

**COMPARAÇÃO DA CICLOSPORINA 1% DISSOLVIDA EM ÓLEO DE OLIVA E
DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
SECA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM COELHOS**

LETÍCIA RODRIGUES PARRILHA

**COMPARAÇÃO DA CICLOSPORINA 1% DISSOLVIDA EM ÓLEO DE OLIVA E
DE SEMENTE DE LINHAÇA NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
SECA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS**

LETÍCIA RODRIGUES PARRILHA

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.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Maria Caldeira Franco Andrade

636.932 2 Parrilha, Letícia.
P261c Comparação da Ciclosporina 1% colírio dissolvida em óleo de oliva e de semente de linhaça no tratamento da ceratoconjuntivite seca induzida experimentalmente em coelhos / Letícia Rodrigues Parrilha. – Presidente Prudente, 2013.
(63)f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2013.

Bibliografia.
Orientadora: Silvia Maria Caldeira Franco Andrade.

1. Ceratoconjuntivite seca. 2. Coelhos. 3. Óleo de oliva. 4. Óleo de linhaça. 5. Ciclosporina. I. Título.

LETÍCIA RODRIGUES PARRILHA

**COMPARAÇÃO DA CICLOSPORINA 1% DILUÍDA EM ÓLEO DE OLIVA E DE
SEMENTE DE LINHAÇA, NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
SECA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS**

Dissertação de Mestrado 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.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 28 de Março de 2013

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cleide e Francisco, por todo amor, carinho, companheirismo, e principalmente, por sempre realizarem seus sonhos através dos meus. Com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela proteção e por iluminar todos os dias da minha vida, principalmente para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Cleide e Francisco, pelo apoio e dedicação que sempre tiveram comigo, por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma deixei de acreditar, pelo amor incondicional, preocupação e cuidado.

Agradeço ao meu noivo Alexandre, pelo seu amor e compreensão nos muitos momentos que me fiz ausente para a realização deste trabalho.

Agradeço, em especial minha orientadora, Silvia Franco Andrade, pela dedicação constante, por estar sempre disposta a me ajudar nas minhas dificuldades, pela confiança e carinho, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Agradeço aos meus colegas de experimento, Danielle, Marielle, Miriely, Andressa, Letícia, Ricardo e em especial ao Rafael, pela grandiosa ajuda em todos os momentos, pelo carinho e prontidão em se disponibilizar para me ajudar.

Agradeço ao funcionário do Biotério, Sidimar, pela ajuda e dedicação durante todo o período do experimento, e principalmente pelo carinho com que cuida dos nossos preciosos animais.

Agradeço a minha amiga Juliana Dalarossa Amatuzzi Von Ha, por toda sua amizade, carinho e prontidão em sempre me ajudar, minha eterna amizade e carinho.

Por fim agradeço, aos animais, aqueles que deram sua vida para a pesquisa, meu muito obrigada!

*“Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsa,
modificas tudo aquilo que te rodeia a existência.
Teus pensamentos e tuas vontades,
são as chaves dos teus atos e atitudes....
São as fontes da atração e repulsão
na tua jornada vivência”
(Chico Xavier)*

RESUMO

Comparação da ciclosporina 1% dissolvida em óleo de oliva e de semente de linhaça no tratamento da ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso tópico do colírio de ciclosporina 1% diluída em dois veículos, óleo de oliva e de semente de linhaça e dos óleos isoladamente, no tratamento de ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida experimentalmente em coelhos. Foram utilizados vinte e cinco coelhos machos adultos brancos da raça Nova Zelândia alocados aleatoriamente em 5 grupos: Grupo C (controle), Grupo CO (ciclosporina 1% em óleo de oliva), Grupo CL (ciclosporina 1% em óleo de linhaça), Grupo O (óleo de oliva), Grupo L (óleo de linhaça), sendo avaliados pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF), Teste de Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), Teste de Rosa Bengala (TRB), citologia ocular e ao final do experimento foram eutanasiados para análise histopatológica da córnea e conjuntiva. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo nos valores de TLS em todos os grupos de tratamento após a indução da CCS, apresentando melhor desempenho o grupo CL. Com relação ao TF, houve resolução mais precoce das úlceras de córnea nos grupos O e L. Para o TRB, o grupo O foi que apresentou pior desempenho. Os grupos L e CL apresentaram menos edema e congestão de córnea. Houve aumento significativo no número de células caliciformes em todos os grupos de tratamento, principalmente no grupo CL. A ciclosporina foi eficiente no tratamento da CCS tanto diluída em óleo de linhaça quanto em óleo de oliva, porém com o óleo de linhaça mostrou melhor eficácia, associada ou não, quando comparada ao óleo oliva.

Palavras-chave: Ceratoconjuntivite seca, coelhos, óleo de oliva, óleo de linhaça, ciclosporina

ABSTRACT

Comparison of the 1% cyclosporin eye drops dissolved in olive oil and linseed in the treatment of keratoconjunctivitis sicca experimentally induced in rabbits

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of topical 1% cyclosporine eye drops diluted in two vehicles, olive and the linseed seed oil and the oils separately in treating experimentally induced keratoconjunctivitis sicca (KCS) in rabbits. Twenty-five male New Zealand white rabbits were aleatory allocated in 3 groups: Group C (Control), Group CO (1% cyclosporine in olive oil), Group CL (1% cyclosporine in linseed oil), Group O (olive oil), Group L (linseed oil), being evaluated by Schirmer's Tear Test (STT), Fluorescein Test (FT), Tear Film Break-Up Time Test (TFBUT) and Rose Bengal Test (RBT), ocular cytology, and at the end of the experiment the rabbits were euthanized for histopathological analysis of cornea and conjunctive. The results demonstrated that there was significant increase in the values of STT in all the treated groups after the induction of KCS, presenting better acting the group CL. Regarding FT, there was a more rapid resolution of corneal ulcers in the groups O and L. For RBT, the group O was that it presented worse acting. The groups L and CL presented less edema and cornea congestion. There was significant increase in the number of calciform cells in all of the treated groups, mainly in the group CL. The cyclosporine was efficient in the CCS treatment, diluted in linseed oil as in olive oil, however the linseed oil presented better effectiveness, associated or no, when compared to the oil olive.

Keywords: keratoconjunctivitis sicca, rabbits, olive oil, linseed oil, cyclosporine

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS – Ceratoconjuntivite Seca
TLS – Teste Lacrimal de Schirmer
TFV – Teste do Fenol Vermelho
TRB – Teste Rosa Bengala
TLV – Teste de Lisamina Verde
TF – Teste de Fluoresceína
TRFL – Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal
AGE – Ácidos Graxos Essenciais
 ω -3 – Ômega 3
 ω -6 – Ômega 6
FPL – Filme Lacrimal Pré-corneal
SS – Síndrome de Sjögren
CsA – Ciclosporina
 α – alfa
 γ – interferon

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Camadas da Córnea	19
FIGURA 2 -	Sinais Clínicos da CCS, demonstrados em cão da raça York Shire, com presença de secreção mucopurulenta	23
FIGURA 3 -	Teste Lacrimal de Schirmer, realizado em coelho	25
FIGURA 4 -	Teste de Rosa Bengala, realizado em coelho	27
FIGURA 5	Teste de Fluoresceína. Realizado em coelho	27
FIGURA 6	Teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal	28
FIGURA 7	Exame Citologia Esfoliativa, realizada em coelho	29
FIGURA 8	Estrutura molecular da ciclosporina	31
FIGURA 9	Mecanismo de ação da ciclosporina	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Anatomia e Fisiologia do sistema ocular	15
2.1.1 Sistema ocular do coelho	15
2.1.2 Filme lacrimal pré-corneal	17
2.2 Ceratoconjuntivite Seca.....	19
2.2.1 Classificação da disfunção lacrimal.....	20
2.2.2 Sinais clínicos.....	21
2.2.3. Diagnóstico.....	22
2.2.4 Tratamento	29
2.3 Ciclosporina.....	30
2.4 Óleo de Semente de Linhaça	32
2.5 Óleo de Oliva.....	34
REFERÊNCIAS.....	37
3 ARTIGO CIENTÍFICO	44
ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	76

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), também denominada de olho seco, é uma enfermidade que se caracteriza por uma inflamação crônica das glândulas lacrimais, córnea e conjuntiva, que decorre de alterações qualitativas com deficiência aquosa do filme lacrimal e/ou quantitativas com evaporação excessiva da lágrima, predominantemente associada à disfunção das glândulas de meibômio ou deficiência de mucina do filme lacrimal pré-corneal, levando a um comprometimento no deslizamento das pálpebras sobre os olhos, tornando-se assim a função de proteção da lágrima deficiente ou nula, afetando estruturas da córnea e conjuntiva, induzindo a infecções secundárias, e podendo evoluir para destruição tecidual e cegueira (PINHEIRO JR. et al., 2007; HERRERA, 2008).

A diminuição da produção lacrimal pode ser causada por diversos fatores, dentre eles podem ser citadas as causas congênicas, agenesia ou hipoplasia da glândula lacrimal (HERRERA, 2008), ou ainda etiologias como: predisposição racial, hipotireoidismo, doenças autoimunes, paralisia do nervo facial, medicamentos, excisão cirúrgica da glândula da terceira pálpebra, dentre outras. (MILLER, 2008).

Os sinais clínicos da ceratoconjuntivite seca variam de acordo com tempo decorrido do surgimento da afecção e principalmente da extensão do ressecamento corneal, podendo estar presente desconforto ocular, fotofobia, blefaroespasma, secreção ocular mucopurulenta, hiperemia conjuntival crônica, vascularização corneal, úlceras de córnea e ceratites pigmentar (KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

Os testes específicos para diagnóstico da CCS são: Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste do Fenol Vermelho (TFV), Teste de Rosa Bengala (TRB) e Teste de Lisamina Verde (TLV) (MAGGS, 2008). Os mais utilizados na Veterinária são o TLS e o TRB (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Além disso, o Teste de Fluoresceína (TF) é importante para detectar úlceras de córnea induzidas pela CCS, além do Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL - *break up time* - BUT) que avalia a qualidade do filme lacrimal (MAGGS, 2008).

Muitas pesquisas foram descritas sobre a indução experimental de ceratoconjuntivite seca em coelhos, dentre elas, o uso de atropina colírio e a excisão da glândula lacrimal e membrana nictante (GOMES et al,1994). Barabino e Dana (2004) descreveram um modelo em coelhos mostrando que o uso do colírio de atropina 1% reduz significativamente a secreção de lágrima em dois dias, e que induz defeitos no epitélio corneal em três dias. Bursalassi et al (1999) e El-Shazly et al. (2008) induziram CCS em coelhos com a instilação de colírio de atropina 1% três vezes ao dia.

O tratamento da ceratoconjuntivite seca pode ser realizado de forma medicamentosa ou cirúrgica, sendo a medicamentosa a mais rotineiramente utilizada (SLATTER, 2005). O tratamento medicamentoso consiste principalmente na substituição da lágrima faltante com soluções lubrificantes, sendo ideais as soluções viscosas, pois se ligam ao epitélio e estabilizam a película lacrimal pré-corneal e impede sua ruptura, e o uso de imunossupressores como a ciclosporina A, o tacrolimus e o pimecrolimus. Como auxiliares no tratamento são também utilizados colírios a base de antibióticos, corticoideterapia (se não houver úlceras), parassimpatomiméticos como a pilocarpina, mucolíticos como a acetilcisteína, isolados ou associados (IZCI et al., 2002; BERDOULAY; ENGLISH; NADELSTEIN, 2005; MILLER, 2008; HERRERA, 2008; ANDRADE, 2008).

Assim como o uso de imunossupressores, ciclosporina e tacrolimus, outra forma de tratamento para a CCS que vem se destacando em estudos recentes é a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega 3 (ω -3) e ômega 6 (ω -6), como o óleo de linhaça, principalmente no tratamento de pacientes portadores de diversas formas de deficiência lacrimal, como na Síndrome de Sjögren humana, tanto em suplementação oral (RONCONE; BARTLETT; EPERJESI, 2010), como em experimentos por via tópica em ratos (RASHID et al., 2008) e por via tópica e oral em coelhos (NEVES et al., 2013).

Os óleos de origem vegetal, além de serem fonte de ácidos graxos essenciais ômega 3 e 6, e desta maneira, serem importantes no tratamento de processos inflamatórios e em doença autoimunes (VIJAIMOHAN et al., 2006; HARBIGE et al., 2008), também são ricos em vitaminas, minerais entre outras substâncias e têm grande aplicação em preparações tópicas farmacêuticas e cosméticas, injetáveis oleosos, colírios oleosos e como

solventes, como por exemplo, os óleos de oliva, soja, milho, girassol, linhaça, amêndoas, semente de uva e macadâmia (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do colírio ciclosporina 1%, potente imunossupressor utilizado no tratamento da CCS, diluído em dois tipos de veículos, o óleo de oliva, que já é utilizado como veículo da ciclosporina, e o óleo de linhaça, além do uso isolado de cada óleo, no tratamento da CCS induzida experimentalmente em coelhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anatomia e Fisiologia do Sistema Ocular

2.1.1 Sistema ocular do coelho

Há muitos anos o coelho vem sendo utilizado como modelo experimental em oftalmologia (WILLIAMS, 2007).

O globo ocular do coelho é relativamente grande comparado ao tamanho do animal. Sua forma difere da forma do olho humano, parecendo achatado no sentido ântero-posterior. No coelho adulto, o diâmetro ântero-posterior do globo ocular mede cerca de 17 mm. A córnea é proeminente e larga, a esclera varia consideravelmente de espessura nas diferentes partes do olho, sendo mais espessa na região do corpo ciliar afunilando posteriormente. O nervo óptico entra no olho acima do pólo posterior, em um plano horizontal que corta o eixo vertical do olho na junção do terço médio com o terço superior (DAVIS, 1929).

A transição entre o epitélio da pele e da conjuntiva, acontece além da margem tarsal, mais próximo a parte interna do olho, quando comparado ao homem. A membrana nictante ou terceira pálpebra, esta localizada na região do canto medial do olho, assemelhando-se aos cães. A conjuntiva é uma membrana mucosa que reveste a porção anterior do bulbo ocular, é lubrificada pela lágrima, e é bastante vascularizada, este epitélio age como barreira protetora física e imunológica. Todo esse tecido é recoberto por muco, produzido por células caliciformes e células epiteliais superficiais não caliciformes da córnea e conjuntiva, que atuam 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 infra orbital, glândula superficial da terceira pálpebra, e glândula profunda da terceira pálpebra (HOLMBERG, 2008), sendo estas responsáveis pela produção da camada aquosa da lágrima (GELATT, 1999; MILLER, 2008).

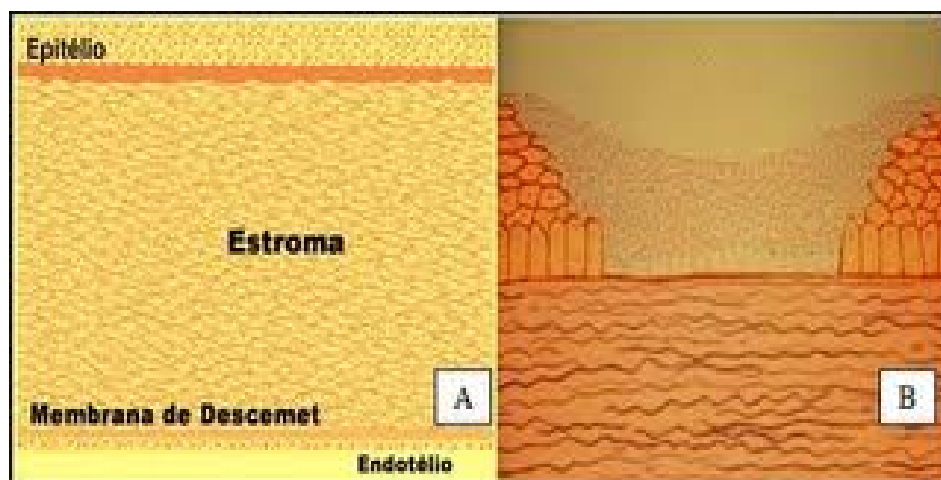
As pálpebras possuem um complexo formado pelas glândulas de meibômio (tarsais), que são responsáveis pela secreção sebácea, com grande quantidade de secreção de lipídeos. Além disso, possuem as glândulas de Zeiss (sebáceas) e Moll (sudoríparas), presentes na base dos cílios,

responsáveis pela secreção oleosa e viscosa, revestindo a córnea e as glândulas acessórias responsáveis pela secreção lacrimal, colaborando com o filme lacrimal (DAVIS, 1929; DEFANTE JUNIOR, 2006).

A córnea possui forma elíptica, é proeminente e larga. É a parte anterior e transparente da túnica externa do olho. Sua transparência e o alto poder de refração estão relacionados a ausência de vasos sanguíneos e linfáticos, a forma como as fibras colágenas do estroma estão dispostas, fibras nervosas e epitélio não queratinizado, e a maneira como suas camadas são organizadas (DAVIS, 1929; GARDNER, 1988; BARBOSA, 2007). É formada basicamente por cinco estruturas: epitélio, membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio, recoberta por um epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado, composto por seis camadas, sendo que a camada mais profunda encontra-se em contato direto com a membrana basal e esta por sua vez com o estroma, formada por células cilíndricas que são bastante semelhantes ao do homem. Nos coelhos as células basais do epitélio próximo ao limbo apresentam pigmentos escuros que cercam a córnea, servindo de borda anatômica (DAVIS, 1929).

No coelho, da mesma maneira que nos cães, a membrana de Descemet, é rija e densa, proporcionando resistência e elasticidade, não apresentando capacidade de regeneração quando exposta à lesões (DAVIS, 1929; BARBOSA, 2007; CAVALLET, 2007). O endotélio é formado por uma única camada de células poligonais, apresentando baixa capacidade de regeneração, e responsáveis pelo bombeamento contínuo da água para o tecido, colaborando, assim com a transparência e hidratação da córnea, além disso, participa ativamente na secreção da membrana de Descemet (DAVIS, 1929; CAVALLET, 2007).

Figura 1 - (A) Desenho esquemático das camadas histológicas da córnea. (B) Úlcera corneana atingindo a camada estromal.



Fonte: ÚLCERAS... (1999).

2.1.2 Filme lacrimal pré-corneal

A lágrima, também denominada de Filme Lacrimal Pré-corneal (FPL), segundo Herrera (2008); recobre a superfície ocular, promovendo uma visão adequada, além de contribuir para a proteção de agentes que eventualmente possam entrar em contato com a superfície ocular (CAVALLET, 2007; BARBOSA, 2007).

As glândulas lacrimais são responsáveis pela produção da maior parte da lágrima. Histologicamente as glândulas lacrimais são similares às glândulas serossalivares. O aparelho lacrimal é formado por uma parte secretora, que é constituída pelas glândulas lacrimais e glândulas acessórias, e outra excretora formada pelo sistema de drenagem lacrimal. A porção secretora do aparelho lacrimal inclui a glândula lacrimal principal, a glândula da terceira pálpebra e as glândulas acessórias que não são visíveis macroscopicamente. A glândula lacrimal é a fonte primária de formação serosa lacrimal que umedece, lubrifica e protege a superfície dos olhos, onde esta localizada na região da órbita entre bulbo medialmente e o ligamento orbital, e processo zigomático do osso frontal temporalmente. A glândula de terceira pálpebra é a glândula lacrimal acessória que secreta a capa lipídica externa, e a camada mucopolissacarídea parte interna da película lacrimal ocorre pela

glândula tarsal e células caliciformes da conjuntiva, impedindo a evaporação da lágrima, encontra-se localizada circundando a haste da cartilagem da terceira pálpebra (SLATTER, 1998; SLATTER, 2001).

A partir da lágrima é que se forma o filme lacrimal, que nada mais é do que uma fina película que recobre os olhos, lubrificando e protegendo-os. Além disso, o filme lacrimal também leva nutriente e oxigênio para células da córnea (KLEINNER, 2006).

O filme lacrimal pré-corneal recobre a córnea e a conjuntiva, e é formado por três camadas: aquosa, lipídica e mucosa, sendo que a camada lipídica é a mais externa, seguida pela camada aquosa e internamente a camada mucosa (CRISPIN, 2002; KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008). A lágrima é de suma importância para a manutenção de uma superfície ocular saudável, suas principais funções incluem: suprimento primário de oxigênio para a córnea, esta por sua vez é avascular, lubrificação entre as pálpebras e a superfície ocular, suprimento de proteínas antimicrobianas e remoção de debris e células esfoliativas através de drenagem (GELATT, 2003). O pH médio do filme lacrimal pré-corneal nos cães varia entre 6,8 a 8,0, com uma média em torno de 7,5, considerando-se assim um pH neutro (CRISPIN, 2002).

A camada lipídica é formada pela secreção de glândulas tarsais ou meibomianas, que são consideradas glândulas sebáceas modificadas, e secretam por sua vez materiais oleosos e fosfolipídios. Essas glândulas são altamente desenvolvidas nos cães, podendo estar presente entre 20 a 40 dessas glândulas por pálpebra (SLATTER, 2005; GIULIANO; MOORE, 2007; COLITZ, 2008). A compressão das pálpebras no ato de piscar, contribui para a liberação da secreção glândulas de meibômio, porém o mecanismo neural e hormonal exato que regula a liberação da porção lipídica da lágrima ainda não está bem esclarecido (GIULIANO; MOORE, 2007). Sua principal função consiste na redução da perda da evaporação da porção aquosa da lágrima, aumentando a estabilidade do filme lacrimal, e promovendo a distribuição homogênea da lágrima sobre a córnea (COLITZ, 2008).

Davidson e Kuonen (2004) e Lima (2008), relataram que a disfunção das glândulas de Meibômio, pode levar a instabilidade do filme pré-lacrimal, levando ao comprometimento no deslizamento das pálpebras sobre a

córnea, além disso, verificaram que a remoção da camada lipídica leva a evaporação do filme lacrimal, conseqüentemente, predispondo a um retardo na ruptura do filme lacrimal, predispondo ao desenvolvimento do olho seco.

A porção aquosa da lágrima é secretada pela glândula lacrimal principal e pela glândula da terceira pálpebra, sendo composta por 98,2% de água e 1,8 de sólidos, em sua maioria de proteínas (GELATT, 2003; COLITZ, 2008). A porção aquosa da lágrima supre quase todas as necessidades metabólicas da córnea, pela suplementação de imunoglobulinas, lactoferrinas, lisozimas, glicose, eletrólitos, oxigênio e água. Além disso, a porção aquosa também lubrifica a córnea, conjuntiva e terceira pálpebra (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

A camada mucosa, a mais interna, é formada pela secreção das células caliciformes da conjuntiva (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008), é composta por mucina, imunoglobulinas, uréia, sais, glicose, leucócitos, debris celulares e enzimas (GIULIANO; MOORE, 2007). Sua principal função é auxiliar na manutenção de uma superfície ocular lisa, além de lubrificar a córnea e conjuntiva (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

2.2 Ceratoconjuntivite Seca

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou doença do olho seco, caracteriza-se pela diminuição da quantidade e da qualidade, bem como da estabilidade do filme pré-lacrimal (FLP), levando a um comprometimento no deslizamento das pálpebras sobre a superfície ocular, sendo que na maioria dos casos há apenas um controle dos sintomas, e não uma cura definitiva (PINHEIRO JR. et al., 2007; HERRERA, 2008).

Trata-se de uma enfermidade que afeta tanto seres humanos como animais, em cães de pequeno porte, apresenta incidência de 1%, sendo as raças mais acometidas: Lhasa Apso, Pequês, Bulldog Inglês, Cocker Spaniel, Pug, Schnauzer miniatura e Yorkshire Terrier (CAVALLET, 2007; HERRERA, 2008).

Em humanos, o olho seco faz parte do conjunto de sinais e sintomas da Síndrome de Sjögren (SS), caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica e autoimune que acomete as glândulas exócrinas

(lacrimal, salivar, pâncreas, sudoríparas, mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e urogenital (GOMES et al., 1994).

2.2.1 Classificação da disfunção lacrimal

O olho seco pode ocorrer por consequência de deficiência lacrimal, ou por aumento na perda da lágrima por evaporação, ou ainda, por uma combinação desses dois fatores. A perda lacrimal por evaporação, é frequentemente relacionada a disfunção das glândulas meibomianas, podendo ser causada também por uma anormalidade estrutural ou funcional das pálpebras. A disfunção das glândulas de Meibômio é uma importante causa da perda evaporativa do filme pré-lacrimal, sendo que a perda resultante da camada oleosa permite a dispersão prematura da porção aquosa da lágrima (CRISPIN, 2002; GELATT, 2003).

O desenvolvimento de pálpebras defeituosas pode afetar o número e a distribuição das glândulas meibomianas. Uma deficiência na porção mucosa da lágrima, também pode acarretar em perda lacrimal por evaporação, e é vista mais comumente como uma consequência de uma conjuntivite crônica em associação com ceratoconjuntivite seca. A produção insuficiente da mucina pré-ocular também resulta na perda da estabilidade do filme pré-lacrimal, com consequente ressecamento corneano (CRISPIN, 2002; GELATT, 2003). Já a deficiência na porção aquosa da lágrima, resulta de uma ausência ou redução das secreções lacrimais, podendo resultar de uma única doença ou de uma combinação de condições, podendo afetar tanto a glândula lacrimal orbitária quanto a glândula da terceira pálpebra (GELATT, 2003).

A redução da porção lacrimal pode acontecer por diversos fatores, levando a um ressecamento da córnea e conjuntiva, dentre eles, causas infecciosas, blefarconjuntivite crônica, fármacos como: terapias a base de sulfonamidas, uso indevido ou prolongado, de atropina, hereditariedade, como a hipoplasia acinar, iatrogênica como a remoção da glândula da terceira pálpebra, endocrinopatias como hipotireoidismo e diabetes mellitus, além de doenças orbitais traumáticas ou infecciosas (LIMA, 2008).

2.2.2 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da CCS variam de acordo com o tempo do surgimento da afecção e principalmente da extensão do ressecamento corneano, podendo estar presente secreção mucóide a purulenta (Figura 2), desconforto ocular, blefaroespasma, hiperemia conjuntival crônica, vascularização corneal, úlceras de córnea e ceratites pigmentar, que levam a cegueira (KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Assim como outras doenças oculares, o olho seco causa desconforto ao paciente e fotofobia (KOCH; SYKES, 2002).

Figura 2 - Sinais clínicos, em cão da raça Lhasa Apso, com presença de secreção mucopurulenta



Fonte: ANDRADE (2010).

Uma forma de CCS bastante aguda e severa pode ser vista algumas vezes, na qual o olho se torna agudamente doloroso, podendo ou não estar associado com ulcerações, nestes casos a inflamação supurativa pode se tornar uma doença corneal progressiva, com malácia estromal, descemetocel e posteriormente prolapso de íris (GIULIANO; MOORE, 2007). Em casos severos, o epitélio corneal é perdido, especialmente no centro da córnea

(SLATTER, 2005). Na maioria dos casos, o aparecimento é mais gradual, ou seja, a gravidade vai aumentando com o progresso semanal da doença. No estágio inicial, os olhos afetados, aparecem inicialmente avermelhados e inflamados, com secreção mucóide ou mucopurulenta intermitente. Uma vez que os sinais da doença inicialmente são inespecíficos, a CCS pode ser erroneamente diagnosticada como uma conjuntivite bacteriana primária ou irritante, e ser conseqüentemente tratada de maneira inadequada (GIULIANO; MOORE, 2007; COLITZ, 2008). Conjuntivites bacterianas secundárias, são frequentemente associadas a CCS, sendo uma causa comum para a falha no diagnóstico do problema primário (CRISPIN, 2002).

Quando a fase aquosa do filme lacrimal esta ausente, há acúmulo de muco. Este é diferente daquele presente na conjuntivite, é espesso, filamentosos e se adere a conjuntiva e à córnea em fios filamentosos. Quando a CCS se torna crônica, uma conjuntivite mucopurulenta acontece com exsudatos presentes nas bordas palpebrais (SLATTER, 2005). Conforme aumenta a gravidade da CCS, a córnea torna-se cada vez mais opacificada e ressecada, a conjuntiva fica extremamente hiperêmica e observa-se secreção ocular mucopurulenta persistente. Pode ocorrer também ceratite progressiva caracterizada por vascularização superficial e profunda, além de pigmentação extensa, com ou sem ulcerações (CRISPIN, 2002; SLATTER, 2005; GIULIANO; MOORE, 2007). Blefarite e dermatite periocular podem ocorrer com acúmulo de exsudatos nas margens palpebrais e na pele periocular, podendo também se tornar inflamada devido ao acúmulo de secreção ocular. Com a progressão da doença o desconforto aumenta, levando a uma blefarite persistente (GIULIANO; MOORE, 2007; COLITZ, 2008).

2.2.3 Diagnóstico

Kaswam e Salisbury (1990) alertam que o diagnóstico baseado somente nos sinais clínicos pode ser confundido com conjuntivites bacterianas ou alérgicas, necessitando de testes específicos para a confirmação da CCS.

Os testes específicos para diagnóstico da CCS são: Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste do Fenol Vermelho (TFV), Teste de Rosa Bengala (TRB) e Teste de Lisamina Verde (TLV) (MAGGS, 2008). Os mais

utilizados na Veterinária são o TLS e o TRB (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Além disso, o Teste de Fluoresceína (TF) é importante para detectar úlceras de córnea induzidas pela CCS.

O TLS permite avaliar a quantidade da porção aquosa de lágrima no saco conjuntival. É indicado para pacientes que apresentem irritação ocular crônica e sinais clínicos de olho seco. Este teste é realizado com o uso de tiras de papel-filtro especiais, com medidas padronizadas (0,5 cm de largura e 4 cm de altura). Uma pequena porção da tira (0,5 cm) é dobrada e inserida no saco conjuntival medial (Figura 3). Em animais deve-se aguardar 1 minuto para a retirada da tira e avaliação da medição (VAUGHAN; ASBURY, 1990; ANDRADE, 2008; HERRERA, 2008). O teste é considerado positivo, quando se evidencia a redução na produção da lágrima, indicando um valor inferior a 10mm de umedecimento da fita de Schirmer, esse teste deve ser realizado ao menos por duas vezes repetidas, para que se obtenha uma média dos valores. O TLS é considerado normal quando a fita mostrar valores de 10 a 25 mm de umidade; de 5 a 10 mm considera-se o animal suspeito de CCS; de 1 a 5mm considera-se CCS severa e animais que apresentam 0mm CC absoluta (MAGGS, 2008).

Existem dois tipos de TLS, 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. 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 (MAGGS, 2008; HERRERA, 2008).

Figura 3 – (A) Tiras estéreis descartáveis do Teste Lacrimal de Schirmer. (B) Ponta da tira dobrada em 0,5 cm para colocação no saco conjuntival. (C) Colocação da tira no saco conjuntival do coelho.



Fonte: O Autor, 2012.

Flutuações nos valores de TLS podem acontecer diária ou semanalmente, porém apenas flutuações semanais são consideradas biologicamente significantes (GELLAT, 2003). É aconselhável repetir o TLS em cães que sofreram estresse durante o exame oftálmico ou que receberam terapia medicamentosa para úlceras corneanas, uma vez que a estimulação simpática ou o tratamento tópico com atropina podem reduzir significativamente a produção lacrimal (GIULIANO; MOORE, 2007; COLITZ, 2008). Uma porcentagem relativamente pequena de cães acometidos não irá apresentar a forma clínica da doença, apesar de os valores de TLS encontrados serem baixos. Esses casos podem ser considerados CCS transitória ou em evolução, os quais devem ser monitorados com exames periódicos (GIULIANO; MOORE, 2007).

O TFV é um teste mais recente para quantificar a produção lacrimal com o objetivo de contornar as possíveis desvantagens do TLS como o tempo de realização do teste e consiste na colocação de 3 mm do cordão de algodão fino (75 mm de comprimento) no saco conjuntival durante 15 segundos (muda de vermelho para amarelo (MAGGS, 2008). É importado e com custo maior do que o TLS (ANDRADE, 2008).

O TRB utiliza um corante denominado de Rosa Bengala que detecta células desvitalizadas, defeitos epiteliais agudos ou ainda filamentos de muco aderidos, corando-os em cor rosa brilhante, (Figura 4) (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). O TLV é um teste similar ao realizado com o corante Rosa Bengala com a vantagem de não causar ardor ou desconforto ocular (MAGGS, 2008).

O corante fluoresceína utilizado no TF (Figura 5) para detectar úlceras de córnea, cora o estroma da córnea em verde brilhante e ainda pode ser usado para detectar o tempo de ruptura do filme lacrimal (*break up time – BUT*) que auxilia na observação da estabilidade do FLP (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008; MAGGS, 2008).

O TRFL (Figura 6) é utilizado para diagnóstico de deficiência de mucina, avaliando a capacidade da superfície da córnea em reter um revestimento homogêneo de lágrima evidenciando a estabilidade do FLP (GELLAT, 2003; COLITZ, 2008; MAGGS, 2008). Este exame é realizado após a instilação de 1 gota de fluoresceína e observado com lâmpada de fenda ou biomicroscópio avaliando-se o tempo que demora para iniciar, após o último piscar, o aparecimento de áreas de quebra do filme lacrimal sobre a superfície da córnea considerado como pontos escuros que aparecem no filme amarelo-esverdeado (traços ou manchas escuras) (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008; MAGGS, 2008). Para a realização do teste é indicado que não seja usada uma quantidade muito grande do corante de fluoresceína, podendo influenciar diretamente na espessura do filme lacrimal. Os valores médios de TRFL considerados normais são de aproximadamente 20 segundos em cães, 17 segundos em gatos e 19 segundos em coelhos. Valores abaixo de 5 segundos são considerados positivos para CCS (MCCULLEY; SHINE, 2002; GELLAT, 2003; COLITZ, 2008; MAGGS, 2008; EL-SHAZLY et al., 2008).

Figura 4 – (A) Colírio de Rosa Bengala a 1%. (B) Instilação de 1 gota do colírio de Rosa Bengala a 1% no olho coelho. (C) Teste de Rosa Bengala positivo na superfície ocular.



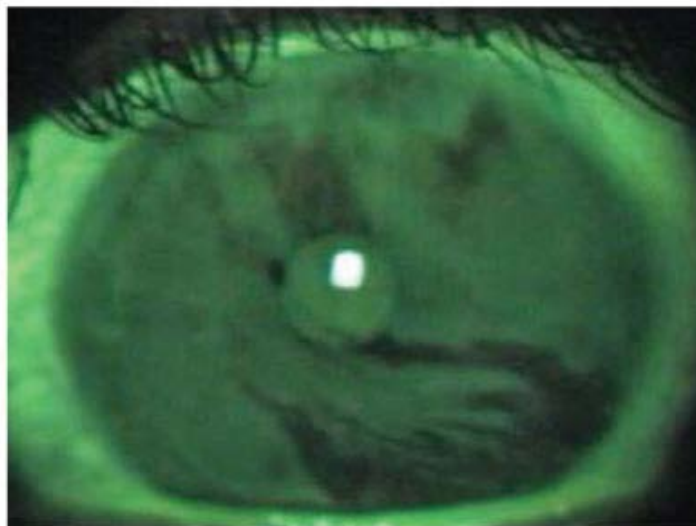
Fonte: O Autor, 2012.

Figura 5 – (A) Tiras estéreis descartáveis de fluoresceína. (B) Realização do Teste de Fluoresceína em coelho. (C) Teste de Fluoresceína positivo na córnea do coelho.



Fonte: O Autor, 2012.

Figura 6 - Teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal em humano.



Fonte: www.vision-and-eye-health.com. Acesso em: jun. 2011.

A citologia de impressão ou citologia esfoliativa (Figura 7) pode ainda ser um método diagnóstico auxiliar, que permite avaliar a superfície ocular (epitélio da conjuntiva e córnea), este método permite a avaliação, entre outros, da contagem do número de células caliciformes da conjuntiva em casos de olho seco, pois permite avaliar a severidade do quadro (MOORE et al., 2001; BARROS et al., 2001; BOLZAN et al., 2005; GODOY-ESTEVES et al., 2005).

Figura 7 - Exame de Citologia esfoliativa, realizado em coelho



Fonte: O Autor, 2012.

2.2.4 Tratamento

Uma das causas mais frequentes da CCS são as reações imunomediadas nas glândulas lacrimais e da terceira pálpebra, por isso o tratamento mais preconizado atualmente é o uso de imunossupressores como a ciclosporina, o tacrolimus e o pimecrolimus, além do uso de lágrimas artificiais, corticosteróides, mucolíticos, parassimpatomiméticos lacrimoestimulantes, como a pilocarpina, e os antibióticos (IZCI et al., 2002; BERDOULAY et al., 2005; MILLER, 2008; HERRERA, 2008).

Alguns estudos mostram, que os óleos de origem vegetal e animal apresentam alguns efeitos benéficos para o organismo, devido a fonte de ácidos graxos essenciais como ômega 3 e 6 que carregam em sua formulação (VIJAIMOHAN et al., 2006). Tais ácidos são importantes, pois atuam em processos inflamatórios e em doença autoimunes (HARBIGE et al., 2008). Além disso, os óleos vegetais são ricos em vitaminas, minerais entre outras substâncias e têm grande aplicação em preparações tópicas farmacêuticas e cosméticas, injetáveis oleosos, colírios oleosos e como solventes. Os principais óleos vegetais usados são os de oliva, soja, milho,

girassol, linhaça, amêndoas, semente de uva e macadâmia (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 1995).

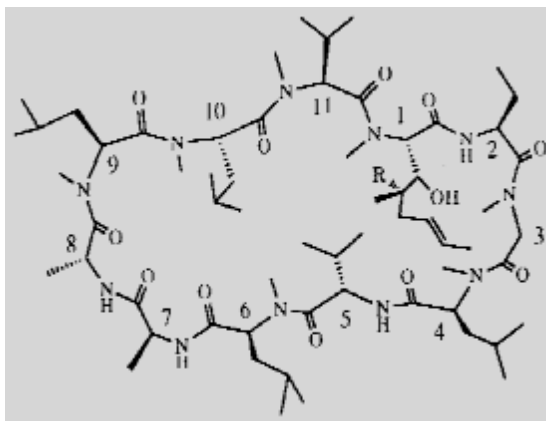
Segundo Kokke, Morris e Lawrenson (2008), a suplementação oral com ácidos graxos essenciais, principalmente ômega 6, em pacientes com CCS, mostrou um aumento considerável na produção da lágrima, bem como alterações adjacentes, com pigmentação da córnea e alterações de conjuntiva, efeitos estes provavelmente relacionados por seus efeitos anti-inflamatórios.

Barabino et al (2003) em seus estudos, testaram um tratamento com ácido linoleico e ácido γ -linolênico, por via oral, duas vezes ao dia, em humanos e constataram que houve uma melhora nas células epiteliais da conjuntiva e redução da inflamação da superfície ocular das pessoas tratadas com AGE.

2.3 Ciclosporina

A ciclosporina A (CsA) é derivada do fungo *Tolypocladium inflatum*, trata-se de um imunossupressor não citotóxico que inibe a proliferação de linfócitos T mediante a síntese de interleucina-2 no nível de transcrição (BENITEZ del CASTILLO et al., 1994; IZCI et al., 2002). É um agente imunossupressor polipeptídico cíclico lipofílico composto de 11 aminoácidos (Figura 8). Seu uso tem mostrado aumento na secreção lacrimal, aumento no número de células caliciformes e diminuição da incidência de úlceras de córnea por interromper a reação anti-inflamatória autoimune (IZCI et al., 2002; KUNERT; TISDALE; GIPSON, 2002).

Figura 8 - Estrutura Molecular da Ciclosporina



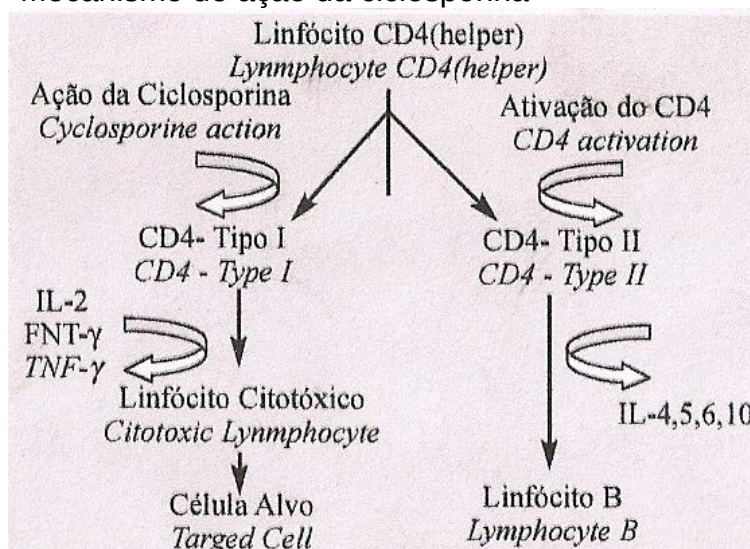
Fonte: ZANINI et.al. (2007).

As propriedades imunossupressoras da ciclosporina (CsA), foram demonstradas no início da década de 70, e logo passou a ser utilizada como medicação imunossupressora nos transplantes de órgãos. Atualmente, as indicações se estenderam e a ciclosporina é usada também para controlar doenças inflamatórias, em vários órgãos, como pele, articulações e trato gastrointestinal. Sabe-se que a CsA age predominantemente nos linfócitos CD4 (auxiliar) e CD8 (citotóxico). Estudos *in vitro* afirmam que o linfócito supressor, também um linfócito CD8, não é afetado. Os linfócitos auxiliares são divididos em duas populações - tipos 1 e 2. O linfócito auxiliar 1 participa da resposta celular mediada, enquanto o linfócito auxiliar 2 está envolvido com o estímulo e ativação dos linfócitos B. A CsA atua particularmente nos linfócitos auxiliares1(JUNE, 1987; FAIRLEY, 1990; DUPUY, 1991).

A ativação e estimulação dos linfócitos ocorrem por diversas vias. Uma delas inclui os receptores CD2, CD3 e PMA, presentes na membrana plasmática do linfócito T e que participam na ativação linfocítica por meio de antígenos e lecitinas. Essa via é o sítio de ação da CsA. Outros mecanismos que estimulam e/ou ativam os linfócitos T, como aqueles envolvidos nas doenças infecciosas, parecem não ser atingidos pela CsA. A ciclosporina entra livremente nas células e reage com a ciclofilina (isomerase peptidilproil), uma proteína citoplasmática com função de receptor para a CsA. O complexo CsA - Ciclofilina liga-se à calcineurina – uma protease. A inativação da calcineurina é o elemento-chave no efeito antilinfocítico da CsA. A calcineurina participa de múltiplas ações, essenciais na ativação e estimulação dos linfócitos T, sendo a

inibição na transcrição do fator nuclear de linfócitos T ativados (FNTA) um dos principais efeitos. O FNTA e a calcineurina estão envolvidos na expressão de genes codificadores de linfocinas, incluindo a interleucina-2, interleucina-4, fator de crescimento de colônias macrófago granulócito, fator de necrose tumoral α e interferon γ também participam na indução da apoptose e degranulação dos linfócitos citotóxicos. Sucintamente, pode-se dizer que a CsA bloqueia a ativação e replicação dos linfócitos T ao inibir reversivelmente a transcrição de linfocinas por meio de fatores citoplasmáticos de transcrição gênica. O linfócito terá seu ciclo celular bloqueado em G0 ou em G1. O resultado final é o bloqueio da resposta imune mediada pelos linfócitos T auxiliares e citotóxicos (Figura 9). Em contraposição, outros imunossupressores, como o metrotexato, inibem linfócitos já ativados. Caracteristicamente, a CsA apresenta efeito mínimo ou nulo sobre o linfócito T supressor e plasmócitos são contraditórios os estudos sobre o efeito inibidor direto nos queratinócitos. Estudo interessante realizado na Espanha mostrou que a CsA enteral interfere na expressão das moléculas de adesão dos queratinócitos. Prignano *et al* (1996) pressupõem que a inibição na proliferação de queratinócitos esteja relacionada com uma ação direta das CsA sobre o citoesqueleto celular. Inibição das células de Langerhans e mastócitos também foi demonstrada (GALVIN, 1993; FAULDS; GOA; BENFIELD, 1993; SERVITJE *et al.*, 1996; PRIGNANO *et al.*, 1996).

Figura 9 – Mecanismo de ação da ciclosporina



Fonte: ZANINI *et.al.*(2007).

A ciclosporina é um imunossupressor utilizado com sucesso nos casos dos animais que apresentam doença autoimune. É um agente não citotóxico que age na secreção lacrimal de forma a estimular a produção da lágrima, além de interromper o processo inflamatório instalado (HERRERA, 2008).

Alguns efeitos colaterais foram descritos com o uso da ciclosporina, dentre eles elevada taxa de creatinina, hipertensão e disfunção renal, esses efeitos por sua vez, limitam o uso sistêmico da ciclosporina para o tratamento de distúrbios oculares, sendo escolhido apenas seu uso na forma tópica, assegurando eficácia e vantagens no tratamento (TANG-LIU; ACHEAMPONG, 2005).

A CsA colírio é comercializada em concentrações a 0,05% em álcool polivinílico, a 0,05% em emulsão aniônica oftálmica (Restasis®/flaconete de uso único) a base de glicerina, óleo de castor e polissorbato 80, a 1 e 2% em colírio em veículo oleoso (óleo de oliva) e a 0,2% em pomada oftálmica (LIMA FILHO e BATISTUZZO, 2006; YAVUZ; PEHLIVAN; ÜNLÜ, 2012; LIANG et al., 2012). Alguns efeitos adversos do uso da CsA tópica ocular descrito em humanos foram alergia, sensação de queimação e irritação da conjuntiva (UTINE; STERN; AKPEK, 2010; YAVUZ; PEHLIVAN; ÜNLÜ, 2012).

2.4 Óleo de Semente de Linhaça

O nome científico da linhaça é *Linum usitatissimum* L. da família Linaceae, semente da planta do linho é uma das plantas mais antigas da história, os primeiros relatos da semente são datados de 5000 anos antes de Cristo, na Mesopotâmia (MONEGO, 2009). Achados apontam que a semente de linhaça era empregada para consumo e a planta do linho era utilizada para tratar ferimentos (CREDIDIO, 2005).

O linho é uma planta originária da Ásia, possivelmente do Cáucaso, seus benefícios difundiram posteriormente para vários outros países (MARQUES, 2008). Atualmente o linho é cultivado principalmente no Canadá, na Argentina, nos Estados Unidos, na Rússia e na Ucrânia (MOURA; CANNIAT-BRAZACA; SILVA, 2009). A produção mundial de linhaça se encontra entre 2 300 000 e 2 500 000 toneladas anuais, sendo o Canadá seu

principal produtor. A Argentina é o maior produtor da América do Sul, com cerca de 80 toneladas/ano, já o Brasil apresenta uma produção menor, de cerca de 21 toneladas/ano (ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009). No Brasil o grão é cultivado no estado do Rio Grande do Sul, em Ijuí, Tupancireta, São Miguel das Missões, São Luiz Gonzaga, Girua, Santa Rosa, Guarani das Missões, Tres de Maio, Panambi, Santa Barbara, Santo Augusto e proximidades (MARQUES, 2008).

As sementes de linhaça são geralmente de cor marrom avermelhada, dependendo da variedade dourada ou marrom do linho, leves e brilhante, ovaladas, pontiagudas e chatas, sua medida aproximada é de 2,5 x 5,0 x 1,5 mm, possui textura firme e mastigável, seu sabor é semelhante ao da castanha, porém levemente amargo (POSSAMAI, 2005), possui na sua parte externa uma substância que as tornam pegajosas quando úmidas (MOURA; CANNIAT-BRAZACA; SILVA, 2009).

A linhaça é uma semente oleaginosa, rica em proteínas, lipídeos e fibras dietéticas (ALMEIDA; BOAVENTURA; GUZMAN-SILVA, 2009). Possui três componentes que apresentam ações farmacológicas importantes como ácido α -linolênico, fibras solúveis e lignana, os quais vem sendo avaliados em pesquisas clínicas e estudos relacionados ao câncer de mama, próstata e colón, diabetes, lúpus, perda óssea, doenças hepáticas, renais e cardiovasculares, com resultados favoráveis quanto ao efeito benéficos da semente (CARRARA et al., 2009).

Segundo Silva, Beraldo e Dematei (2009) e Oliveira, Pirozi e Borges (2007), a semente de linhaça possui em sua composição química cerca de 30 a 40% de lipídio, 20 a 25% de proteína, 20 a 28% de fibra dietética total, 4 a 8% de umidade e 3 a 4% de cinzas, além de vitaminas A, B, D e E, e minerais como potássio, fósforo, magnésio, cálcio e enxofre.

O óleo de semente de linhaça é considerado atualmente uma das maiores fontes de ácidos graxos essenciais do tipo ômega 3 e ômega 6. Possui em média três vezes mais a concentração de ômega 3 e 6 do que outras fontes como nozes, óleo de peixe e semente de soja (HASSAN-ZADEH; SAHARI; BARZEGAR, 2008; OOHMA, 2001). O ácido linoleico é metabolizado em ácido araquidônico, este é o principal precursor dos eicosanóides pró-inflamatórios, dentre eles as prostaglandinas que são compostos biologicamente ativos e

importantes para uma ampla gama de reações no organismo (BARBARINO et al, 2003).

Pinheiro Jr. et al., (2007) estudou o uso de óleo de linhaça no tratamento de portadores de diversas formas de deficiência lacrimal associadas à síndrome de Sjögren que afeta mais mulheres e idosos, que apresentam também ressecamento oral, por deficiência das glândulas produtoras de saliva e alterações reumatológicas. Neste estudo concluiu-se que o uso de óleo de linhaça em cápsulas de 1 ou 2 g/dia (sem diferença significativa), reduz a inflamação da superfície ocular avaliada pela citologia de impressão, e melhora os sintomas de olho seco. O benefício do óleo de linhaça no tratamento de olho seco pode ser explicado pelo aumento local das prostaglandinas tipo 1 (PGE 1) no filme lacrimal (BARABINO et al., 2003).

2.5 Óleo de Oliva

Segundo Minoli (2007), não se sabe ao certo a data da existência das primeiras oliveiras, a literatura, porém, reporta a importância dessa árvore desde a antiguidade, sendo que a própria bíblia cita como um dos mais antigos frutos do mundo. Foram os sírios, fenícios e armênicos, os primeiros povos a ter contato com a oliveira, e foram esses mesmos povos que as levaram para o Mediterrâneo Oriental. Foi somente após algum tempo, que os romanos juntamente com os gregos, difundiram o azeite para a Europa e Ocidente. Na Espanha foram os árabes que disseminaram o cultivo da oliveira e as técnicas da produção do azeite. Por muito tempo o cultivo do azeite ficou restrito a poucos países, como a Espanha, Portugal, Grécia, França e Norte da África (STELAMAR, 2011).

A oliveira é uma oleácea perene, extremamente rústica, de longevidade

excepcional. A espécie doméstica pode alcançar mais de 20 metros de altura, possui folhas estreitas e pequenas flores brancas. O fruto, a azeitona, é uma drupa típica, arredondada, de 15 a 30 milímetros de comprimento e 15 a 20 milímetros de diâmetro, sendo muito carnosa em certas variedades. No verão apresenta coloração verde e no outono vermelho-claro ou quase preta (BARRANCO; FERNANDEZ ESCOBAR; RALLO, 2004;

PEIXOTO, 1973), é uma árvore robusta, sendo hora mais indicada para a colheita é quando não existem mais azeitonas verdes na árvore e os processos vão desde o manual até o mecanizado. O bom azeite de oliva é obtido a partir da seleção de azeitonas saudáveis e inteiras, quanto mais cedo as frutas vão para a prensagem melhor será a qualidade do azeite (WATERMAN; LOCKWOOD, 2007).

A azeitona é constituída por pericarpo e caroço. O pericarpo é composto pelo epicarpo ou casca, pelo mesocarpo ou polpa e pelo endocarpo, que contém o caroço. A polpa representa de 66 a 85% do peso do fruto, o endocarpo de 13 a 30% e a casca de 1,5 a 3,5%. O caroço não excede a 3% do peso do fruto. Cerca de 96 a 98% do total de óleo da azeitona encontra-se no pericarpo e o restante, isto é, 2 a 4% encontra-se no caroço (RAPOPORT, 2004).

O azeite de oliva é composto em sua maior parte (98,5% a 99,5%) pela chamada fração saponificável, que é constituída pelos triglicerídeos, ésteres de

glicerina com ácidos graxos e os ácidos graxos livres. Os ácidos graxos predominantes são formados por 18 átomos de carbono, que podem estar unidos entre si por ligações simples, denominados de ácidos graxos saturados, ou estarem unidos por ligações simples e uma dupla, ácidos graxos monoinsaturados, ou também estarem unidos por três ligações duplas, denominados de ácidos graxos poli-insaturados. No entanto, o ácido graxo predominante no azeite de oliva é o ácido oleico, que é monoinsaturado (GIMENO et al., 2002), cerca de 70-80% de ácido oleico, 10-15% de ácido graxo saturado (ácido palmítico), e uma pequena quantidade de ácido graxo poli-insaturado (PUFA) em torno de 5 a 10% de ômega 3, 6 e 9. Trabalhos mostram que o óleo de oliva tem efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios, antiarrítmicos, espasmolítico, imunoestimulante, cardioprotetor, hipotensivo, hipoglicemiante e antimicrobiano (AL-AZZAWIE; ALHAMDANIM, 2006; WARDHANA; SURACHMANTO, 2011; EIDI et al., 2012).

Alguns trabalhos relatam como a composição do óleo pode ser influenciada pela latitude. A quantidade de ácido linoleico aumenta quando a temperatura diminui, contrário ao que acontece com o ácido oleico. Além disso, percebeu-se que o conteúdo de esteróis apresenta grandes flutuações. A

concentração de beta 20 sitosterol, campesterol e estigmasterol decresce quando o clima se torna mais frio. A composição química do azeite de oliva também varia sob influência da altitude. Oliveiras cultivadas próximas ao mar Mediterrâneo produzem óleos diferentes do que aquelas cultivadas nos Alpes (BOSKOU, 1998; APARICIO; FERREIRO; ALONSO, 1994).

O uso contínuo do azeite de oliva, especialmente o extra virgem, pode fornecer uma carga suficiente de antioxidantes para o corpo, o que pode reduzir a oxidação através da inibição da peroxidação dos lipídeos, fator este, relacionado diretamente com as doenças coronarianas, o câncer, além de agir no envelhecimento. Todos os componentes do óleo de oliva são lipossolúveis (solúveis em gordura) o que facilita a sua absorção e transporte pelo organismo (EIDI et al., 2012).

Várias espécies dentro da família da oliva, botanicamente conhecida como *Olea europaea*, fornece diversos produtos comerciais, tais como, alimentos, madeira, cosméticos e medicamentos. O azeite ou o óleo é um importante componente da dieta mediterrânea, contendo quantidades variáveis de triglicerídeos e pequenas quantidades de ácidos graxos livres, glicerol, pigmentos, compostos de aroma, esteróis, fenóis. Propriedades do óleo de oliva, o fruto da oliveira e suas folhas têm sido bastante reconhecidos como componentes importantes na medicina. Os compostos fenólicos são encontrados em todas as partes da planta de oliva, sendo que oleuropeína é o composto fenólico, que geralmente é mais proeminente no azeite (WATERMAN; LOCKWOOD, 2007).

REFERÊNCIAS

- AL-AZZAWIE, H.F.; ALHAMDANIM, S.S. Hypoglycemic and antioxidant effects of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Science**, v. 78, p. 1371-1377, 2006.
- ALMEIDA, C. L.; BOAVENTURA, G. T.; GUZMAN – SILVA, M. A., A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido α -linolênico na formação da bainha de mielina. **Nutrição**, v. 22, n. 5, 2009.
- ANDRADE, S. F. Terapêutica oftálmica. In: Andrade, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, p. 179-189, 2008.
- ANDRADE, S. F. **Fotos do arquivo pessoal**. Presidente Prudente: Hospital Veterinário da Unoeste, 2010.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 6 ed. [S.l.]: Media:Williams & Wilkins, 1995.
- APARICIO, R.; FERREIRO, L.; ALONSO, V. Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 292, p. 235-241, 1994.
- BARABINO, S., et al. Systemic linoleic and γ -linolenic acid therapy in dry eye syndrome with and inflammatory component. **Cornea**, Philadelphia, 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. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, n. 6, p. 1641-1646, 2004.
- BARBOSA, E. B. **Avaliação oftalmológica e laboratorial de coelhos hígidos tratados com colírios de 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.
- BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El cultivo del olivo**. 5.ed. Córdoba: Mundi-Prensa, 2004. 800 p.
- BARROS, J. N. et al. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 64, n. 2, p. 127-31, 2001.
- BENITEZ del CASTILLO, J. M. et al. Influence of topically applied cyclosporine A in olive oil on corneal epithelium permeability. **Cornea**, v. 13, n. 2, p. 136–140, 1994.
- BERDOULAY, A., ENGLISH, R. V., NADELSTEIN, B. Effect of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 4, p. 225-232, 2005.
- BOLZAN, A. A. et al. Conjunctival impression cytology in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 6, p. 401-405, 2005.

BOSKOU, D. **Química y tecnología del aceite de oliva**. 1.ed. Madrid: Mundi Prensa, 1998. 295 p.

BURGALASSI, S. et al. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. **Ophthalmic Research**, v. 31, n. 3, p. 229-235, 1999.

CARRARA, C. L. et al. Uso da semente de linhaca como nutraceutco para prevenção e tratamento da arterosclerose. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 1- 9, 2009.

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

COLITZ, C. M. H. Doenças do sistema lacrimal. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 139, p. 1416-1421.

CREDIDIO, E. **Propriedades funcionais da linhaça**. 2005. Disponível em: <http://www.nutronews.com.br/index.php/artigos-sobre-alimentos/643-propriedadesnutricionais-da-linhaça.html>. Acesso em: 17 fev. 2010.

CRISPIN, S. The lacrimal system. In: PETERSON JONES, S.; CRISPIN, S. (Ed). **BSAVA manual of small animal ophthalmology**. England: BSAVA, 2006. v. 2, cap. 6, p.105-123.

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

DAVIS, F. A. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. **Transactions of American Ophthalmological Society**, v. 27, p. 402-41, 1929.

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

DUPUY P. Cyclosporin A innhibits the antigen-presenting functions of freshly isolated human langerhans cells in vitro. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 96, p. 408, 1991.

EL-SHAZLY, A. H. et al. Comparison between two ciclooxygenase inhibitors in an experimental dry eye model in albino rabbits. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 163-173, 2008.

EIDI, A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (*Olea europeae* L.) in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 332-337, 2012.

FAIRLEY, J. A. Intracellular targets of cyclosporine. **Journal of American Academic Dermatologic**, v. 23, p. 1329, 1990.

FAULDS, D.; GOA, K. L.; BENFIELD, P. Cyclosporin: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. **Drugs**, v. 45, n. 6, p. 953- 1040, 1993.

GALVIN F. Effects of cyclosporin A, FK506 and mycalamide A on the activation of murine CD4⁺ T-cells by the murine B7 antigen. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 283, 1993.

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**. 3rd.ed.. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

GELATT, K. N. Oftalmologia felina. In: **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2003. Cap 12, p. 901-905.

GIMENO, E. et al. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β - carotene) in virgin olive oil. **Food Chemistry**, v. 78, p. 207-211, 2002.

GIULIANO, E. A.; MOORE, C. P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. V.2, cap. 13, p. 633-661.

GODOY-ESTEVEZ et al. Padronização da citologia de impressão da superfície ocular canina. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 109-115, 2005.

GOMES, J. A. P. et al. Modelo experimental de olho seco em coelho. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 57, n. 4, p. 265-269, 1994.

HARBIGE, L. S. et al. Pathogenesis and treatment of patients with multiple sclerosis. **The Proceedings of Nutrition Society**, v. 67, n. 21, p. 587-598, 2008.

HASSAN-ZADEH, A.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M. 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.81-106.

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, n. 5, p. 688-694, 2002.

JUNE, C. H. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine resistant interleukin-2 gene expression. **Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 4472, 1987.

KASWAN, R. L.; SALISBURY, M. A. A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca. Treatment with ophthalmic cyclosporine. **The Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v. 3, n. 20, p. 583- 613, 1990.

KLEINNER, J. A. **Tratamento Cirurgico da Epífora Crônica em Animais de Companhia**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KOCH, S .A.; SYKES, J. Keratoconjunctivitis sicca. In RIIS, R.C. **Small animal ophthalmology secrets**. Philadelphia: Hanley & Belfuscap, 2002. p 52–60.

KOKKE, H.; MORRIS, J. A.; LAWRENSON, J. G. Oral omega-6 essential fatty acid treatment in contact lens associated dry eye. **Contact Lens & Anterior Eye**, v. 31, p. 141-146, 2008.

KUNERT, K. S.; TISDALE, A. S.; GIPSON, I. K. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. **Archive of Ophthalmology**, v. 120, n. 3, p. 330-337, 2002.

LIANG, H. et al. Ocular safety of cationic emulsion of cyclosporine in an in vitro corneal wound-healing model and an acute in vivo rabbit model. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2195-2204, 2012.

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

LIMA FILHO, A. A. S.; BATISTUZZO, J. A. O. **Formulações magistrais em oftalmologia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 130 p.

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.

MARQUES, A. C. **Propriedades funcionais da linhaça (Linum usitatissimum L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MCCULLEY, J. P.; SHINE, W. E. Meibomian Gland and Tear Film Lipids: structure, function and control. In: SULLIVAN, D. A. et al. **Advances in experimental medicine and biology series, lacrimal gland, tear film, and dry eye syndromes**

3: basic science and clinical relevance. New York:Plenum Press, 2002. v. 506, p 373-378.

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.

MINOLI, F. O azeite de oliva. **Bemparaná**, 2007. Disponível em: <http://www.bemparana.com.br/noticia/29065/o-azeite-de-oliva#.UnjxQHCKolQ>. Acesso em: 13 jun. 2011.

MONEGO, M. A. **Goma da linhaça (Linum usitatissimum L.) para uso como hidrocolóide na indústria alimentícia.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MOORE, C. P. et al. . Effects of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 3, p. 653-659, 2001.

MOURA, N. C.; CANNIAT- BRAZACA, S. G.; SILVA, A.G. Elaboração de rotulo nutricional para pães de forma com adição de diferentes concentrações de linhaça (Linum usitatissimum). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 149–155, 2009.

NEVES, M. L. et al. Use of linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2013.

OLIVEIRA, T. M.; PIROZI, M. R.; BORGES, J. T. S. Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça. **Alimentos e Nutrição**. v. 18, n. 2, p. 141–150, 2007.

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

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas:** oliveira. São Paulo: Nobel, 1973. p. 282.

PINHEIRO JR. 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.

POSSAMAI, T. N. **Elaboração do pão de mel enriquecido com fibra alimentar e sua caracterização físico-química, microbiológica e sensorial.** 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Parana, Curitiba.

PRIGNANO, F. et al. Cyclosporin A affects the organization of cytoskeleton of normal human keratinocytes in culture. **Histology and Histopathology**, v. 11, n. 4, p. 889-94, 1996.

RAPOPORT, H. F. Botânica Y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNANDÉZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El cultivo del olivo**. Córdoba: Mundi-Prensa, 2004. p. 38-62.

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.

SERVITJE, O. et al. Changes in T-cell phenotype and adhesion molecules expression in psoriatic lesions after low-dose cyclosporin therapy. **Journal Cutaneous Pathology**, v. 23 n. 5, p. 431-6, 1996.

SILVA, M. B. L.; BERALDO, J. C.; DEMATEI, L. R. Efeito da adição de farinha de linhaça na aceitação sensorial de bolo de chocolate. **Enciclopédia Biosfera**, v. 5, n. 8, 2009.

SLATTER, D. E. In: SLATTER, D. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p.147-203.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 1369–1522.

SLATTER, D. Sistema Lacrimal. In: **Fundamentos da oftalmologia veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 9, p. 247-258.

STELAMAR. **Características do óleo de oliva** Disponível em: <http://www.stelamar.com.br/azeites.htm>. Acessado no dia 8 de junho de 2011.

TANG-LIU, D. D. S.; ACHEAMPONG, A. **Ocular pharmacokinetics and Safety of Ciclosporin, a Novel Topical Treatment for Dry Eye**. Clinical Pharmacokinetic, v. 44, n. 3, p. 247-261, 2005.

ÚLCERAS de córnea. In: QUARTIERO, F. **Oftalmologia animal**, 1999. Disponível em: www.ogatocarioca.com/2012/05/ulceras-de-cornea.html. Acesso em: 27 jan. 2013.

UTINE, C. A.; STERN, M.; AKPEK, E. K. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A. **Ocular Immunology Inflammation**, n. 18, p. 352-361, 2010.

YAVUZ, B.; PEHLIVAN, S. B.; ÜNLÜ, N. An overview on dry eye treatment: approaches for cyclosporine A delivery. **The Scientific World Journal**, v. 1, p-11, 2012.

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

VIJAIMOHAN, K. et al. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. **Life Science**, v. 79, n. 5, p. 448-454, 2006.

WARDHANA, E. E.; SURACHMANTO, E. A. D. The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation. **Acta Medicine Indones**, v. 43, p. 138-142, 2011.

WATERMAN, E.; LOCKWOOD, B. Active components and clinical applications of olive oil. **Alternative Medicine Review**, v. 12, p. 331-342, 2007.

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

ZANINI, M. et al. Clinical use of cyclosporine in dermatology. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 4, p. 379-380, jul/ago. 2001.

ARTIGO CIENTÍFICO

Comparação da ciclosporina 1% colírio dissolvida em óleo de oliva e de semente de linhaça no tratamento de ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos

Leticia Rodrigues Parrilha¹, Gisele Alborghetti Nai², Osimar de Carvalho Santos³, Rafael Cabral Barbero⁴, Leticia Dias Fabris Padovani⁴, Ricardo Henrique Zaquir Pereira⁴, Danielle Alves Silva⁵, Mariele Catherine Alves Silva⁵, Miriely Stein Diniz⁵ and Silvia Franco Andrade⁶

¹ Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, São Paulo, 19001-970, Brazil; ² Departamento de Anatomia Patológica da Medicina (UNOESTE); ³ Departamento da Anatomia Patológica Veterinária (UNOESTE); ⁴ Faculdade de Medicina Veterinária (UNOESTE); ⁵ Residente do Hospital Veterinário (UNOESTE); ⁶ Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais (UNOESTE).

*Autor para correspondência: S.F. Andrade Tel: +55-18-32292067; Fax: +55-18-32292036
e-mail address: silviafranco@unoeste.br

Título corrido: Ciclosporina 1% em óleo de oliva e de linhaça na KCS de coelhos

Resumo

Objetivo Avaliar a eficácia do uso tópico do colírio de ciclosporina 1% diluída em dois veículos, óleo de oliva e de semente de linhaça e dos óleos isoladamente, no tratamento de ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida experimentalmente em coelhos.

Procedimento Foram utilizados vinte e cinco coelhos machos adultos brancos da raça Nova Zelândia divididos em 5 grupos, um grupo controle (C) sem indução de olho seco e quatro no qual a KCS foi induzida, CO (ciclosporina 1% em óleo de oliva), CL (ciclosporina 1% em óleo de linhaça), O (óleo de oliva) e L (óleo de linhaça). Os animais foram avaliados pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste de Fluoresceína (TF), Teste de Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), Teste de Rosa Bengala (TRB), citologia ocular e análise histopatológica.

Resultados Houve aumento significativo nos valores de TLS em todos os grupos de tratamento após a indução da CCS, apresentando melhor desempenho o grupo CL. Com relação ao TF, houve resolução mais precoce das úlceras de córnea nos grupos O e L. Para o TRB, o grupo O foi que apresentou pior desempenho. Os grupos L e CL apresentaram menos edema e congestão de córnea. Houve aumento significativo no número de células calciformes em todos os grupos de tratamento, principalmente no grupo CL.

Conclusão A ciclosporina diluída em óleo de linhaça e oliva foi eficiente no tratamento da CCS. Entretanto, a linhaça apresentou melhor eficácia, associada ou não, quando comparada ao óleo oliva. Estes resultados podem contribuir para criação de novas formulações oftálmicas no tratamento de KCS no futuro.

Palavras chave: ciclosporina, óleo de oliva, óleo de linhaça, ceratoconjuntivite seca, coelhos

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou doença do olho seco, caracteriza-se pela diminuição da quantidade e/ou alteração na qualidade e estabilidade do filme pré-lacrimal (FLP) (Miller, 2008; Stevenson *et al.*, 2012). Os sinais clínicos da CCS são secreção mucóide a purulenta,

desconforto ocular, blefaroespasma, hiperemia conjuntival crônica, vascularização corneal, úlceras de córnea e ceratites pigmentar, que levam a cegueira (Gelatt, 1999; Miller, 2008). Atualmente o tratamento mais utilizado na veterinária consiste na substituição da lágrima com soluções lubrificantes e uso de imunossupressores como a ciclosporina, tacrolimus e o pimecrolimus.^{1,2}

A ciclosporina A (CsA) é derivada do fungo *Tolypocladium inflatum*, trata-se de um imunossupressor não citotóxico que inibe a proliferação de linfócitos T mediante a síntese de interleucina-2 no nível de transcrição.^{3,4} Seu uso tem mostrado aumento na secreção lacrimal, aumento no número de células caliciformes e diminuição da incidência de úlceras de córnea por interromper a reação anti-inflamatória autoimune.^{4,5} A CsA colírio é comercializada em concentrações a 0,05% em álcool polivinílico, a 0,05% em emulsão aniônica oftálmica (Restasis[®]/flaconete de uso único) a base de glicerina, óleo de castor e polissorbato 80, a 1 e 2% em colírio em veículo oleoso (óleo de oliva) e a 0,2% em pomada oftálmica.^{6,7} Alguns efeitos adversos do uso da CsA tópica ocular descrito em humanos foram alergia, sensação de queimação e irritação da conjuntiva.^{6,8}

O óleo de oliva, *Olea europeae*, contém grande quantidade de ácido graxo monoinsaturado (MUFA), cerca de 70-80% de ácido oleico, 10-15% de ácido graxo saturado (ácido palmítico), e uma pequena quantidade de ácido graxo poli-insaturado (PUFA) em torno de 5 a 10% de ômega 3, 6 e 9.⁹ Trabalhos mostram que o óleo de oliva tem efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios, antiarrítmicos, espasmolítico, imunoestimulante, cardioprotetor, hipotensivo, hipoglicemiante e antimicrobiano.¹⁰⁻¹²

O óleo de linhaça tem na sua composição 16% de ácidos graxos linolênico (ômega 6/ ω -6) e 57% de ácidos graxos alfa-linolênico (ômega 3/ ω -3), sendo considerado a maior fonte de ômega 3 e 6 conhecida, e sua relação ω -3 e ω -6 de 1:3 considerada muito próxima do ideal.¹³ É utilizado principalmente no tratamento em oftalmologia de pacientes portadores de diversas formas de deficiência lacrimal, como na Síndrome de Sjögren humana, tanto em suplementação oral,^{14,15} como em experimentos por via tópica em ratos e por via tópica e oral em coelhos.¹⁶⁻¹⁸ Sua ação anti-inflamatória ocorre devido a formação de mediadores eicosanóides não inflamatórios.^{18,19}

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do colírio ciclosporina 1%, potente imunossupressor utilizado no tratamento da CCS, diluído em dois tipos de veículos, o óleo de oliva, que já é utilizado como veículo da ciclosporina, e o óleo de linhaça, 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 n. 720. Foram utilizados 25 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos brancos da raça Nova Zelândia, com idade aproximada entre 9 e 34 meses e com peso variando entre 3 a 5kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração (Supra[®]) *ad libidum*.

O modelo de indução da CCS, em coelhos, foi baseado em estudos previamente publicados,^{16,17,20-22} com o uso de sulfato de atropina colírio 1%, três vezes ao dia, até que se confirmasse o diagnóstico de CCS (considerados positivos para CCS animais com TLS $\leq$ 5mm/min) e/ou tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL/BUT) $\leq$ 10 segundos,^{23,24} e seu uso foi mantido durante todo o período de tratamento (12 semanas), para manutenção da CCS.

Dos 25 coelhos, 20 foram induzidos com o uso de atropina colírio 1% a CCS e 5 foram alocados no grupo controle, sem indução da CCS. Após uma semana do início da indução da CCS, iniciou-se o tratamento dos animais, por um período de 12 semanas: Grupo C (n=5): controle, 1 gota de placebo (solução de NaCl 0,9%), em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo CO (n=5): 1 gota de ciclosporina 1% diluída em óleo de oliva, em forma de colírio (Laboratorio Ophthalmos-SP), em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo CL (n=5): 1 gota de ciclosporina 1% diluída em óleo de semente de linhaça, em forma de colírio (Laboratorio Ophthalmos-SP), em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo O (n=5): 1 gota de óleo de oliva puro em forma de colírio (Laboratorio Ophthalmos-SP), em ambos os olhos, 2 vezes ao dia; Grupo L (n=5): 1 gota de óleo de semente de linhaça puro em forma de colírio (Laboratorio Ophthalmos-SP), em ambos os olhos, 2 vezes ao dia.

Foram realizados nos momentos M0 (antes da indução de CCS), M1 (1 semana após a indução de CCS), M2 (2 semanas após a indução), M3 (3 semanas após a indução), M4 (4 semanas após a indução), M8 (8 semanas após a indução) e M12 (12 semanas após a indução) os seguintes testes oftálmicos: Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) sem colírio anestésico, realizado para avaliar a quantidade de lágrima, considerado positivo para CCS valores $\leq$ 5mm; Teste de Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), para avaliação da qualidade da lágrima, valores $\leq$ 10 segundos foram considerados positivos para CCS; Teste de Fluoresceína (TF), para detecção da presença ou não de úlceras de córneas por quadrantes (temporal superior, temporal inferior, nasal superior e nasal inferior), o escore utilizado foi graduado em 0 a 4, onde: (0) sem corar; (1) 1 quadrante corado; (2) 2 quadrantes corados; (3) 3 quadrantes corados; (4) 4 quadrantes corados; Teste de Rosa Bengala (TRB) para coloração

de células desvitalizadas, considerado positivo para CCS quando alguma área da córnea ou conjuntiva se corou de rosa, o escore utilizado foi graduado de 0 a 3, onde: (0) sem corar; (1) somente conjuntiva corada; (2) somente córnea corada; (3) conjuntiva e córnea corada.

A citologia da superfície ocular foi realizada através de swab estéril umedecido em solução fisiológica no M0, M4, M8, e M12, de células da conjuntiva e córnea (conjuntiva superior e inferior, conjuntiva lateral e nasal. No último dia do experimento (M12) os animais foram submetidos a eutanásia utilizando tiopental sódico a 2,5%, na dose de 200mg/kg por via IV. Após a enucleação, o olho foi colocado em solução de formol a 10% tamponado por 24 a 48 horas, e posteriormente foram submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina. Foram obtidos cortes de 5 µm de espessura da córnea e conjuntiva, os quais foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), PAS e tricrômio de Masson separadamente. A contagem de células caliciformes foi realizada em 800 micrometros.^{23,24}

Para as variáveis TLS, TRFL e densidade de células caliciformes, foi utilizado o teste de análise variância (ANOVA) 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. Para os momentos em que não foi observada normalidade ou homogeneidade de variâncias os dados foram analisados pelo Teste de Kruskal Wallis. Foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O grupo C (controle) manteve os parâmetros normais durante todo período experimental. Os valores de TLS foram significativamente inferiores ($P<0,05$) no M1, abaixo de 5mm/min (positivo para CCS), nos grupos de tratamento e no M2 estes grupos apresentaram aumento, porém ainda estatisticamente inferiores em relação ao M0 ($P<0,05$). A partir do M1 os valores de TLS aumentaram, sendo o grupo CL apresentando os maiores aumentos no grupo de tratamento a partir de M8 até M12 (Fig. 1A).

Os valores do TRFL foram significativamente inferiores ($P<0,05$) no M1, abaixo de 5 segundos (positivo para CCS) nos grupos de tratamento, aumentando no M2 nestes grupos, porém ainda estatisticamente inferiores em relação ao M0 ($P<0,05$) nos grupos CO e CL. No M12 os valores ficaram próximos ao M0 no grupo CO e CL (Fig. 1B).

O TF no M1 nos grupos L e CL os animais apresentaram escores 1 (1 quadrante corado) e apenas alguns animais do grupo O e CO apresentaram 1 quadrante corado por fluoresceína. No M2 somente alguns animais dos grupos de tratamento apresentaram 1

quadrante corado, e a partir de M4 até M12 nenhum animal apresentava úlcera de córnea (Fig. 1C).

No TRB a partir do M1 até o M7 a maioria dos animais dos grupos de tratamento apresentaram escore 2 (somente a córnea corada), no M8 somente os grupos O, L e CO apresentaram escore 2 e no M9 e M10 somente o grupo O. Nos M11 e M12 nenhum animal apresentava TRB positivo (Fig. 1D).

Nos valores obtidos da citologia da córnea e conjuntiva no parâmetro escamas córneas (Fig. 2A) no M4 no grupo O apresentou presença moderada e nos grupos L, CO e CL leve presença. No M8 e M12 os grupos O, L e CO apresentaram presença leve de escamas córneas e no grupo CL ausência. Na citologia da conjuntiva no M8 e M12 os grupos O e L apresentaram presença leve de escamas córneas. A presença de células metaplásicas (Fig. 2B) foram encontradas nos momentos M4, M8 e M12 de grau leve, nos grupos O, L, CO e CL. No geral houve ausência de mucina nos grupos avaliados, porém alguns animais apresentaram presença acentuada de mucina neutra (Fig. 2C), no M8 e M12 nos grupo O, contudo, no M4 houve um animal que apresentou mucina ácida (Fig. 2D). Encontrou-se ainda, relação núcleo citoplasma preservada (Fig. 2E) em todos os grupos, dentro de todos os momentos (M0, M4, M8 e M12); na citologia foram raros os casos em que houve presença de células caliciformes (Fig. 2F).

Nos valores obtidos da histopatologia da córnea houve presença de edema de grau leve somente no grupo O, os demais grupos apresentaram a córnea dentro dos padrões de normalidade (Fig. 3A). Congestão (Fig. 3B) ocorreu em alguns animais de grau leve nos grupos O e CO, em todos os grupos, a presença de mucina foi considerada neutra. Na histopatologia da conjuntiva o número de células caliciformes (Fig. 3C e 3D) foi significativamente maior ($P < 0,05$) no grupo CL ($11,2 \pm 3,5$) em relação aos grupos C ($8,0 \pm 2,1$), O ($7,6 \pm 3,7$), L ($9,0 \pm 3,4$) e CO ($8,4 \pm 3,2$). Houve presença leve de células mononucleares nos grupos O e L metaplasia escamosa de grau leve somente no grupo O. Edema e congestão leve nos grupos L e CO e edema e congestão moderados no grupo O.

DISCUSSÃO

Em humanos há relatos de sensação de queimação e irritação da conjuntiva em pacientes que fizeram uso de CsA diluído em óleo de oliva, o que não foi observado clinicamente no presente estudo.^{6,8}

Na comparação dos óleos, o óleo de linhaça apresentou um desempenho melhor do que o óleo de oliva em relação aos parâmetros TLS, TRB, nos achados citológicos e histopatológicos. O grupo O foi que apresentou de uma forma geral, os piores resultados em

relação ao tratamento da CCS, exceto nos achados do TF mostrando similaridade ao grupo L. Possivelmente essas diferenças sejam explicadas pela diferente composição que cada óleo possui. O óleo de oliva apresenta grande quantidade MUFA, 70 a 80% de ácido oleico, e apenas uma pequena quantidade de PUFA (5-10% de ômega 3, 6 e 9).^{9,11} O óleo de semente de linhaça tem na sua composição 16% de ácidos graxos linolêico (ômega-6) e 57% de ácidos graxos alfa-linolênico (ômega-3), sendo uma importante fonte de ômega-6 conhecida, este age bloqueando o metabolismo do ácido araquidônico, transformando os mediadores lipídicos em eicosanóides não inflamatórios pela cicloxigenase 1 (COX1), as prostaglandinas da série 1 (PG1) e o tromboxano A1 (TXA1), além de ser rico em ômega 3, que produz mediadores anti-inflamatórios do ácido alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), podendo justificar a melhora dos sinais clínicos nos animais que receberam o tratamento com a linhaça isoladamente.^{13,25} Estes resultados estão de acordo com os outros relatos que utilizaram formulação tópica contendo ômega 3 e 6, em ratos induzidos experimentalmente para CCS e que apresentaram melhora dos sinais inflamatórios produzidos pela doença, e recentemente um estudo mostrou a comparação óleo de linhaça com o óleo de amêndoas, usado como diluente do tacrolimus, um imunossupressor que também é utilizado no tratamento para CCS, mostrando que a linhaça em associação apresentou um melhor desempenho no tratamento. Outro trabalho recente comparou do uso do óleo de linhaça puro por via oral, tópica e oral e tópica associada, evidenciando efeitos satisfatórios em ambas as vias no tratamento de CCS em coelhos.¹⁹

Na comparação dos grupos com CsA associados aos óleos, o grupo CL e CO apresentaram desempenho similar ao final do experimento nos parâmetros TRFL, TF e TRB, e o grupo CL apresentou melhor desempenho nos valores finais de TLS e no aumento estatisticamente significativo da contagem de células caliciformes. O melhor desempenho do grupo CL nesses parâmetros pode ter ocorrido devido às propriedades anti-inflamatórias do óleo de linhaça, bem como os efeitos de imunossupressão da ciclosporina. Em coelhos experimentalmente induzidos com dacrioadenite autoimune com CCS o uso de CsA 0,05% em emulsão oftálmica (Restasis[®]) promoveu aumento significativo da produção lacrimal.²⁶ Além disso, ação imunossupressora da CsA, minimiza os efeitos inflamatórios induzidos pela CCS na córnea, conjuntiva e células caliciformes. A diminuição da quantidade de células caliciformes pode induzir deficiência de mucina no filme pré-lacrimal e levar a deficiências de lubrificação da córnea, uma vez que as células caliciformes são responsáveis pela produção de mucina, na função de lubrificação ocular.^{5,8}

Na avaliação citológica, no grupo O foram observados maior incidência de processo inflamatório. Na citologia de córnea somente o grupo O apresentou no M4 presença moderada de escamas córneas, enquanto os demais grupos somente presença leve o que denota um processo inflamatório maior nesse grupo, ou seja, as células ganham mais queratina para se proteger da destruição celular.²⁸ Nos achados histopatológicos também demonstram um processo inflamatório maior no grupo O (Fig. 2E), com presença de edema leve na córnea, e na conjuntiva, edema e congestão de grau moderado, enquanto nos demais foi de grau leve além de presença de metaplasia escamosa presente somente nesse grupo, possivelmente devido ao processo inflamatório encontrado, como forma de defesa, a célula modifica seu epitélio, observado ainda presença de grau leve de mononucleares, possivelmente decorrente de processo inflamatório crônico (Fig. 2F).^{5,28} A contagem de células caliciformes foi menor no grupo O do que os demais grupos, apesar de não ser estatisticamente significativo em relação aos grupos C, L e CO, já no grupo CL, os valores foram significativamente maiores do que os demais grupos.

Podemos concluir que a ciclosporina, com seu efeito imunossupressor, diluída em óleo linhaça, possivelmente devido as suas propriedades anti-inflamatórias, e o óleo de linhaça puro, mostrou eficácia maior no tratamento da CCS induzida em coelhos, enquanto que o óleo de oliva puro demonstrou menor eficácia na maior parte dos parâmetros avaliados. Estes resultados podem contribuir para criação de novas formulações oftálmicas no tratamento de KCS no futuro.

REFERÊNCIAS

1. Miller PE. Lacrimal system. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 4th edn. (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. Benitez del Castillo JM, Del Aguila C, Duran S *et al.* Influence of topically applied cyclosporine A in olive oil on corneal epithelium permeability. *Cornea* 1994; **13**:136-140.
4. 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 of Veterinary Research* 2002; **63**:688-694.

5. Kunert KS, Tisdale, AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Archives of Ophthalmology* 2002; **120**:330-337.

6. Yavuz B, Pehlivan SB, Ünlü N. An overview on dry eye treatment: approaches for cyclosporine A delivery. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 194848.

7. Liang H, Baudouin C, Daull P *et al.* Ocular safety of cationic emulsion of cyclosporine in an in vitro corneal wound-healing model and an acute in vivo rabbit model. *Molecular Vision* 2012; **18**:2195-2204.

8. Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A. *Ocular Immunology and Inflammation* 2010; **18**:352-361.

9. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review* 2007; **12**:331-342.

10. Al-Azzawie HF, Alhamdanim SS. Hipoglycemic and antioxidant effects of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science* 2006; **78**:1371-1377.

11. Wardhana EE, Surachmanto EAD. The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation. *Acta Medica Indonesiana* 2011; **43**:138-142.

12. Eidi A, Moghadam-Kia S, Moghadam JZ *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (*Olea europae* L.) in mice. *Pharmaceutical Biology* 2012; **50**:332-337.

13. Oomah BD. Flaxseed as functional source. *Journal of Science and Food Agriculture* 2001; **81**:889–894.

14. Roncone M, Bartlett H, Eperjesi, F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010; **33**:49-54, 2010.

15. Wojtowicz JC, Butovich I, Uchiyama E *et al.* Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea* 2011; **30**:308-314.
16. Neves ML, Yamasaki L, Sanches OC *et al.* Use of linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 2013;**3**:4: 1-5.
17. Sgrignoli MR, Yamasaki L, Sanches OC *et al.* Comparison of topical 0.03% tacrolimus in almond and linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *International Journal of Ophthalmic Pathology* 2013; **2**:3.
18. Rashid S, Jin Y, Ecoiffer T *et al.* Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Archives of Ophthalmology* 2008; **126**:210-225.
19. 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.
20. Buralassi S, Panichi L, Chetoni, PE *et al.* Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmology Research* 1999; **31**:229-235.
21. El-Shazly AH, El-Gohrany AH, El-Shazly LH *et al.* Comparison between two cyclooxygenase inhibitors in an experimental dry eye model in albino rabbits. *Acta Pharmaceutica* 2008; **58**: 163-173, 2008.
22. Shafaa MW, El Shazly LH, AH. El Shazly AH *et al.* Efficacy of topically applied liposome-bound tetracycline in the treatment of dry eye model. *Veterinary Ophthalmology* 2011, **14**: 18-25.
23. Maggs DJ. Basic diagnostic techniques. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 4th edn. (eds Maggs DJ, Miller PE, Ofri R) Saunders Elsevier, St. Louis, 2008; 81–106.

24. Wei XE, Markoulli M, Zhao Z. Tear film break-up time in rabbits. *Clinical and Experimental Optometry* 2013; **96**: 70–75.
25. Hassan-Zadeh A, Sahari MA, Barzegar M. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. *International Journal of Food and Science Nutrition* 2008; **59**:526–534.
26. Thomas PB, Samant DM, Zhu Z *et al.* Long-term topical cyclosporine treatment improves tear production and reduces keratoconjunctivitis in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2009; **25**:285-291.
27. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucin (Review). *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**:71–77.
28. Vinay K, Abul KA, Jon CA *et al.* Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed, Saunders Elsevier, St. Louis, 2009.

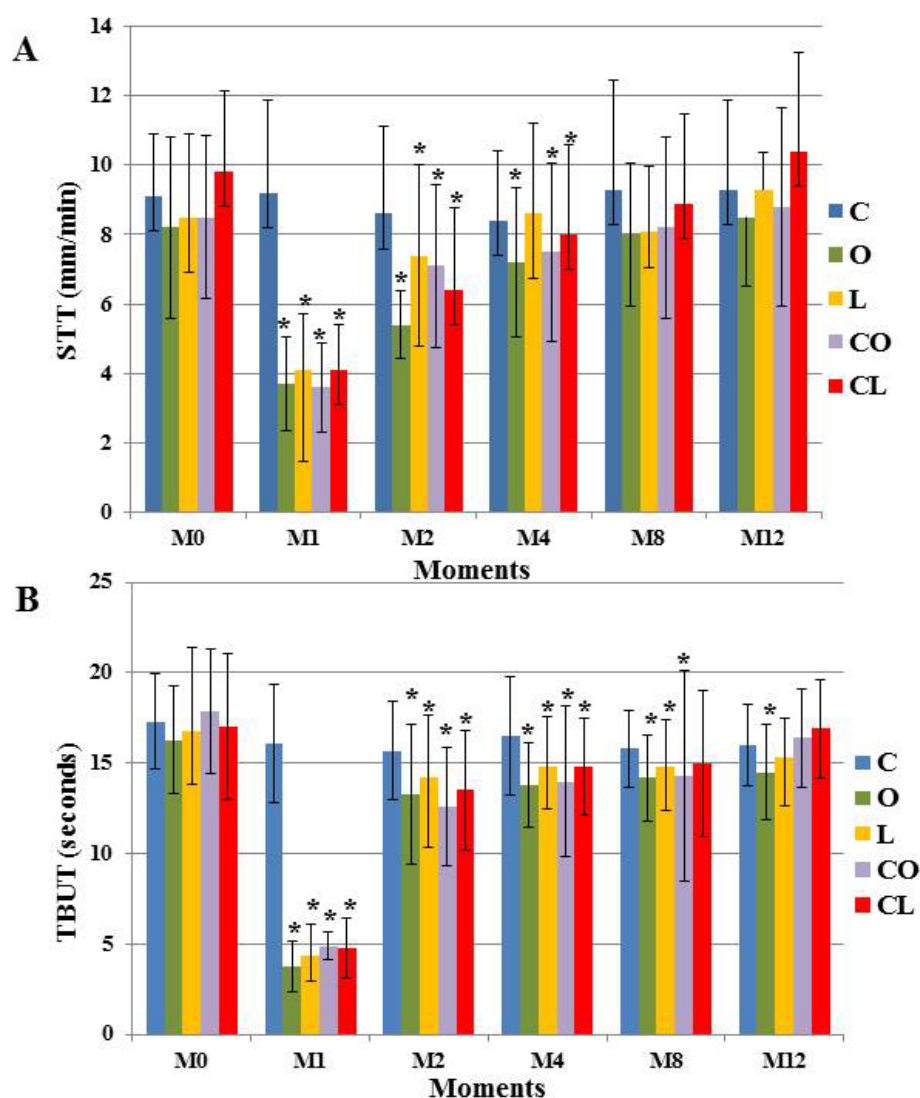


Figura 1. Médias e desvios padrão dos valores obtidos do Teste Lacrimal de Schirmer^a (TLS) em mm/min (A) e do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal^b (TRFL) em segundos (B). Coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite eca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C), óleo de oliva puro (O), óleo de semente de linhaça puro (L), ciclosporina 1% diluído em óleo de oliva (CO), ciclosporina 1% diluído em óleo de semente de linhaça (CL).

^avalores ≤ 5 mm/min = positivo para CCS

^bvalores ≤ 5 segundos = positivo para CCS

*p < 0,05 (Teste de Tukey) em relação ao M0

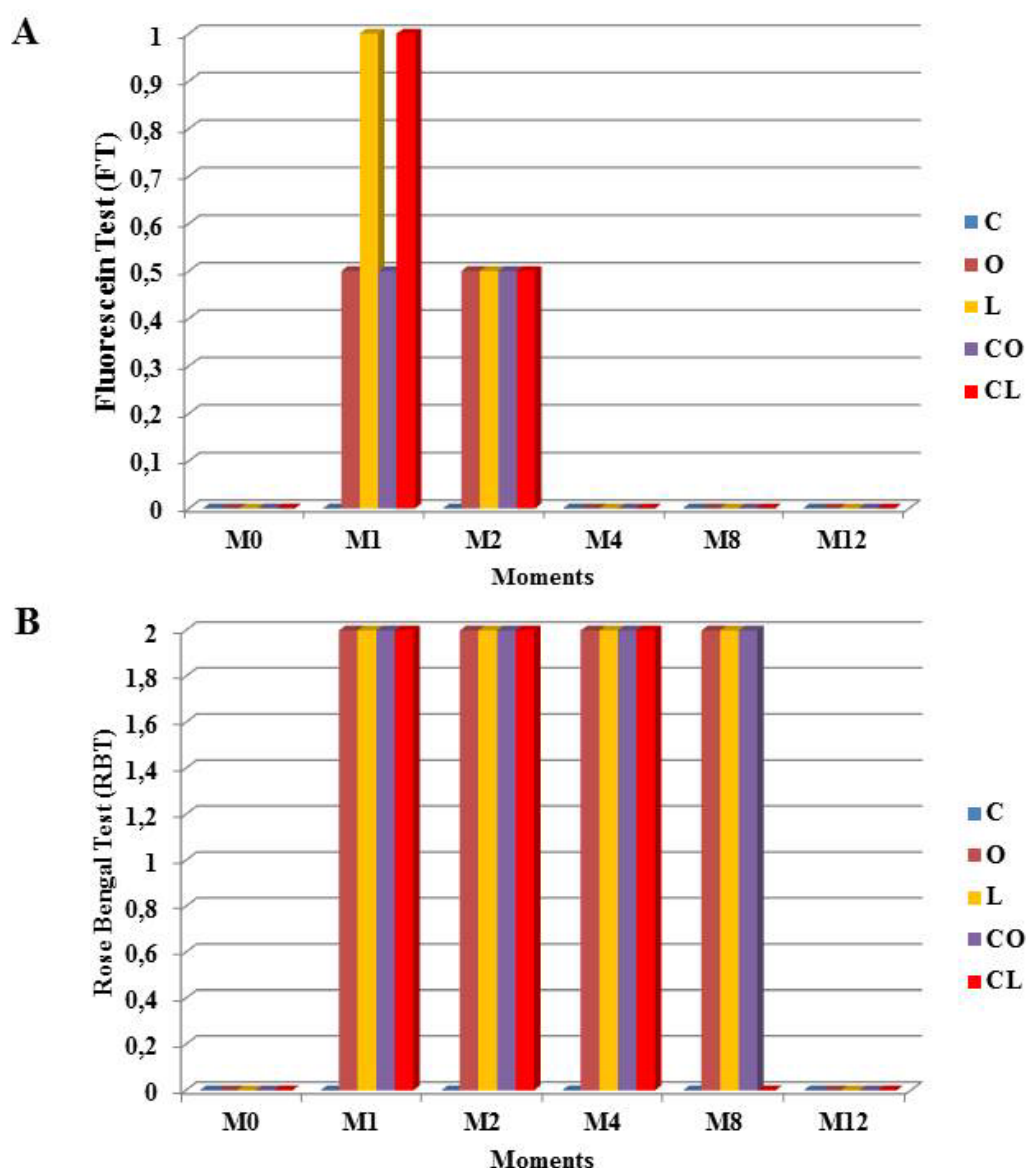


Figura 2. Medianas dos valores obtidos do Teste de Fluoresceína^c (TF) (C) e do Teste de Rosa Bengala^d (TRB) (D). Coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite eca (CCS) e tratados com diferentes tipos de colírios: placebo (grupo C), óleo de oliva puro (O), óleo de semente de linhaça puro (L), ciclosporina 1% diluído em óleo de oliva (CO), ciclosporina 1% diluído em óleo de semente de linhaça (CL).

^a(0) sem corar; (1) 1 quadrante corado; (2) 2 quadrantes corados; (3) 3 quadrantes corados; (4) 4 quadrantes corados

^b(0) sem corar; (1) somente conjuntiva corada; (2) somente córnea corada; (3) córnea e conjuntiva coradas

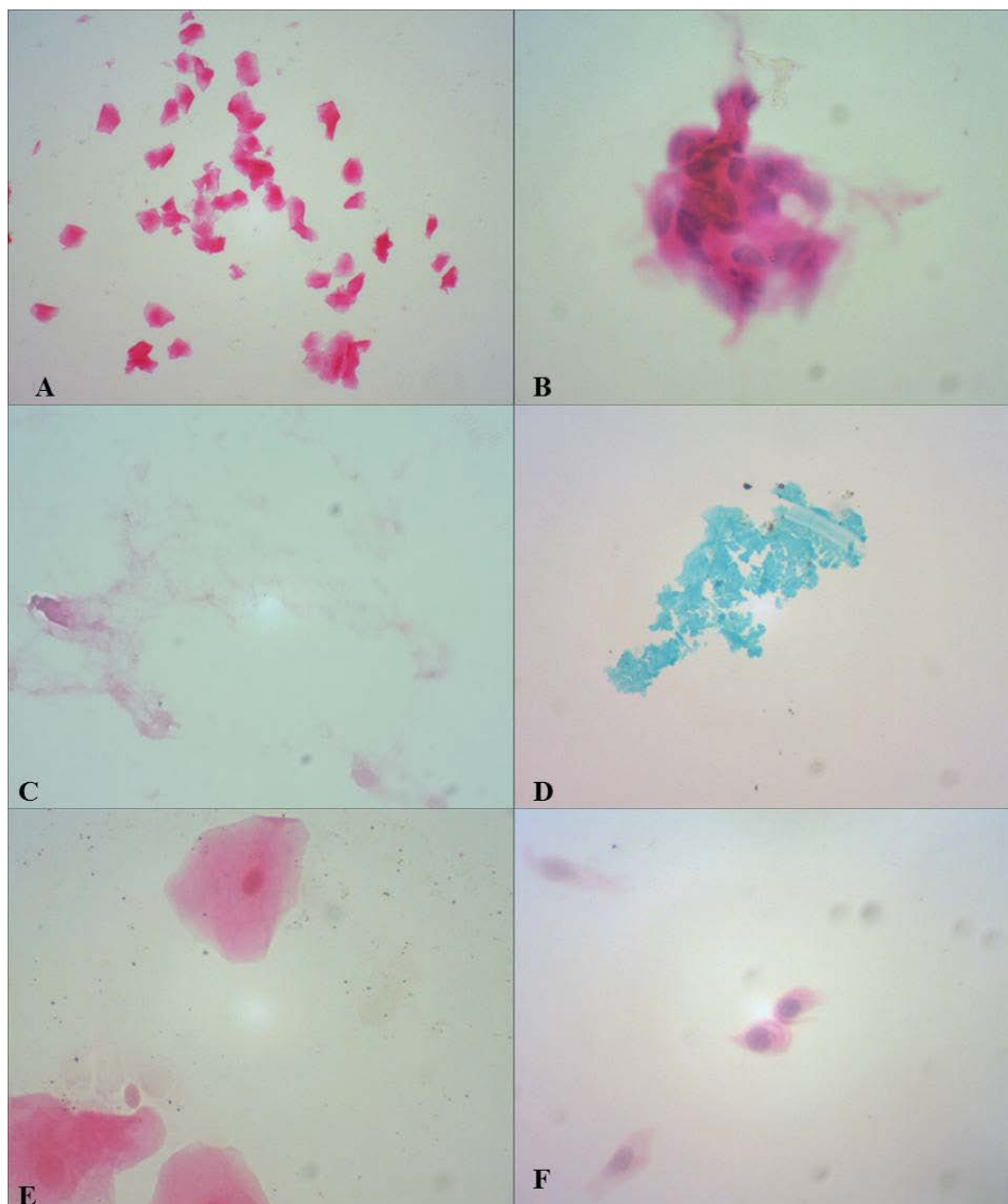


Figura 3. Esfregaços citológicos: (A) Escamas córneas no M4 do Grupo CO (ciclosporina 1% em óleo de oliva) (Hematoxilina-eosina, 100x). (B) Células metaplásicas no M8 do Grupo O (óleo de linhaça) (Hematoxilina-eosina, 400x). (C) Muco neutro M4 do Grupo C (controle) (PAS-Azul de Alcian, 100x). (D) Muco ácido no M4 do Grupo O (óleo de oliva) (PAS-Azul de Alcian, 100x). (E) Célula escamosa com volume nuclear normal no M4 do Grupo L (óleo de linhaça) (Hematoxilina-eosina, 400x). (F) Célula caliciforme no M8 do Grupo CO (ciclosporina 1% em óleo de oliva) (Hematoxilina-eosina, 400x).

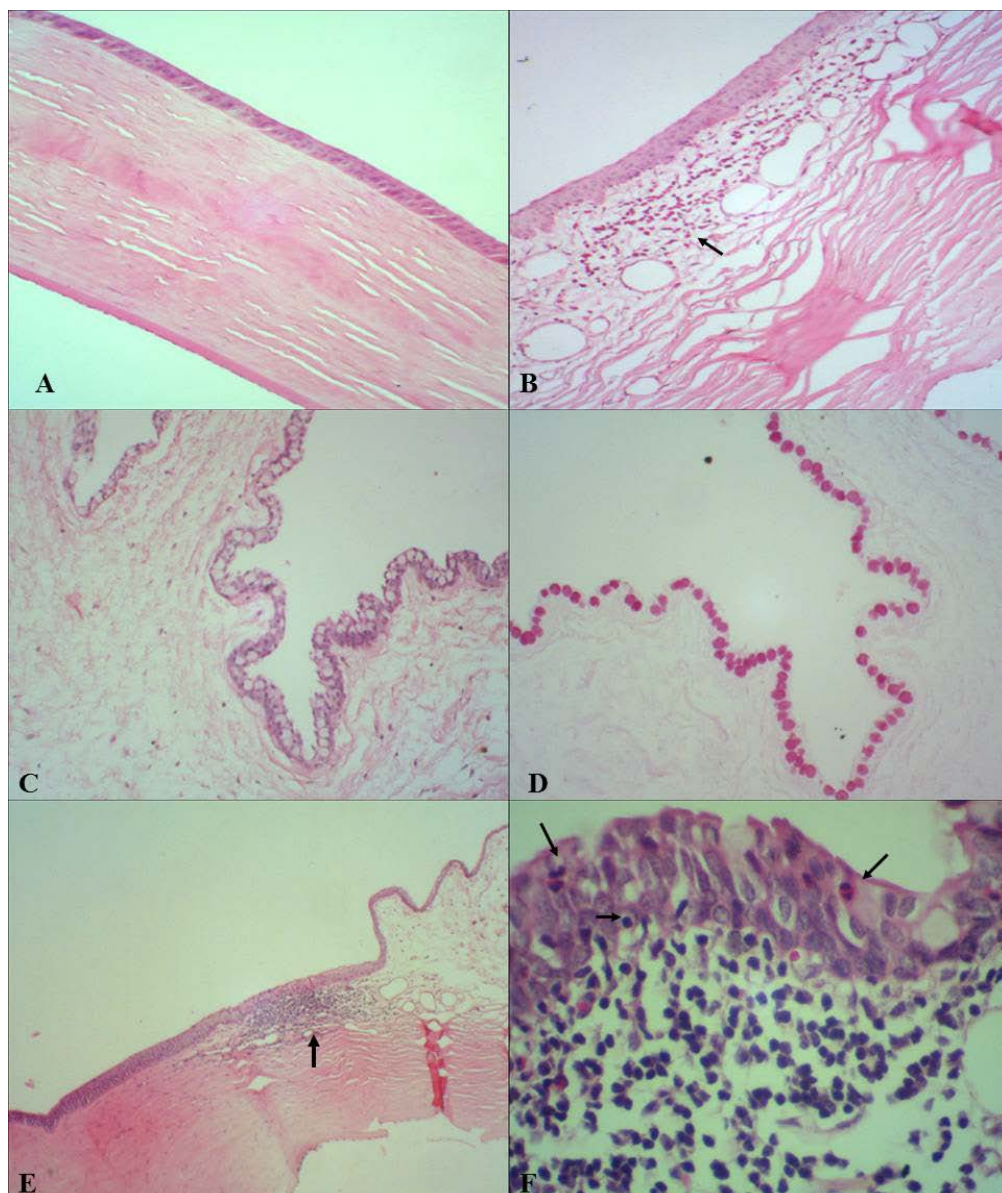


Figura 4. Exame histopatológico: (A) Córnea normal no M12 do Grupo C (controle) (Hematoxilina-eosina, 100x). (B) Conjuntiva com infiltrado de eosinófilos (seta) e congestão vascular no M12 do Grupo O (óleo de oliva) (Hematoxilina-eosina, 100x). (C) Conjuntiva com grande número de células caliciformes no M12 do Grupo CL (ciclosporina 1% em óleo de linhaça) (Hematoxilina-eosina, 100x). (D) Células caliciformes no M12 do Grupo CL (ciclosporina 1% em óleo de linhaça) (PAS-Azul de Alcian, 100x). (E) Processo inflamatório crônico focal na transição conjuntiva e córnea (seta) no M12 do Grupo CO (ciclosporina 1% em óleo de oliva) (Hematoxilina-eosina, 40x). (F) Detalhe do processo inflamatório crônico na conjuntiva com agressão do epitélio (setas) no M12 do Grupo O (óleo de oliva) (Hematoxilina-eosina, 400x).

Comparison of 1% cyclosporine eye drops in olive and linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits

Leticia Rodrigues Parrilha¹, Gisele Alborghetti Nai², Osimar de Carvalho Santos³, Rafael Cabral Barbero⁴, Leticia Dias Fabris Padovani⁴, Ricardo Henrique Zaquir Pereira⁴, Danielle Alves Silva⁵, Mariele Catherine Alves Silva⁵, Miriely Stein Diniz⁵ and Silvia Franco Andrade⁶

¹ Post-Graduate Program in Animal Science, University of Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, São Paulo, 19001-970, Brazil;

²Department of Human Anatomy Pathology (UNOESTE); ³Department of Veterinary Anatomy Pathology (UNOESTE); ⁴Faculty of Veterinary Medicine (UNOESTE); ⁵Veterinary Hospital Resident (UNOESTE); ⁶Department of Small Animal Medicine (UNOESTE).

*Corresponding author: S.F. Andrade Tel: +55-18-32292067; Fax: +55-18-32292036
e-mail address: silviafranco@unoeste.br

Running title: Cyclosporine 1% in olive and linseed oil on KCS rabbits

Abstract

Objective To evaluate the effectiveness of topical 1% cyclosporine eye drops diluted in two vehicles, olive and linseed oil, and the oils separately, in treating experimentally induced keratoconjunctivitis sicca (KCS) in rabbits.

Procedure Twenty-five male New Zealand white rabbits were divided into five groups, one group control (C) without dry eye induction and four treatment groups in which KCS was induced, CO (cyclosporine in olive oil), CL (cyclosporine in linseed oil), O (olive oil) and (linseed oil). The animals were evaluated using the Schirmer's Tear Test I (STT I), Fluorescein Test (FT), Tear Break Up Time (TBUT), Rose Bengal Test (RBT), cytology and histopathological analysis.

Results There was significant increase in the values of STT and TBUT in all the treated groups after the induction of KCS, with the greatest increase of STT in group CL. Regarding FT, there was a more rapid resolution of corneal ulcers observed in the groups O and L. For RBT, group O showed the least favorable results. The groups L and CL presented less edema and cornea congestion. There was significant increase in the number of caliciform cells in all of the treated groups, with the greatest change observed in group CL.

Conclusion The cyclosporine diluted in linseed oil or olive oil was efficient in the treatment of KCS. However, the linseed oil presented better effectiveness, whether associated or not, compared to the olive oil. These results may contribute to create new topical ophthalmic formulations for the treatment of KCS in the future.

Key words: cyclosporine, olive oil, linseed oil, keratoconjunctivitis sicca, rabbits

INTRODUCTION

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) or dry eye is characterized by decreased tear production and/or increased tear film evaporation. The clinical signs of KCS include ocular discomfort, conjunctival hyperemia, mucoid to purulent ocular discharge, blepharitis, chemosis, corneal

ulceration, corneal vascularization and opacification, pigmentation, keratinization and blindness. Immune-mediated inflammation of the lacrimal glands is one of the most frequent causes of dry eye, and the use of topical immunosuppressive drugs such as cyclosporine, tacrolimus and pimecrolimus are indicated, in addition to artificial tears, corticosteroids, mucolytics, pilocarpine and antibiotics.^{1,2}

Cyclosporine A (CsA) is derived from the mushroom *Tolypocladium inflatum* and is a non-cytotoxic immunosuppressor that inhibits the proliferation of T lymphocytes by inhibiting interleukin-2 synthesis at the transcription level.^{3,4} CsA use has been shown to increase tear secretion, increase the number of calciforms cells and decrease the incidence of corneal ulcers by interrupting the autoimmune anti-inflammatory reaction.^{4,5} CsA eye drops are marketed in concentrations up to 0.05% in polyvinilic alcohol, to 0.05% in an anionic ophthalmic emulsion (Restasis[®]), glycerin base, beaver oil and polysorbate 80, to 1 and 2% in eye drops in an oily vehicle (olive oil) and to 0,2% in ophthalmic ointment.^{6,7} Some adverse effects of the use of ocular topical CsA described in humans include allergy, burn sensation and irritation of the conjunctiva.^{6,8}

Olive oil, *Olea europaeae*, contains a great amount of monounsaturated fatty acids (MUFA), of which 70-80% are oleic acid, 10-15% of saturated fatty acids (palmitic acid), and 5 to 10% of omega 3 (ω -3), 6 (ω -6) and 9 (ω -9) polyunsaturated fatty acids (PUFA).⁹ Olive oil has been shown to possess antinociceptive, anti-inflammatory, antiarrhythmic, espasmolitic, immunostimulant, cardioprotective, hypotensive, hypoglycemiant and antimicrobial properties.¹⁰⁻¹²

Linseed oil, *Linum usitatissimum*, is composed of 57% ω -3, 16% ω -6, 28% monounsaturated fatty acids, and only 9% unsaturated fatty acids, and the ω -3-to- ω -6 ratio of 1:3 is considered close to ideal.¹³ In human ophthalmology, linseed oil is given orally as an adjuvant therapy in patients with Sjögren's syndrome and KCS.^{14,15} Some authors describe

the use of linseed oil in treatment of experimentally induced KCS in rabbits in various preparations (oral, topical, and oral/topical combination).^{16,17} In rats with experimentally induced KCS, the topical use of ω -3 and ω -6 has been shown to successfully control inflammatory symptoms.¹⁸ Linseed oil is considered a natural anti-inflammatory agent because of its potential in synthesizing non-inflammatory mediators, such as prostaglandin E 1 (PGE1) and thromboxane A1 (TXA1).^{18,19}

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of 1% cyclosporine eye drops, a potent immunosuppressor used in the treatment of KCS, diluted in two types of vehicles, olive oil, which is already used as a vehicle of cyclosporine, and linseed oil, in addition to the isolated use of each oil, in the treatment of experimentally induced KCS in rabbits.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of UNOESTE (protocol no. 720). Twenty-five male New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), approximately 9 to 34 months of age and weighing 3 to 5 kg, were kept in individual metal cages with water and food ad libitum.

The induction model of KCS in rabbits was based on previously published studies,^{16,17,20-22} which used atropine sulfate 1% eye drops TID. Eye drops were administered until the diagnosis of KCS was confirmed by Schirmer's tear test (STT) result of ≤ 5 mm/min and/or ≤ 10 seconds tear break up time (TBUT),^{23,24} and throughout the treatment period (12 weeks) for KCS maintenance.

Of the 25 rabbits, 20 were induced using the KCS protocol, and 5 were allocated to the uninduced control group. Beginning at one week after KCS induction, the 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 CO (1 drop of 1% cyclosporine in olive oil,

topically BID in both eyes), Group CL (1 drop of 1% cyclosporine in linseed oil, topically BID in both eyes), Group O (1 drop of olive oil, topically BID in both eyes) and Group L (1 drop of linseed oil, topically BID in both eyes). All ophthalmic experimental formulations were prepared by Ophthalmos Laboratory, São Paulo, Brazil.

The following ocular tests were performed in moments M0 (before the induction of KCS), M1 (1 week after the induction of KCS), M2 (2 weeks after the induction), M3 (3 weeks after the induction), M4 (4 weeks after the induction), M8 (8 weeks after the induction) and M12 (12 weeks after the induction). Schirmer's Tear Test I (STT I) was performed without anesthetic eye drops and was used to determine the quantitative tear production, and values of ≤ 5 mm/min were considered positive for KCS. The tear break up time (TBUT) for evaluation of the quality of the tear was performed two times successively, the average was calculated, and values ≤ 10 seconds were considered positive for KCS. The fluorescein test (FT) was performed with 1% fluorescein strips moistened with a small amount of normal saline to observe stained corneal ulcers in 4 quadrants (temporal superior, temporal inferior, nasal superior and nasal inferior) and was scored 0 to 4: (0) without staining; (1) 1 quadrant staining; (2) 2 quadrants staining; (3) 3 quadrants staining; (4) 4 quadrants staining. The Rose Bengal test (RBT) was performed to stain cells devitalized by KCS. Anesthetic eye drops (proxymetacaine 0.5%) were instilled, followed by 1 drop of Rose Bengal 0.5%. The following scoring scale was used from 0 to 3: (0) without staining; (1) only conjunctive staining; (2) only cornea staining; (3) conjunctive and cornea staining.

23,24

Conjunctival and corneal cytology was performed at M0, M4, M8, and M12. The animals received anesthetic eye drops, and the conjunctival surfaces (superior and inferior) and cornea of both eyes were gently scraped using a swab that had been moistened in physiologic saline solution. The scraped material was then fixed in methanol and stained

using the May-Grunwald-Giemsa (MGG) technique. For histopathological analysis, the rabbits were euthanized at the end of the experiment (M12) using 2.5% sodium thiopental (200 mg/ kg) administered intravenously. After transpalpebral enucleation, the eyeball was placed in a 10% formaldehyde solution for 24 to 48 hours. The eyes were stored in 70% alcohol and then routinely processed and embedded in paraffin. Corneal and conjunctival sections (5 μ m thick) were obtained and stained with hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS). The parameters observed for the cornea and conjunctiva were as follows: edema, cellular degeneration, necrosis, inflammatory infiltrate (neutrophilic, mononuclear and mixed) and caliciform cell count (conjunctiva bulbar).

The STT, TBUT variables and density of caliciform cells were compared between groups using the variance analysis test (ANOVA) for paired samples, in contrast to Tukey's method. In the tests mentioned above, the assumptions of data normality and variance homogeneity were validated by the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. A significance level of $P < 0.05$ was adopted.

RESULTS

Group C (control) exhibited normal parameters throughout the entire experimental period. In the treatment groups, the STT values were significantly decreased below 5 mm/min ($P < 0.05$) at M1. Beginning at M2, the STT values increased, with group CL presenting the largest increase in the treatment groups, primarily from M8 to M12 (Fig. 1A). The TBUT values showed a statistically significant decrease ($P < 0.05$) below 5 seconds in the treatment groups at M1. The TBUT values increased at M2 in the treatment groups but were still statistically inferior in relation to M0 ($P < 0.05$) in group O until M12. At M12, the values were close to M0 in groups CO and CL (Fig. 1B).

All animals in groups L and CL and a few rabbits in groups O and CO showed an FT score of 1 (1 staining quadrant) at M1. At M2, only some animals of the treatment groups

presented score 1, and from M4 to M12, no animal showed corneal ulceration (Fig. 1C). From M1 to M7, most of the animals of the treatment groups presented a score of 2 (only cornea staining) on RBT. At M8, only groups O, L and CO presented a score of 2, and in M9 and M10, only group O showed RBT scores of 2. At M11 and M12, no animal presented RBT positive (Fig. 1D).

Cytologic analysis of the cornea was performed to evaluate the presence of squamous corneal epithelial cells (Fig. 2A). At M4, group O showed a moderate presence of squamous corneal epithelial cells, and a slight presence was observed in groups L, CO and CL. At M8 and M12, groups O, L and CO showed slight presence of squamous corneal epithelial cells, but the cells were absent in group CL. In the cytology of the conjunctiva at M8 and M12, groups O and L showed slight presence of squamous cells. The presence of metaplastic cells (Fig. 2B) was noted at M4, M8 and M12 to a slight degree in groups O, L, CO and CL. In general, there was mucin absence in the treated groups, however some animals presented accentuated presence of neutral mucin (Fig. 2C) at M8 and M12 in group O. However, in M4, one animal that presented acid mucin (Fig. 2D). The nuclear:cytoplasmic ratio was preserved (Fig. 2E) in all groups and moments. Cytology revealed the rare presence of caliciform cells (Fig. 2F).

The histopathological results of the cornea show that slight edema was present in group O (Fig. 3A) and slight congestion (Fig. 3B) in some animals in groups O and CO. In all of the groups, the mucin presence was considered neutral. The histopathological results of the conjunctiva show that there was a slight presence of mononuclear cells in groups O and L, a slight presence of squamous metaplasia in group O, slight edema and congestion in groups L and CO and moderate edema and congestion in group O. There was a statistically significant ($P<0.05$) increase in the number of caliciform cells (Figs. 3C and 3D) or goblet cell density

in group CL ($11,2 \pm 3,5$) in relation to groups C ($8,0 \pm 2,1$), O ($7,6 \pm 3,7$), L ($9,0 \pm 3,4$) and CO ($8,4 \pm 3,2$).

DISCUSSION

In humans, there are reports of a burning sensation and irritation of the conjunctiva in patients that use CsA diluted in olive oil, but this effect was not clinically observed in the present study.^{6,8}

In the comparison of the oils, linseed oil showed a more favorable effect than did olive oil in relation to the parameters STT, TBUT, RBT and in the cytological and histopathological results. Group O, in general, presented the worst results in relation to the treatment of KCS, except in the FT results, which showed similarity to the results of group L. Those differences may be explained by the different composition that each oil possesses. Olive oil contains a large quantity of MUFA (70 to 80% oleic acid) and just a small amount of PUFA (5-10% of ω -3, ω -6 and ω -9).^{9,11} Linseed oil is comprised of 16% ω -6 and 57% ω -3, which are natural anti-inflammatory agents because of their potential for synthesizing non-inflammatory mediators.^{13,25} The ω -6 origin of PGE1 and TXA1 via cyclooxygenase 1 (COX1) and the effects of the ω -3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosapentaenoic acid (DHA) could explain the improvement of the clinical signs in the animals that received the treatment with linseed oil.¹⁹

These results are in agreement with a study that used a topical formulation containing ω -3 and ω -6 fatty acids on rats with experimentally induced KCS that showed an improvement in the inflammatory symptoms of KCS.¹⁸ A recent study compared almond and linseed oil as diluents of tacrolimus, another immunosuppressor, in the treatment of KCS in rabbits and showed that linseed oil either as the diluent or isolated was more effective in the treatment of KCS.¹⁷ Another study evaluated the effectiveness of various linseed oil preparations (oral, topical, and an oral/topical combination) in treating experimentally

induced KCS in rabbits and concluded that orally or topically administered linseed oil was effective in the treatment of KCS, although the combined oral/topical treatment did not show additional benefits.¹⁶

In the comparison of the CsA groups with the oils, groups CL and CO presented similar results at the end of the experiment in the TBUT, FT and RBT parameters, and group CL presented better results in the final values of STT and a significant increase of caliciform cell density. The better results of group CL in those parameters might have occurred due to the combination of the anti-inflammatory properties of the linseed oil with the immunosuppressor effects of the cyclosporine. This result is in agreement with the study that used tacrolimus, another immunosuppressor used in KCS treatment, where the group using tacrolimus diluted with linseed oil showed better improvement in KCS control in rabbits and increased caliciform cell density in the conjunctiva.¹⁷ In rabbits with KCS induced by autoimmune dacryoadenitis, the use of CsA 0,05% in ophthalmic emulsion (Restasis®) promoted significant increase of the tear production.²⁶ These CsA effects are due to the immunosuppressive action that minimizes the inflammatory damage induced by KCS in the cornea, conjunctiva and caliciform cells.^{5,8} The increased density of caliciform cells is very important in KCS syndrome because decreased caliciform cell density can induce mucin deficiency in the pre-corneal tear film and may result in ulcerated corneas with irregular surfaces.^{2,27}

In the cytological results, inflammatory processes were observed more frequently in group O. In the cornea, cytology revealed a moderate presence of squamous cells only in group O at M4, while the other groups showed only a light squamous cell presence, which denotes a larger inflammatory process in group O. In other words, the epithelial cells produce more keratin to protect against cellular destruction.²⁸ The histopathological results also demonstrate a larger inflammatory process in the group O (Fig. 2E), with the presence of

slight edema in the cornea and moderate edema and congestion in the conjunctive.

Additionally, only group O demonstrated squamous metaplasia, which was most likely due to chronic ocular inflammation (Fig. 2F).^{5,28} The caliciform cells density was lower in group O than in the other groups, but it was not statistically significant in relation to groups C, L and CO. In group CL, the caliciform cell density was significantly increased compared to the other groups.

We conclude that cyclosporine diluted in olive oil and linseed oil was efficient in the treatment of experimentally induced KCS in rabbits. However, linseed oil, when used alone or as a diluent for cyclosporine, was more effective at treating KCS than was olive oil. The olive oil alone presented the worst efficacy in most of the appraised parameters. This study reveals that both cyclosporine's immunosuppressive effect and its oil vehicles, mainly linseed oil due to its anti-inflammatory properties, are responsible for the improvement of dry eye symptoms. These results may contribute to create new topical ophthalmic formulations for the treatment of KCS in the future.

REFERENCES

1. Miller PE. Lacrimal system. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 4th edn. (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. Benitez del Castillo JM, Del Aguila C, Duran S *et al.* Influence of topically applied cyclosporine A in olive oil on corneal epithelium permeability. *Cornea* 1994; **13**:136-140.
4. 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 of Veterinary Research* 2002; **63**:688-694.

5. Kunert KS, Tisdale, AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Archives of Ophthalmology* 2002; **120**:330-337.

6. Yavuz B, Pehlivan SB, Ünlü N. An overview on dry eye treatment: approaches for cyclosporine A delivery. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 194848.

7. Liang H, Baudouin C, Daull P *et al.* Ocular safety of cationic emulsion of cyclosporine in an in vitro corneal wound-healing model and an acute in vivo rabbit model. *Molecular Vision* 2012; **18**:2195-2204.

8. Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A. *Ocular Immunology and Inflammation* 2010; **18**:352-361.

9. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review* 2007; **12**:331-342.

10. Al-Azzawie HF, Alhamdanim SS. Hypoglycemic and antioxidant effects of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science* 2006; **78**:1371-1377.

11. Wardhana EE, Surachmanto EAD. The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation. *Acta Medica Indonesiana* 2011; **43**:138-142.

12. Eidi A, Moghadam-Kia S, Moghadam JZ *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (*Olea europaea* L.) in mice. *Pharmaceutical Biology* 2012; **50**:332-337.

13. Oomah BD. Flaxseed as functional source. *Journal of Science and Food Agriculture* 2001; **81**:889–894.

14. Roncone M, Bartlett H, Eperjesi, F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010; **33**:49-54, 2010.

15. Wojtowicz JC, Butovich I, Uchiyama E *et al.* Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea* 2011; **30**:308-314.
16. Neves ML, Yamasaki L, Sanches OC *et al.* Use of linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 2013;**3**:4: 1-5.
17. Sgrignoli MR, Yamasaki L, Sanches OC *et al.* Comparison of topical 0.03% tacrolimus in almond and linseed oil to treat experimentally induced keratoconjunctivitis sicca in rabbits. *International Journal of Ophthalmic Pathology* 2013; **2**:3.
18. Rashid S, Jin Y, Ecoiffer T *et al.* Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Archives of Ophthalmology* 2008; **126**:210-225.
19. 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.
20. Burgalassi S, Panichi L, Chetoni, PE *et al.* Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmology Research* 1999; **31**:229-235.
21. El-Shazly AH, El-Gohrany AH, El-Shazly LH *et al.* Comparison between two cyclooxygenase inhibitors in an experimental dry eye model in albino rabbits. *Acta Pharmaceutica* 2008; **58**: 163-173, 2008.
22. Shafaa MW, El Shazly LH, AH. El Shazly AH *et al.* Efficacy of topically applied liposome-bound tetracycline in the treatment of dry eye model. *Veterinary Ophthalmology* 2011, **14**: 18-25.
23. Maggs DJ. Basic diagnostic techniques. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 4th edn. (eds Maggs DJ, Miller PE, Ofri R) Saunders Elsevier, St. Louis, 2008; 81–106.

24. Wei XE, Markoulli M, Zhao Z. Tear film break-up time in rabbits. *Clinical and Experimental Optometry* 2013; **96**: 70–75.
25. Hassan-Zadeh A, Sahari MA, Barzegar M. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. *International Journal of Food and Science Nutrition* 2008; **59**:526–534.
26. Thomas PB, Samant DM, Zhu Z *et al.* Long-term topical cyclosporine treatment improves tear production and reduces keratoconjunctivitis in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2009; **25**:285-291.
27. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucin (Review). *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**:71–77.
28. Vinay K, Abul KA, Jon CA *et al.* Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed, Saunders Elsevier, St. Louis, 2009.

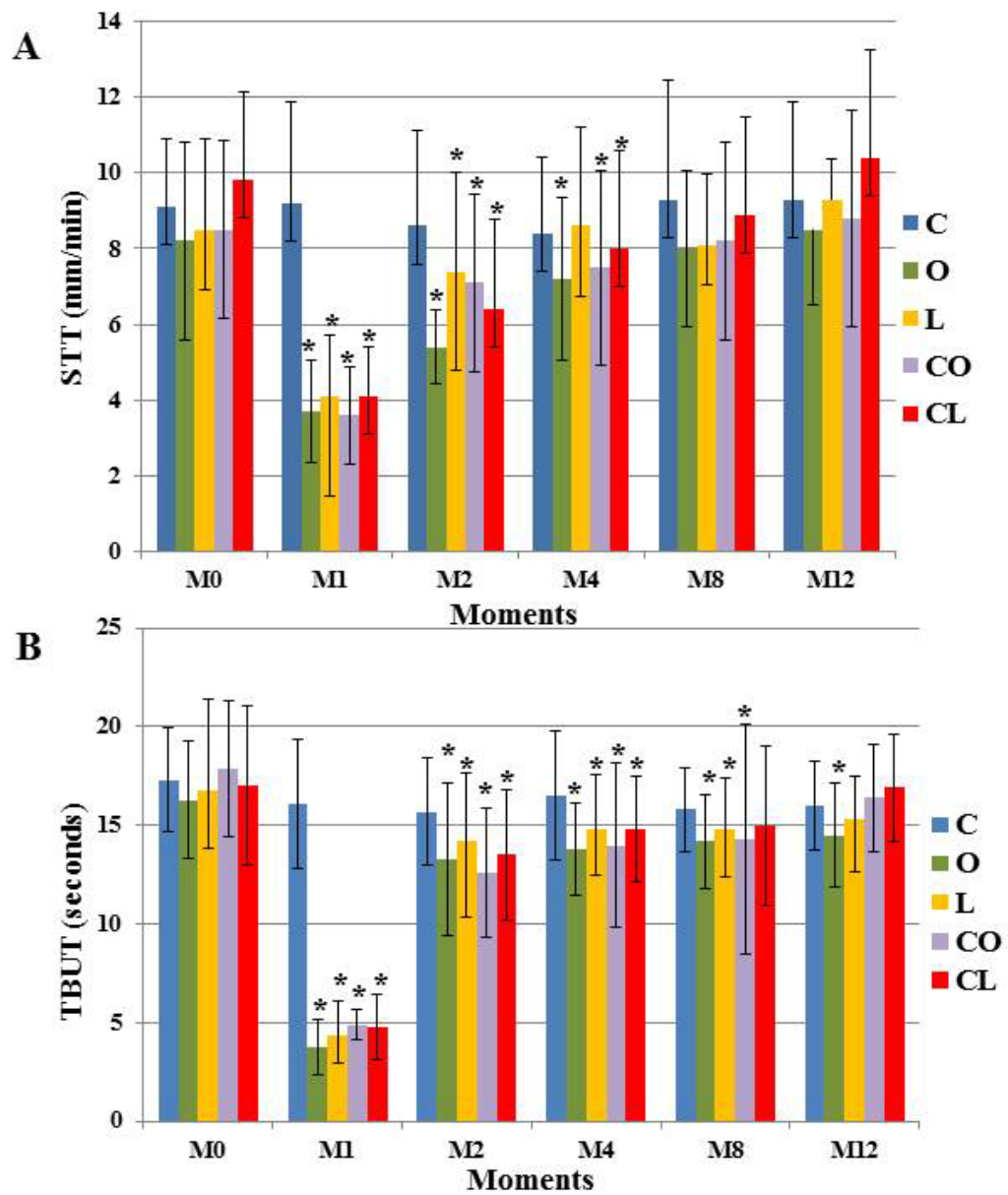


Figure 1. Mean $\pm$ SD results of (A) Schirmer's Tear Test I (STT I)^a values in mm/min and (B) Tear Break Up Time (TBUT)^b values in seconds, in rabbits with experimentally induced KCS that were treated with various topical formulations: placebo (group C); olive oil (group O); linseed oil (group L); 1% cyclosporine in olive oil (group CO) and 1% cyclosporine in linseed oil (group CL).

^aSTT I values ≤ 5 mm/min (KCS-positive)

^bTBUT values ≤ 10 seconds (KCS-positive)

* $P < 0.05$ (Tukey's test, compared to M0)

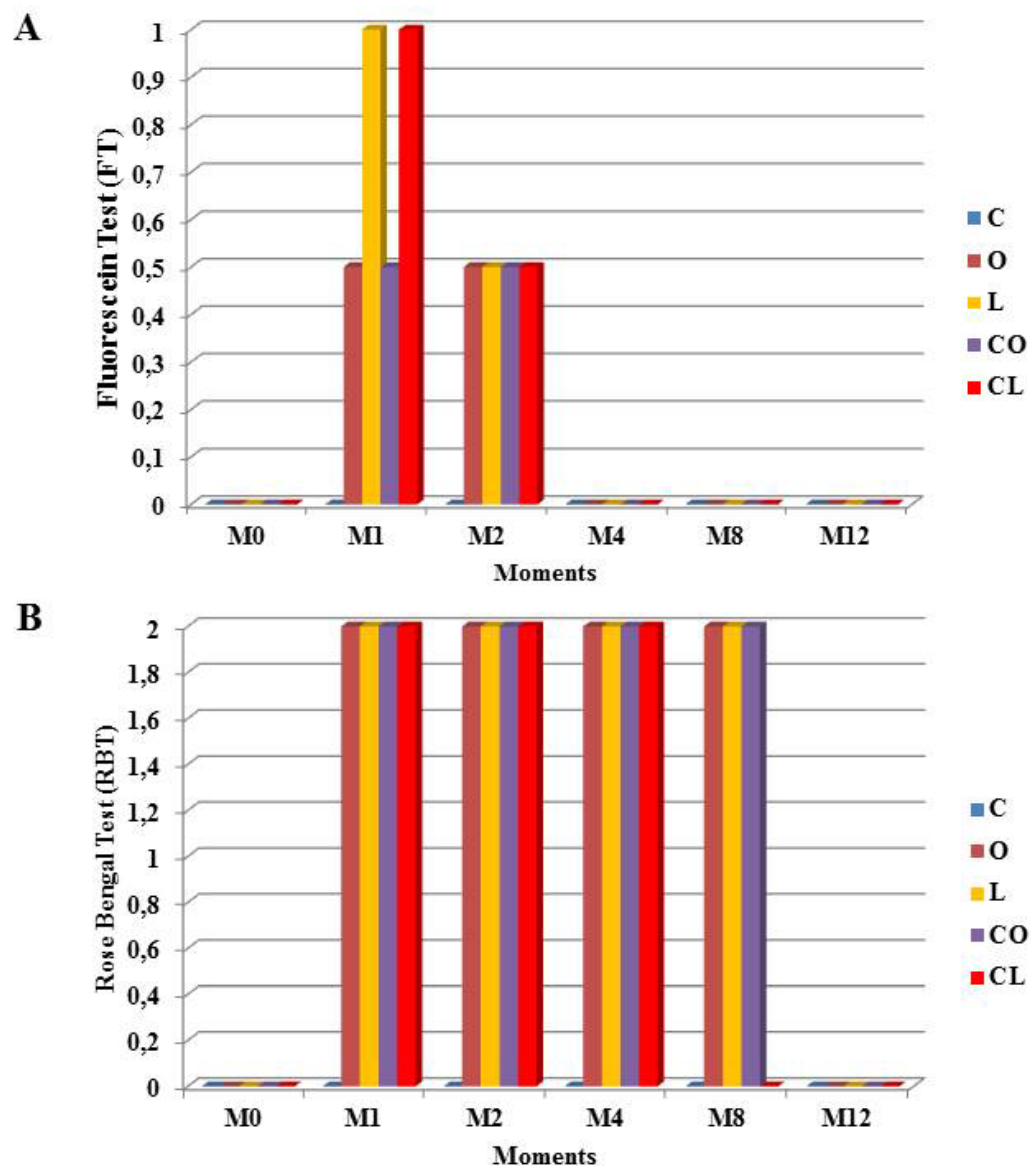


Figure 2. Median Fluorescein Test (FT)^a and Rose Bengal Test (RBT)^b values in rabbits with experimentally induced KCS that were treated with various topical formulations: placebo (group C); olive oil (group O); linseed oil (group L); 1% cyclosporine in olive oil (group CO) and 1% cyclosporine in linseed oil (group CL).

^a(0) without staining; (1) 1 quadrant staining; (2) 2 quadrants staining; (3) 3 quadrants staining; (4) 4 quadrants staining.

^b(0) without staining; (1) only conjunctive staining; (2) only cornea staining; (3) conjunctive and cornea staining

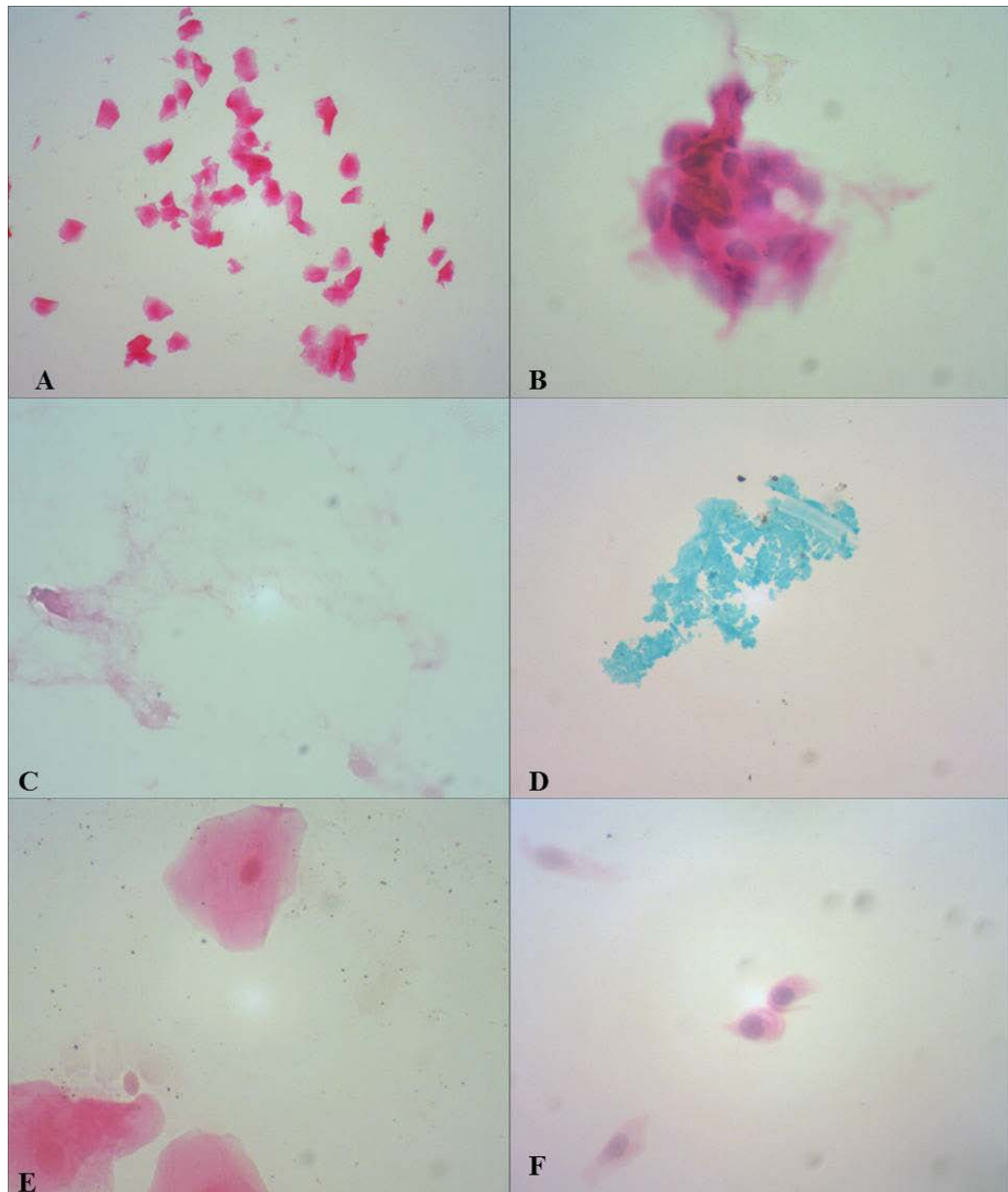


Figure 3. Photomicrograph of exfoliative cytology of the ocular surface of the cornea and conjunctiva. (A) Squamous corneal epithelial cells at M4 of group CO (1% cyclosporine in olive oil) (Hematoxylin-eosin (H&E), 100x). (B) Metaplastic cells at M8 of group O (olive oil) (Hematoxylin-eosin (H&E), 400x). (C) Neutral mucin at M4 of group C (control) (PAS- Alcian blue, 100x). (D) Acid mucin at M4 of group O (olive oil) (PAS- Alcian blue, 100x). (E) Squamous cells with normal nuclear volume at M4 of group L (linseed oil) (Hematoxylin-eosin (H&E), 400x). (F) Caliciform cells at M8 of group CO (1% cyclosporine in olive oil) (Hematoxylin -eosin (H&E), 400x).

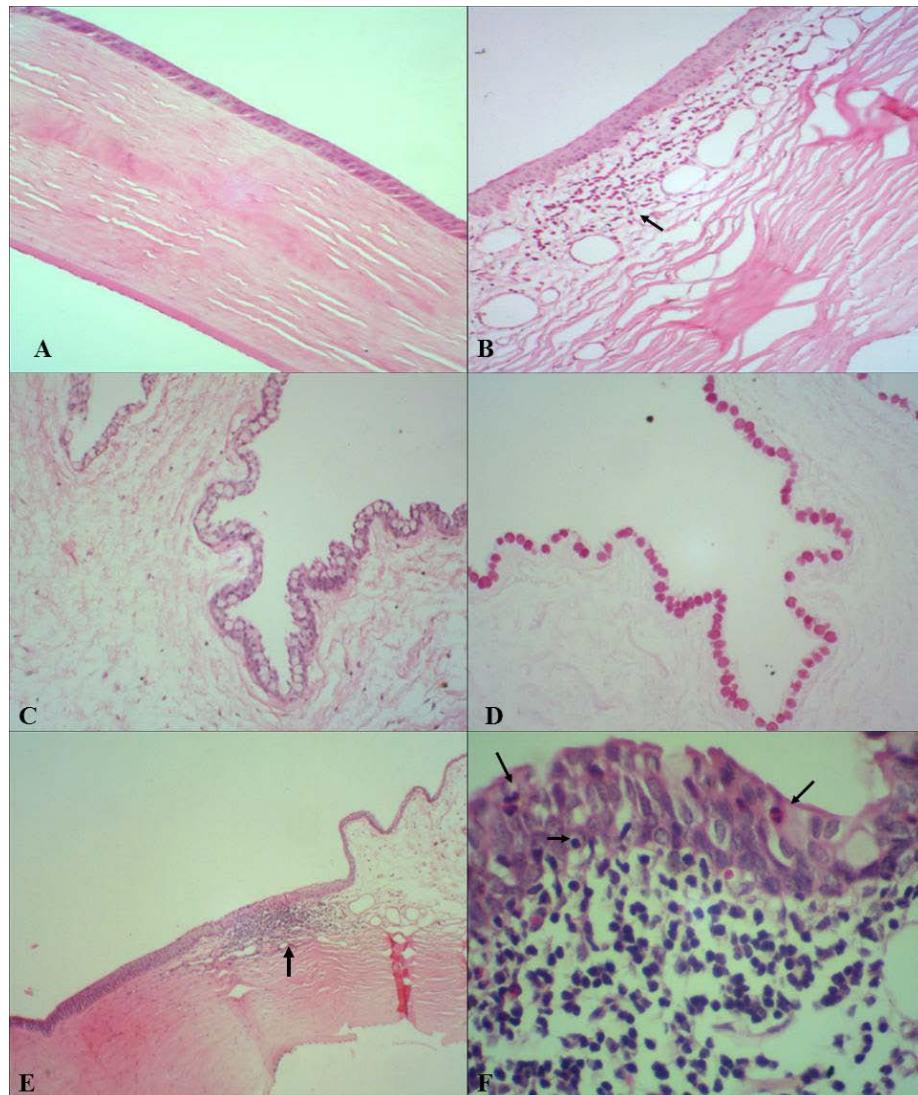


Figure 4. Photomicrographs of the cornea and conjunctiva at M12. (A) Normal cornea at M12 of group C (control) (Hematoxylin -eosin (H&E), 100x). (B) Conjunctiva with eosinophil infiltration (arrow) and vascular congestion of the group O (olive oil) (Hematoxylin -eosin (H&E), 100x). (C) Conjunctiva with great number of caliciform cells in group CL (1% cyclosporin in linseed oil) (Hematoxylin -eosin (H&E), 100x). (D) Caliciform cells in group CL (1% cyclosporin in linseed oil) (PAS- Alcian blue, 100x). (E) Focal chronic inflammatory process in the transition of conjunctiva and cornea (arrow) in group CO (1% cyclosporin in olive oil) (Hematoxylin -eosin (H&E), 40x). (F) Details of the chronic inflammation in the conjunctiva with aggression of the epithelium (arrows) in group O (olive oil) (Hematoxylin -eosin (H&E), 400x).

ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Veterinary Ophthalmology

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. 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).

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