokinetic*, 2005; **44**:247–261.
9. 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**:688–694.

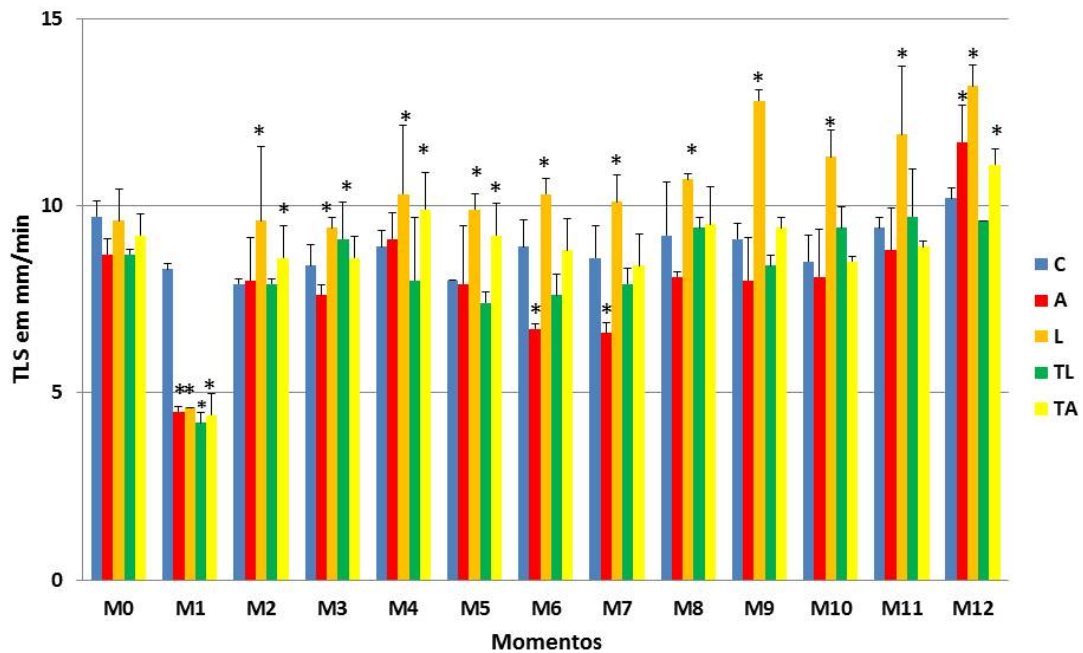
10. Nell B, Walde I, Billich A et al. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study. *Veterinary Ophthalmology* 2005; **8**:39–46.
11. Ofri R, Lambrou GN, Allgoewer I. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. *Veterinary Journal* 2009; **179**:70–7.
12. Hendrix DVH, Adkins EA, Ward DA. An investigation comparing the efficacy of topical ocular application of tacrolimus and cyclosporine in dogs. *Veterinary Medicine International* 2011; 487592.
13. Benitez del Castillo JM, del Aquila C, Duran S et al. Influence of topically applied cyclosporine A in olive oil on corneal epithelium permeability. *Cornea* 1994; **13**:136–140.
14. Tam PM, Young AL, Cheng LL et al. Topical 0.03% tacrolimus ointment in the management of ocular surface inflammation in chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**:957–958.
15. Ahmad Z. The uses and properties of almond oil. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2010; **16**:10–12.
16. Garrido I, Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Polyphenols and antioxidante properties of almond skins: influence of industrial processing. *Jornal of Food Science* 2008; **73**:106–115.
17. Davis PA, Iwahashi CK. Whole almonds and almond fractions reduce aberrant crypt foci in a rat model of colon carcinogenesis. *Cancer Letters* 2001; **165**:27–33.

18. Spiller GA, Jenkins DJ, Cragen LN et al. Effect of a high in monounsaturated fat from almonds on plasma cholesterol and lipoproteins. *Journal of American College of Nutrition* 1992; **11**:126–130.
19. Sultana Y, Kohli K, Athar M, Khar RK, Aqil M. Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. *Journal of Comestic Dermatology* 2007; **6**:14–19.
20. Oomah BD. Flaxseed as functional source. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2001; **81**: 889–894.
21. Hassan-Zadeh A, Sahari MA, Barzegar M. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2008; **59**:526–534.
22. Barabino S, Rolando M, Camicione P, Ravera G, Zanardi S, Giuffrida S, Calabria G. Systemic linoleic and g-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea* 2003; **22**:97-101.
23. Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010; **33**:49–54.
24. 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**:308–314.
25. Sullivan B, Cermak J, Sullivan R *et al.* Correlation between nutrient intake and the polar lipid profiles of meibomian gland secretions in women with Sjögren’s syndrome. *Advances Experimental Medicine Biology* 2002; **506**:441–447.

26. Rashid S, Jin Y, Ecoiffer T, Barabino S, Schaumberg DA, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Archives of Ophthalmology* 2008; **126**:210–225.
27. Burgalassi S, Panichi L, Chetoni P, Saettone MF, Boldrini E. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Research* 1999; **31**:229–235.
28. El-Shazly AHM, El-Gohary AA, El-Shazly LHM et al. Comparison between two cyclooxygenase inhibitors in an experimental dry eye model in albino rabbits. *Acta Pharmacology* 2008; **58**:163–173.
29. Raskin RE, Meyer DJ Atlas of canine and feline cytology. WB Saunders:Philadelphia, 2001.
30. Samuelson DA. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier:St. Louis, 2007.
31. Jiucheng H, Bazan HEP. Omega-3 fatty acids in dry eye and corneal nerve regeneration after refractive surgery. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; **82**: 319–325.
32. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucin (Review). *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**:71–77.

<b>Delineamento Experimental</b>						
	← Sulfato de atropina colírio a 1% TID →					
M0	Indução da KCS	Diagnóstico da KCS	M1	M1 – M12	M0 M1 M4 M8 M12	M12
TLS TF TRB	Sulfato de atropina colírio a 1% TID	TLS ≤ 5 mm/min e/ou TRB positivo	Uma semana após o diagnóstico da KCS e começo do tratamento	TLS TF TRB	Citologia	Histopatológico

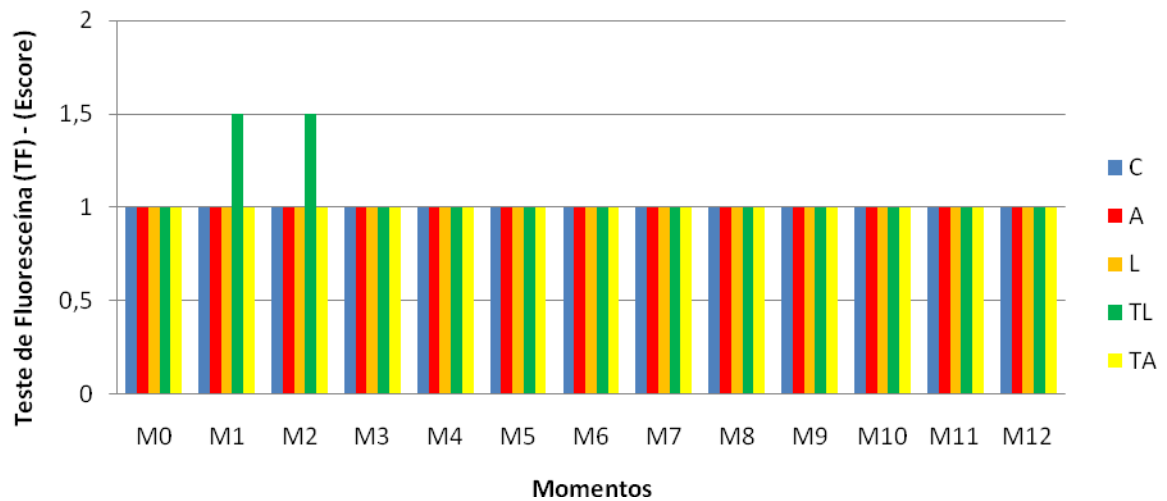
**Figura 1.** Delineamento Experimental.



**Figura 2.** Médias e desvios padrões dos valores obtidos do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) em mm/min dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL).

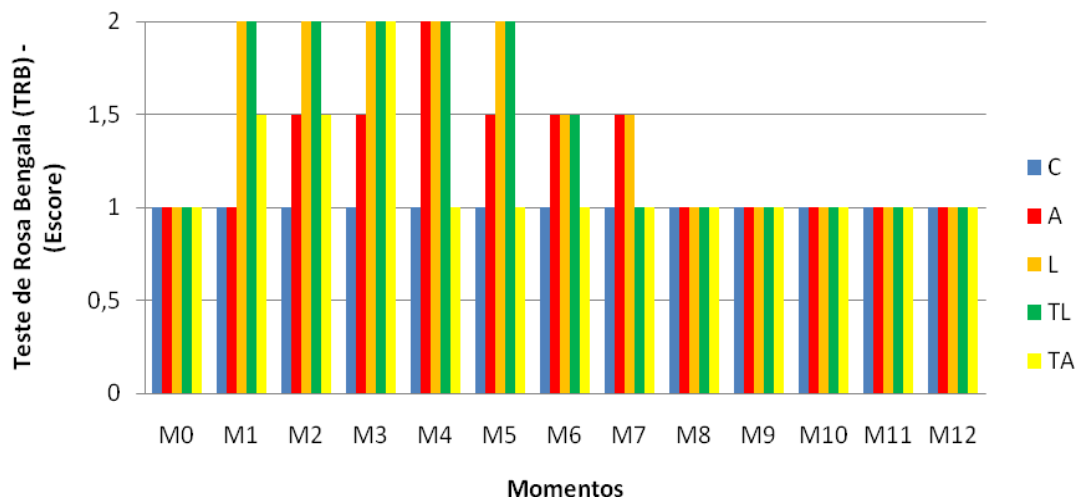
valores  $\leq 5$  mm/min=positivo para CCS.

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



**Figura 3.** Medianas e percentis dos valores obtidos\* do teste de fluoresceína (TF) dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL).

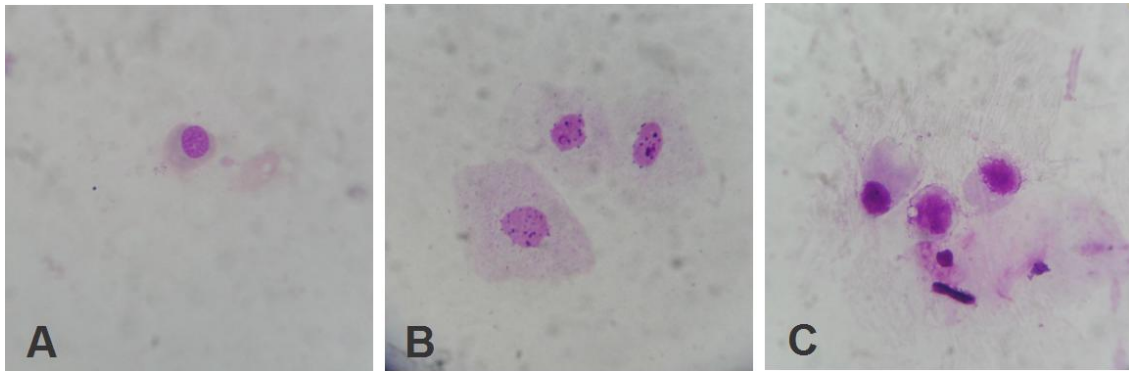
\*1=negativo (ausência de úlcera de córnea em todos animais do grupo) e 2=positivo (presença de úlcera de córnea em todos animais do grupo).



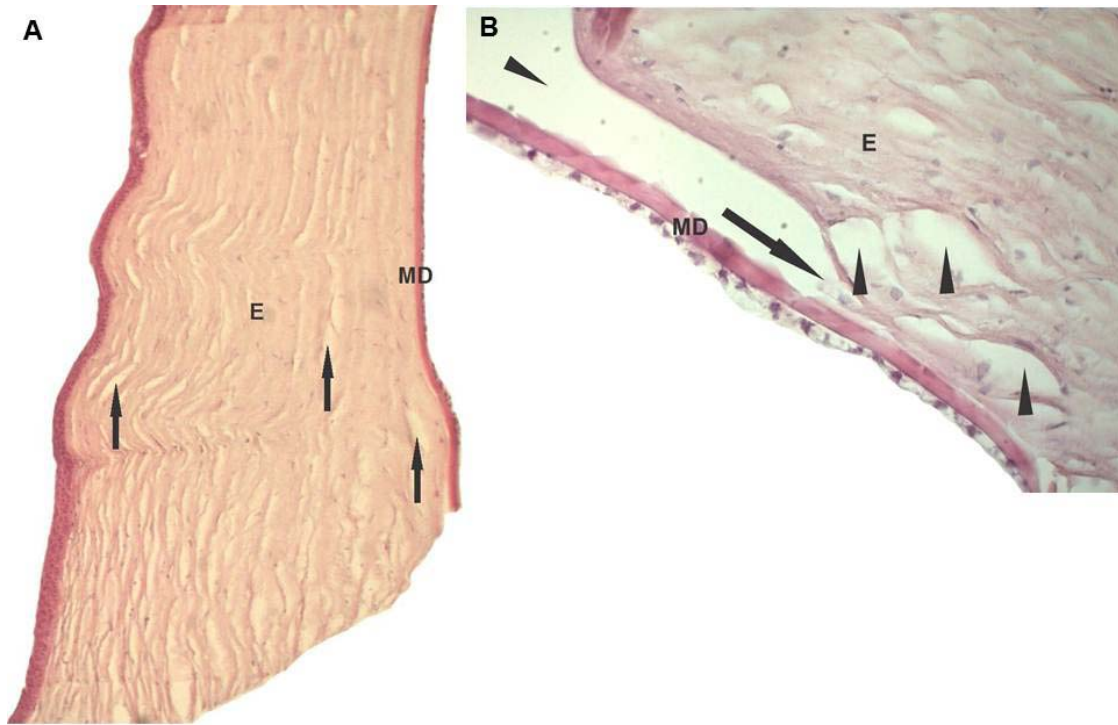
**Figura 4.** Medianas e percentis dos valores obtidos\* do teste de Rosa Bengala (TRB) dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL).

\*1=negativo (ausência de células coradas desvitalizadas pela CCS em todos os animais do grupo) e 2=positivo (presença de células coradas desvitalizadas pela CCS em todos os animais do grupo).





**Figura 5.** Fotomicrografia de citologia esfoliativa da superfície ocular (CESO) da conjuntiva de coelho. (A) coelho n. 1 do grupo TL no M1 presença de células parabasais, (B) coelho n. 1 do grupo TL no M1 presença de células superficiais e (C) coelho n. 1 do grupo TL no M3 presença de células caliciformes – May-Grunwald-Giemsa (MGG) 400x.



**Figura 6.** (A) Foto micrografia olho direito (OD) de córnea do coelho n. 3 do grupo A no M12, com processo inflamatório leve e edema moderado (seta), membrana de Descemet (MD), estroma (E) – Hematoxilina-Eosina (H.E.) 100x. (B) Foto de micrografia olho direito (OD) de córnea do coelho n. 2 do grupo L no M12, evidenciando a separação da membrana de Descemet ao estroma (seta), devido ao edema moderado (cabeça de seta) – Hematoxilina-Eosina (H.E.) 400x.

**Tabela 1.** Medianas e percentis dos valores obtidos na citologia esfoliativa (CE) referente aos parâmetros de tipo de célula\* e celularidade\*\* dos olhos em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL).

Momentos	Grupos									
	Tipo de Célula*					Celularidade**				
	C	A	L	TL	TA	C	A	L	TL	TA
M0	3(2;3)	3(2;3)	3(2;3)	3(2;3)	3(2;3)	1(1;2)	1(1;3)	1(1;2)	1(1;3)	1(1;3)
M1	3(2;3)	3(3;3)	3(2;3)	2,5(3;3)	2(2;3)	1(1;3)	2(1;3)	2(1;2)	1(1;3)	2(1;3)
M4	3(2;3)	3(3;3)	3(3;3)	2(2;3)	2(2;3)	1(1;1)	2(1;3)	1,5(1;2)	1(1;3)	1(1;3)
M8	3(2;3)	3(3;3)	3(3;3)	3(3;3)	3(2;3)	1(1;1)	1(1;3)	1(1;2)	1(1;1)	1(1;2)
M12	3(2;3)	3(3;3)	3(3;3)	3(3;3)	3(2;3)	1(1;2)	1(1;2)	1(1;3)	1(1;1)	1(1;3)

\*Tipo de célula: 1 = basal; 2= parabasal; 3= superficial.

\*\*Celularidade: 1 = leve (1 a 3 células por campo); 2= moderada (4 a 6 células por campo); 3= acentuada (>7 células por campo).

**Tabela 2.** Medianas e percentis dos valores obtidos\* na histopatologia da córnea e conjuntiva referente aos parâmetros edema, degeneração, necrose e células inflamatórias, e médias e desvio padrão do número de células calciformes, em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C); óleo de amêndoa puro (grupo A); óleo de semente de linhaça puro (grupo L); tacrolimus 0,03% dissolvido em óleo de amêndoa (grupo TA) ou em óleo de semente de linhaça (grupo TL).

Córnea								
Momento	Grupo	Parâmetros*						
		Edema	Degeneração	Necrose	Inflamação**			
					Neutrófilo	Mononucleares	Misto	
	C	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	A	2 (1;3)	1 (0;2)	0 (0;2)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;1)
M12	L	2 (1;3)	1 (0;1)	0 (0;1)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;2)
	TL	1,5 (0;3)	1 (0;3)	0 (0;3)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	1,5 (0;3)
	TA	1,5 (1;3)	0 (0;1)	0 (0;1)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	1,0 (0;2)

Conjuntiva***								
Momento	Grupo	Parâmetros*						
		Edema	Degeneração	Necrose	N° cel. calciformes <sup>(1)</sup>	Inflamação**		
						Neutrófilo	Mononucleares	Misto
	C	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	9,8±1,9 <sup>a</sup>	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	A	2 (2;3)	2 (1;3)	2 (0;2)	11,4±4,3 <sup>b</sup>	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (1;3)
M12	L	1,5 (1;3)	1 (0;1)	1 (0;1)	11,9±2,3 <sup>b</sup>	0 (0;0)	0 (0;0)	2 (1;2)
	TL	2 (2;3)	1 (0;1)	0,5 (0;3)	12,4±2,7 <sup>b</sup>	0 (0;0)	0 (0;0)	3 (1;3)
	TA	2 (1;2)	0 (0;2)	0 (0;1)	12,6±3,9 <sup>b</sup>	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (1;2)

\* (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) acentuado.

\*\* Inflamação predomina na inserção da córnea com a conjuntiva bulbar.

\*\*\* Análise da conjuntiva bulbar.

<sup>(1)</sup> Contagem de células calciformes em 800 micrometros.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa (\* $P < 0.05$ /Teste de Tukey)

**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.