

**COMPARAÇÃO ENTRE O ÓLEO DE PEIXE E DE LINHAÇA POR VIA ORAL NO
TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTALMENTE
INDUZIDA EM COELHOS**

DANIELLE ALVES SILVA

**COMPARAÇÃO ENTRE O ÓLEO DE PEIXE E DE LINHAÇA POR VIA ORAL NO
TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EXPERIMENTALMENTE
INDUZIDA EM COELHOS**

DANIELLE ALVES SILVA

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
S586c

Silva, Danielle.

Comparação entre o óleo de peixe e de linhaça por via oral no tratamento de ceratoconjuntivite seca induzida experimentalmente em coelhos / Danielle Alves Silva. – Presidente Prudente, 2014.

61 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientadora: Silvia Maria Caldeira Franco Andrade.

1. Ceratoconjuntivite seca 2. Coelhos. 3. Óleo de peixe. 4. Óleo de linhaça. 5. Ômega 3. 6. Ômega 6. I. Título.

DANIELLE ALVES SILVA

**COMPARAÇÃO ENTRE O ÓLEO DE PEIXE E DE LINHAÇA POR VIA ORAL
NO TRATAMENTO DE 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, 20 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy
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, Vânia e Luiz Tadeu, ao meu irmão, Bruno, por todo carinho, companheirismo e amor. Por sempre estarem ao meu lado, me dando força. Obrigado por tudo!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela proteção e por estar sempre ao meu lado durante a realização do projeto.

Agradeço aos meus pais, Vânia e Luiz Tadeu, pelo apoio e dedicação que sempre tiveram comigo, por acreditarem em mim.

Agradeço, em especial minha orientadora, Sílvia Franco Andrade, por estar sempre presente, esclarecendo as minhas dúvidas, tendo muita paciência, competência e confiança. Além de ser múltipla: amiga-mãe-orientadora.

Agradeço aos meus colegas de experimento, Jacqueline, Andressa, Ricardo, Maria Fernanda, Luis Felipe, Carolina e em especial ao Rafael, que sempre esteve disposto e pronto a me ajudar, obrigado por toda paciência que teve comigo.

Agradeço aos funcionários do Biotério, pela ajuda e dedicação durante todo o experimento.

Não poderia me esquecer de agradecer aos animais que deram suas vidas para a realização do projeto, sem eles não conseguiria...

RESUMO

Comparação entre o óleo de peixe e de linhaça por via oral no tratamento de ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou olho seco, é uma doença ocular inflamatória crônica frequente em cães e humanos, que ocorre devido a deficiência de produção da porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa) e/ou pela evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa), afetando principalmente a córnea e a conjuntiva podendo evoluir para cegueira. O tratamento consiste principalmente no uso como substitutos da lágrima e o uso de imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus). Alguns estudos na Medicina e na Veterinária mostraram bons resultados no controle da CCS com a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ω -3 e ω -6, devido à sua capacidade de produzir mediadores anti-inflamatórios. Como o óleo de peixe e o óleo de linhaça são fontes de AGE, porém com diferenças na sua composição e concentração, e até o presente momento não há um estudo comparativo da eficácia destes compostos no tratamento da CCS. O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia no tratamento de ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida experimentalmente em coelhos, entre duas fontes de ômega 3 e 6 por via oral, o óleo de peixe (OP) e o óleo de linhaça (OL). Foram utilizados 28 coelhos, fêmeas, da raça Nova Zelândia, divididos em 4 grupos com 7 animais cada: Grupo C (controle), Grupo OP (óleo de peixe), Grupo OL (óleo de linhaça) e Grupo OPL (óleo de peixe e óleo de linhaça). Os animais foram avaliados pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste de Rosa Bengala (TRB), Teste de Fluoresceína (TF), Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), citologia ocular e análise histopatológica. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo nos valores de TLS e TRFL em todos os grupos de tratamento, porém esse aumento foi mais precoce no grupo OP. No TRB o desempenho dos grupos foi similar. Com relação ao parâmetro TF, a marcação negativa foi mais tardia no grupo OPL. Houve uma diminuição significativa no número de células caliciformes no grupo OPL em relação aos demais grupos. Os resultados demonstraram que o OP e OL por via oral melhoram os sinais clínicos da CCS, porém essa melhora foi mais rápida com o OP. O uso combinado dos óleos não trouxe benefício adicional. Esses resultados podem contribuir no futuro com novas formulações orais úteis no tratamento adjuvante da CCS.

Palavras-chave: ceratoconjuntivite seca, coelhos, óleo de peixe, óleo de linhaça, ômega 3 e 6, oral

ABSTRACT

Comparison between fish oil and flaxseed orally in the treatment of keratoconjunctivitis sicca experimentally induced in rabbits

The keratoconjunctivitis sicca (CCS), or dry eye, is a common chronic inflammatory eye disease in dogs and humans , which occurs due to deficiency of production of the aqueous portion of the tear film (quantitative deficiency) and / or excessive tear evaporation (disability qualitative) , mainly affecting the cornea and conjunctiva may result in blindness . Treatment consists mainly in the use of tear substitutes as the use of immunosuppressive drugs (cyclosporine , tacrolimus and pimecrolimus). Some studies in medicine and veterinary showed good results in controlling the CCS with the use of essential fatty acids (AGE) , ω -3 and ω -6 , due to its ability to produce anti -inflammatory mediators. How fish oil and flaxseed oil are sources of AGE , but with differences in composition and concentration , and to the present time there is a comparative study of the efficacy of these compounds in the treatment of CCS . The objective of this study is to compare these two important sources of ω - 3 and ω - 6, orally , in the treatment of experimentally induced in rabbits CCS .In order to compare the efficacy in the treatment of keratoconjunctivitis sicca (CCS) induced experimentally in rabbits , between two sources of omega 3 and 6 orally , fish oil (FO) and linseed oil (OL) . We used 28 female rabbits of New Zealand breed , divided into 4 groups of 7 animals each : Group C (control) , Group OP (fish oil) , OL Group (flaxseed oil) and Group OPL (Oil fish oil and flaxseed) . The animals were evaluated by Schirmer Tear Test (TLS) , Rose Bengal Test (TRB) , Fluorescein test (TF) , Time Tear Film Break (TRFL) , ocular cytology and histopathology . The results showed a significant increase in the values of TLS and TRFL in all treatment groups , but this increase was earlier in the OP group . TRB in the performance of the groups was similar. With respect to the parameter TF , negative marking was delayed in group OPL . There was a significant decrease in the number of goblet cells in the OPL group in relation to other grupos.Os results showed that OL and OP orally improve the clinical signs of CCS , however this improvement was more rapid with the OP . The combined use of oils brought no additional benefit . These results can help in the future with new oral formulations useful in the adjuvant treatment of CCS .

Key-words: keratoconjunctivitis sicca , rabbits , fish oil , flaxseed oil , omega 3 and 6 , oral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Camadas da córnea	15
FIGURA 2 - Camadas que compõem o filme lacrimal. No detalhe, a produção de mucina por células conjuntivais.	17
FIGURA 3 - (A) Tiras estéreis descartáveis do Teste Lacrimal de Schirmer. (B) Colocação da tira no saco conjuntival do coelho.	19
FIGURA 4 - (A) Colírio de Rosa Bengala a 1%. (B) Teste de Rosa Bengala positivo em coelho.	20
FIGURA 5 - (A) Tiras estéreis descartáveis de fluoresceína. (B) Teste de Fluoresceína positivo em coelho.	21
FIGURA 6 - (A) Realização do Teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal em coelho. (B) Ruptura do Filme Lacrimal em humano.	22
FIGURA 7 - Exame de Citologia esfoliativa, realizado em coelho.	23
FIGURA 8 -Via da formação de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios a partir dos ácidos graxos essenciais ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6). A ilustração indica como fonte natural de ω -3 o peixe e a linhaça e de ω -6 a linhaça. O círculo em vermelho demonstra a necessidade de conversão do ALA pela enzima delta-6 desaturase no caso da linhaça enquanto no peixe o EPA e DHA já existem pré-formados.	25

LISTA DE SIGLAS

CCS - Ceratoconjuntivite Seca

OP - Óleo de Peixe

OL - Óleo de Linhaça

OPL - Óleo de Peixe e Óleo de Linhaça

C - Controle

TLS - Teste Lacrimal de Schirmer

TRB - Teste Rosa Bengala

TF - Teste de Fluoresceína

TRFL - Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

AGE - Ácidos Graxos Essenciais

ω -3 - Ômega 3

ω -6 - Ômega 6

PG - Prostaglandinas

LT - Leucotrienos

TX - Tromboxanos

COX1 - Cicloxigenase 1

LOX - Lipoxigenase

ALA - Ácido γ -linolênico

EPA - Ácido eicosapentaenoico

DHA - Ácido docosahexaenóico

LA - Ácido linoleico

GLA - Gama-linoleico

DGLA - Ácido dihomo-gama-linoleico

TNF - Fator de necrose tumoral

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

ARVO - Association for Research in Vision and Ophthalmology

HE - Hematoxilina e Eosina

AA - Ácido Araquidônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1	Anatomia e Fisiologia do Sistema Ocular.....	12
2.1.1	Sistema Ocular do Coelho.....	12
2.1.2	Filme lacrimal pré-corneal.....	15
2.2	Ceratoconjuntivite Seca.....	17
2.2.1	Sinais clínicos.....	18
2.2.2	Diagnóstico.....	18
2.2.3	Tratamento.....	23
2.3	Óleo de Peixe.....	26
2.4	Óleo de Linhaça.....	27
	REFERÊNCIAS.....	29
	ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
	ANEXO – Normas Para Publicação.....	58

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença inflamatória crônica frequente em cães e humanos, que ocorre devido a deficiência de produção da porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa) e/ou pela evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa), afetando principalmente a córnea e a conjuntiva podendo evoluir para cegueira (PINHEIRO JR et al., 2007; HERRERA, 2008).

Na literatura muitas indicações terapêuticas para CCS são descritas, como substitutos da lágrima, uso de imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus) e anti-inflamatórios esteroides e não esteroides, controle de infecções secundárias com o uso de antibióticos, além de outros fármacos como pilocarpina (fármaco parassimpatomimético lacrimoestimulante) e acetilcisteína (mucolítico) (BARABINO et al., 2003; OFRI; LAMBROU; ALLGOEWER, 2009; MILLER, 2008).

Estudos na Medicina e na Veterinária (BARABINO et al., 2003; NEVES et al., 2013) mostraram bons resultados no controle do olho seco com a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6), devido à sua capacidade de produzir mediadores anti-inflamatórios.

O óleo de peixe (OP) é uma fonte importante de ω -3, além de possuir elementos essenciais tais como selênio, iodo e vitaminas A, B, D e E. É obtido de peixes de água fria (ex: salmão, atum e arenque). O OP é classificado como alimento funcional, propiciando a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e neurológicas, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (HARRIS, 2004; MAHAFFEY, 2004; DAVID; JENKINS, 2008). Um estudo com dieta rica em ω -3 a partir de consumo de peixe demonstra um efeito protetor contra a degeneração macular em humanos (CHONG et al, 2008).

O óleo de linhaça (OL) obtido da semente da planta *Linum usitatissimum*, é uma fonte importante de ω -3 e ω -6, e possui uma relação ω -3: ω -6 de 3:1 considerada ideal. É rica também em lignana (fitoesteróide), fibras solúveis (lignina), vitaminas B1, B2, C, E, e minerais. Possui efeito imunomodulador pela inibição da interleucina-1, que inibe a produção e liberação de fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos e efeito anti-inflamatório pela formação de

mediadores -inflamatórios a partir dos AGE ω -3 e ω -6 (RONCONE; BARTLETT; EPERJESI, 2010; OOMAH, 2001; COVINGTON, 2004).

Uma das principais diferenças entre o OP e o OL é que o OL necessita da conversão do ALA em EPA e DHA, enquanto no OP estes AGE essenciais já são pré-formados, devido à ingestão de plantas marinhas que contém o ω -3 sintetizado, porém o OL é uma fonte de ω -6 que a partir do DGLA origina PGE1 e TXA1 (DAVID; JENKINS, 2008; RAND; ASBELL, 2011).

Como o óleo de peixe e o óleo de linhaça são fontes de AGE, porém com diferenças na sua composição e concentração, e até o presente momento não há um estudo comparativo da eficácia destes compostos no tratamento da CCS, o objetivo deste trabalho é comparar estas duas importantes fontes de ω -3 e ω -6, por via oral, 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 muito tempo os coelhos vêm sendo utilizados em estudos experimentais na oftalmologia (WILLIAMS, 2007). O olho do coelho apresenta várias diferenças em relação ao olho humano e dos outros animais. O bulbo ocular é relativamente grande comparado com o tamanho do animal e bastante proeminente, às vezes, se projeta da órbita por uma extensão de 5 milímetros além do arco zigomático e 12 milímetro além do arco frontal. A dimensão ântero-posterior do bulbo ocular mede cerca de 17 milímetros. 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 (CONNERS et al., 1997; DAVIS, 1929) .

Nas pálpebras em sua transição entre o epitélio da pele e da conjuntiva ocorre além da margem tarsal interna, mais na superfície interna da pálpebra quando comparado ao dos humanos. A membrana nictante ou terceira pálpebra está localizada no canto interno medial do olho, auxiliando na proteção da superfície ocular e na produção de lágrima (DAVIS, 1929).

A conjuntiva é uma membrana mucosa que reveste a porção anterior do bulbo ocular, é lubrificada pela lágrima, e é bastante vascularizado, 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).

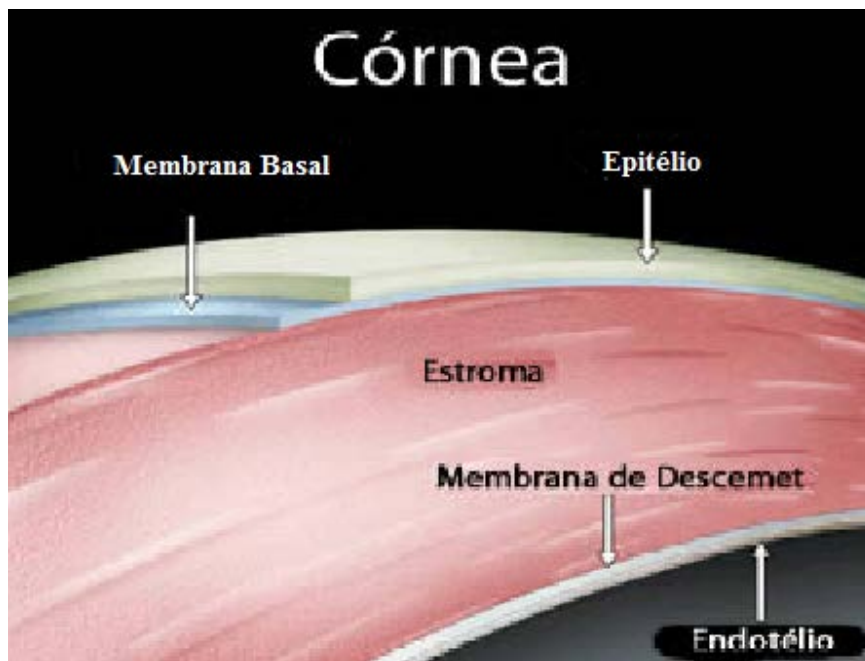
As pálpebras possuem um complexo formado pelas glândulas de meibômio (tarsais), sendo essas responsáveis pela secreção sebácea, com grande quantidade de secreção de lipídeos. Além disso, possuem as glândulas de Zeiss (sebáceas) e Moll (sudoríparas), presentes na base dos cílios, responsáveis pela

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 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 a lesões (DAVIS, 1929; BARBOSA, 2007; CAVALLETT, 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; CAVALLETT, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Camadas da córnea



Fonte: Córnea (2014)

2.1.2 Filme lacrimal pré-corneal

A lágrima, também denominada de Filme Lacrimal Pré-corneal (FPL), é uma solução levemente alcalina com uma média de pH = 7,5. A partir da lágrima é que se forma o filme lacrimal, que consiste em uma fina película que recobre os olhos, lubrificando e protegendo-os. Além disso, o filme lacrimal também leva nutrientes e oxigênio para células da córnea (KLEINNER, 2006; HERRERA, 2008).

O filme pré-corneal tem como principais funções: manutenção de uma superfície ocular uniforme (função refrativa), remoção de materiais estranhos da córnea e conjuntiva lubrificando-as (função de limpeza e lubrificação), permitir a passagem de nutrientes e oxigênio (função de nutrição) e ainda participa da defesa imunológica removendo microrganismos pela ação de lisozimas, imunoglobulinas, lactoferrinas e betalina (função antimicrobiana) (KLEINNER, 2006).

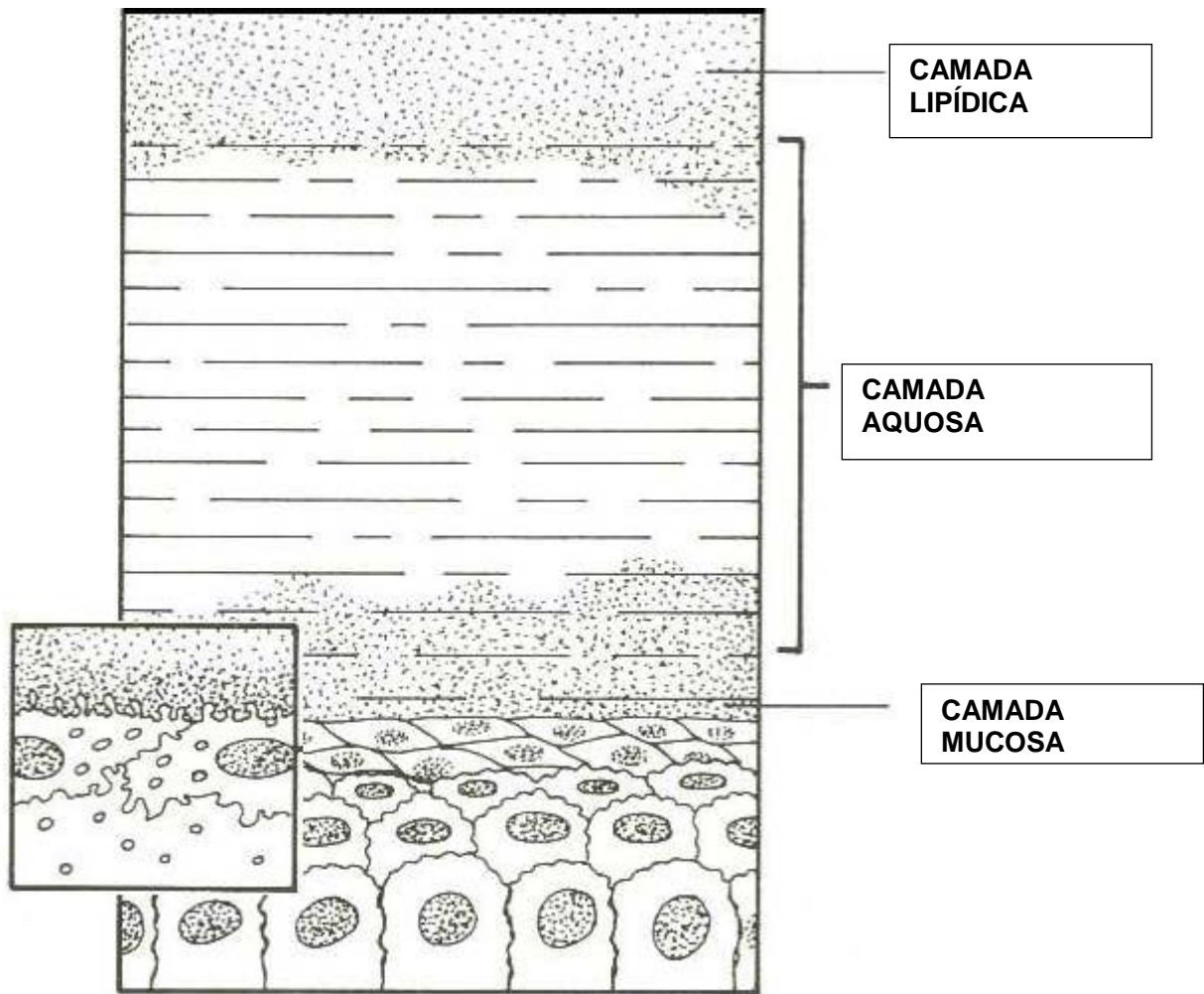
Segundo Gelatt (2003), o filme lacrimal é composto de um fluido trilaminar complexo contendo componentes lipídico, aquoso e mucoso. A camada lipídica possui como funções retardar a evaporação da lágrima e estabilizar o filme lacrimal (GOMES, 2000; McCULLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 2006), produzir

uma superfície óptica plana e prevenir a contaminação do filme lacrimal por corpos estranhos e restos celulares.

A fina camada lipídica superficial é secretada pelas glândulas tarsais (ou meibomianas) (DAVIDSON; KUONEN, 2004). O componente intermediário ou aquoso das lágrimas dos cães é secretado pelas glândulas lacrimais da órbita e da terceira pálpebra. A porção aquosa é o componente em maior quantidade na lágrima, constituída de água, eletrólitos, glicose, ureia, glicoproteínas e proteínas lacrimais, incluindo lactoferrina e algumas proteínas séricas. Proteínas lacrimais primárias compreendem as globulinas, a albumina e a lisozima. A camada lacrimal (mais profunda) chamada camada mucosa contém mucina, uma glicoproteína hidratada produzida pelas células caliciformes conjuntivais, que ancora as imunoglobulinas e a lisozima; além disso, auxilia na lubrificação e hidratação da conjuntiva e da córnea (Figura 2) (GOMES, 2000; DAVIDSON; KUONEN, 2004; McCULLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 2006).

No cão, a camada mucosa tem maior densidade no fornice conjuntival. A mucina derivada das células caliciformes que preenche qualquer irregularidade da superfície corneal, assim, fornece uma superfície ocular opticamente lisa, além de aprisionar bactérias e várias partículas estranhas (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

Figura 2 - Camadas que compõem o filme lacrimal. No detalhe, a produção de mucina por células conjuntivais.



FONTE: Rorig (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 (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, Pequinês, Bulldog Inglês, Cocker Spaniel, Pug, Schnauzer miniatura e Yorkshire Terrier (CAVALLETI, 2007; HERRERA, 2008).

Esta enfermidade é geralmente bilateral (cerca de 60%) e ocorre mais frequentemente em fêmeas (cerca de 65%) do que em cães machos (STELLA,

1999). De acordo com Gelatt (2003) e Pigatto et al. (2007) a CCS é uma das doenças mais diagnosticadas na oftalmologia veterinária, sendo uma oftalmopatia grave e progressiva.

Várias etiologias podem causar a diminuição da produção lacrimal: predisposição racial, hipotireoidismo, doenças autoimunes, paralisia do nervo facial, medicamentos (atropina, sulfonamidas), excisão cirúrgica da glândula da terceira pálpebra e conjuntivite entre outras (WILKIE, 1996; MILLER, 2008).

2.2.1 Sinais clínicos

De acordo com Gelatt (2003) os sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca podem variar dependendo do tempo decorrido do surgimento e extensão do ressecamento. Na maioria dos casos os olhos aparecem inicialmente vermelhos e inflamados, com secreção mucóide ou mucopurulenta. Em uma CCS com maior gravidade, a superfície ocular torna-se sem brilho, a conjuntiva fica extremamente hiperêmica, blefarite, blefaroespasmo, desconforto ocular, fotobobia e ceratite progressiva caracterizada por vascularização e pigmentação extensas com ou sem ulceração (KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

Conjuntivites bacterianas secundárias, são frequentemente associadas a CCS, sendo uma causa comum de falha no diagnóstico (CRISPIN, 2006).

2.2.2 Diagnóstico

Kaswan e Salisbury (1990) também ressaltam 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 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 testes mais utilizados na medicina veterinária são o TLS e o TRB (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Além disso, o Teste de Fluoresceína (TF) é rotineiramente utilizado para detecção de úlceras de córnea secundária a CCS.

O TLS permite avaliar a quantidade da porção aquosa de lágrima no saco conjuntival. 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 é dobrada e inserida no saco conjuntival próximo ao ângulo interno do olho (Figura 3 A e B). Em animais deve-se aguardar 1 minuto para a retirada da tira e avaliação da medição (VAUGHAN; ASBURY, 1990; ANDRADE, 2008; HERRERA, 2008).

Figura 3 - (A) Tiras estéreis descartáveis do Teste Lacrimal de Schirmer. (B) Colocação da tira no saco conjuntival do coelho.



Fonte: Arquivo Pessoal

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 tira 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 tira de Schirmer após repetitivos exames. O TLS é considerado normal quando a fita apresenta mensuração de 10 a 20 mm de umidade; de 5 a 10 mm é resultado de um olho com suspeita de CCS; de 1 a 5 mm é resultado de uma CCS grave e o valor zero de umidade é considerado uma CCS absoluta (MAGGS, 2008; HERRERA, 2008).

O TFV é atualmente, o teste mais aplicado para quantificar a produção lacrimal cujo o objetivo é de contornar as possíveis desvantagens do TLS como o

tempo de realização do teste e consiste na colocação de 3 mm de um cordão de algodão fino (75 mm de comprimento) no saco conjuntival durante 15 segundos, ocorrendo a mudança de vermelho para amarelo (MAGGS, 2008). É um material 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 A e B) (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).

Figura 4 - (A) Colírio de Rosa Bengala a 1%. (B) Teste de Rosa Bengala positivo em coelho.



Fonte: Arquivo Pessoal

O corante fluoresceína utilizado no TF (Figura 5 A e B) 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 conhecido como *break up time* (BUT) que auxilia na observação da estabilidade do FLP (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008; MAGGS, 2008).

Figura 5 - (A) Tiras estéreis descartáveis de fluoresceína. (B) Teste de Fluoresceína positivo em coelho.



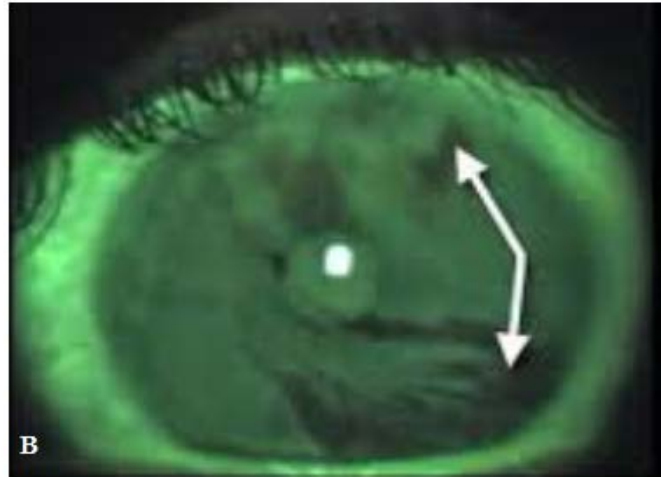
Fonte: Arquivo Pessoal

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 (GELATT, 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; GELATT, 2003; COLITZ, 2008; MAGGS, 2008; EL-SHAZLY et al., 2008).

Figura 6 - (A) Realização do Teste do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal em coelho. (B) Ruptura do Filme Lacrimal em humano.



Fonte: Arquivo Pessoal



Fonte: TEAR FILM BREAK UP TIME (2015)

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 calciformes 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-ESTEVEES et al., 2005).

Figura 7 - Exame de Citologia esfoliativa, realizado em coelho



Fonte: Arquivo Pessoal

2.2.3 Tratamento

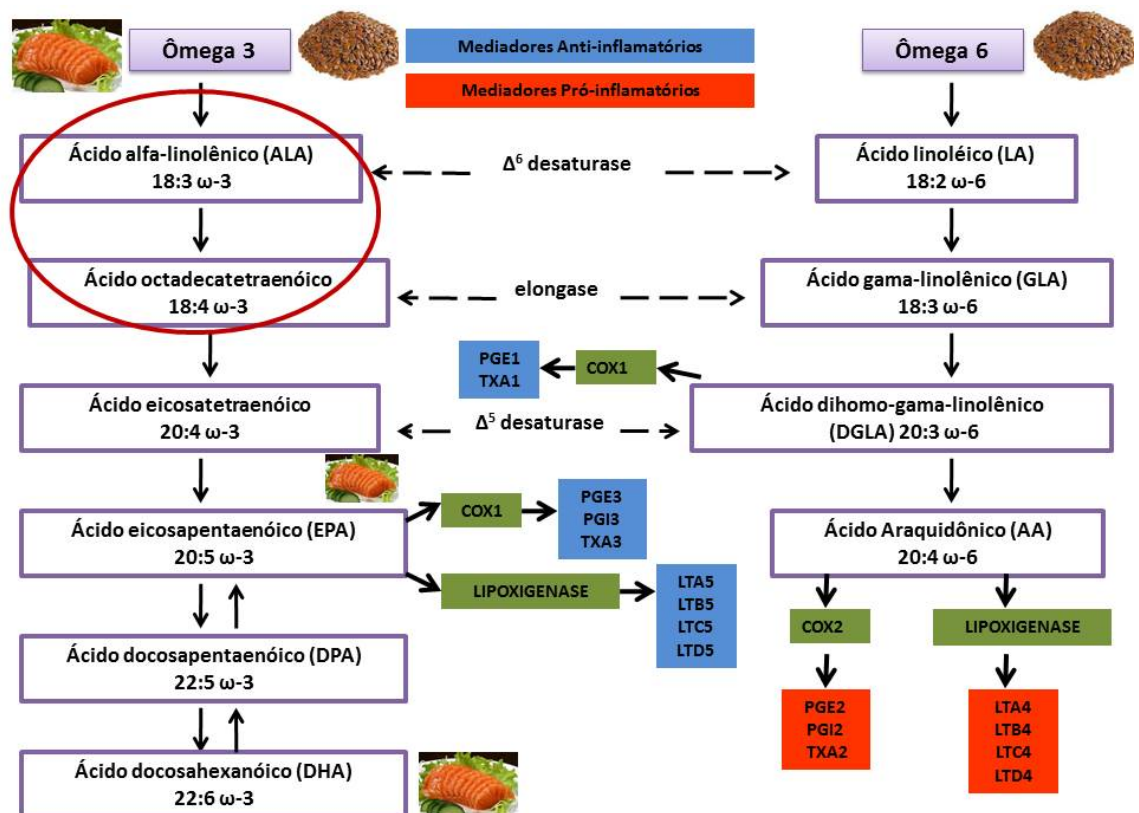
Segundo SLATTER (2005) o tratamento da ceratoconjuntivite seca pode ser realizado por meio conservativo ou cirúrgico, sendo a forma conservativa a mais utilizada rotineiramente.

Na literatura muitas indicações terapêuticas para CCS são descritas, dentre elas: substitutos da lágrima (polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, metilcelulose, ácido poliacrílico, ácido hialurônico e sulfato de condroitina), uso de imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus) e anti-inflamatórios (esteroides e não-esteroides), controle de infecções secundárias com o uso de antibióticos, além de outros fármacos como a pilocarpina (droga parassimpatomimética lacrimomimética) e acetilcisteína (mucolítico) (MILLER, 2008; ANDRADE, 2008; OFRI; LAMBROU; ALLGOEWER, 2009). Na medicina veterinária, o tratamento mais preconizado é o uso dos imunossupressores lacrimomiméticos como a ciclosporina A, tacrolimus e pimecrolimus (BERDOULAY; ENGLISH; NADELSTEIN, 2005; TANG-LIU; ACHEAMPONG, 2005).

Alguns estudos recentes na Medicina e na Medicina Veterinária (BARABINO et al., 2003; NEVES et al., 2013) mostraram bons resultados no controle do olho seco com a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6), devido à sua capacidade de produzir mediadores anti-inflamatórios. Na Medicina, o uso dos ω -3 e ω -6, por via oral, demonstrou ser uma terapêutica alternativa para portadores das variadas formas de deficiência lacrimal como em pacientes com síndrome de Sjögren, ou em pacientes com CCS (SULLIVAN et al., 2002; RASHID; JIN; ECOIFFER, 2008; WOJTOWICZ; BUTOVICH; UCHIYAMA, 2011).

Os principais mediadores anti-inflamatórios (Figura 8), prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX) das séries 1, 3 e 5 são originados sob a ação enzimática da cicloxigenase 1 (COX1) e da lipoxigenase (LOX) nos AGE originados do ω -3, ácido γ -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) e do ω -6, ácido linoleico (LA), gama-linoleico (GLA) e ácido dihomo-gama-linoleico (DGLA). Os ω -3 e ω -6 são encontrados em muitos alimentos como nozes, peixes de águas frias, semente de soja, óleo de canola, óleo de oliva e o óleo de linhaça, porém há diferenças entre as concentrações destes AGE nessas fontes naturais (SULLIVAN et al., 2002; RASHID; JIN; ECOIFFER, 2008; WOJTOWICZ; BUTOVICH; UCHIYAMA, 2011).

Figura 8 – Via da formação de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios a partir dos ácidos graxos essenciais ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6). A ilustração indica como fonte natural de ω -3 o peixe e a linhaça e de ω -6 a linhaça. O círculo em vermelho demonstra a necessidade de conversão do ALA pela enzima delta-6 desaturase no caso da linhaça enquanto no peixe o EPA e DHA já existem pré-formados.



Fonte: Arquivo Pessoal

O Ácido Docosahexaenóico (DHA) tem importante função no funcionamento e desenvolvimento da retina (CHEATHAM et al., 2006) e cérebro (WURTMAN, 2008), sendo predominante na maioria das membranas celulares.

O Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e o Ácido Araquidônico (AA) dão origem aos eicosanóides, mediadores inflamatórios de origem lipídica, sendo o AA o principal substrato para síntese dos eicosanóides (CALDER, 2006; GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

Pesquisas indicam que o EPA interfere na produção de Prostaglandina (PG) da série 3, substância que se assemelha aos hormônios e que regula e protege o organismo de efeitos, como agregação plaquetária (devido à sua ação antitrombótica), inflamação e diminuição das respostas imunes (LUU et al., 2007).

O AA é importante no crescimento fetal (INNIS, 2007), no controle da pressão sanguínea, desenvolvimento do cérebro e retina, e no controle da agregação plaquetária (CHEATHAM et al., 2006).

A conversão dos AG n-3 em seus derivados de cadeia longa (EPA e DHA) e sua subsequente incorporação nos tecidos de mamíferos é fortemente influenciada pelos níveis de alfa-linolênico na dieta (BARCELÒ-COBLIJIN et al., 2005).

A razão entre a ingestão de ácidos graxos n-6 e AG n-3 é importante já que são metabolicamente e fisiologicamente diferentes e apresentam funções fisiológicas opostas. Um grande excesso de ácidos graxos de uma série na dieta pode inibir a dessaturação de quantidades menores de um ácido graxo de outra série (PAWLOSKY et al., 2003).

O excesso do ácido linoleico poderá impedir, por efeito de competição pela enzima $\Delta 6$ desaturase, a transformação do ácido alfa-linolênico em seus derivados de cadeia longa (EPA e DHA). Isto causa o desbalanceamento dos ácidos graxos no organismo e a incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa nos tecidos, afetando o efeito destes ácidos graxos em doenças crônicas (VANCASSEL et al., 2007).

2.3 Óleo de Peixe

O óleo de peixe (OP) é uma fonte importante de ω -3, além de possuir elementos essenciais tais como selênio, iodo e vitaminas A, B, D e E. É obtido de peixes de água fria (ex: salmão, atum e arenque). O OP é classificado como alimento funcional, propiciando a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e neurológicas, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (OEHLENSCHLÄGER, 2012; HARRIS, 2004; DAVID; JENKINS, 2008; RAND; ASBELL, 2011; MOZAFFARIAN e RIMM, 2006; KRIS-ETHERTON et al., 2002; MAHAFFEY, 2004).

Um estudo com dieta rica em ω -3 a partir de consumo de peixe demonstra um efeito protetor contra a degeneração macular em humanos (CHONG et al., 2008). O consumo de peixe pode trazer riscos à saúde, caso este esteja contaminado com metilmercúrio e dioxinas (MAHAFFEY, 2004). No entanto, a grande maioria dos estudos experimentais e epidemiológicos demonstrou que os benefícios do consumo de peixe são superiores aos seus riscos (OEHLENSCHLÄGER, 2012).

O OP apresenta como vantagem possuir o ácido eicosapentaenoico e docosahexaenóico pré-formados, devido à ingestão de plantas marinhas que contém o ω -3 sintetizado, enquanto no OL necessita da conversão do Ácido γ -linolênico (ALA) em EPA e DHA (DAVID; JENKINS, 2008; RASHID; JIN; ECOIFFER, 2008).

2.4 Óleo de Linhaça

O óleo de linhaça (OL) é obtido da semente da planta *Linum usitatissimum*, é uma fonte importante de ω -3 e ω -6, e possui uma relação ω -3: ω -6 de 3:1 considerada ideal. É rica também em lignana (fitoesteróide), fibras solúveis (lignina), vitaminas B1, B2, C, E, e minerais. Possui efeito imunomodulador pela inibição da interleucina-1 que inibe a produção e liberação de fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos e efeito anti-inflamatório pela formação de mediadores anti-inflamatórios a partir dos AGE ω -3 e ω -6 (RONCONE; BARTLETT; EPERJESI, 2010; OOMAH, 2001; COVINGTON, 2004).

O OL 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 et al., 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, 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).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. F. Terapêutica Oftálmica. In: Andrade, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, p. 179-189, 2008.
- BARABINO, S., et al. Systemic linoleic and γ -linolenic acid therapy in dry eye syndrome with and inflammatory component. **Cornea**, v. 22, n. 2, p. 97 – 101, 2003.
- 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.
- BARCELÒ-COBLIJIN G., et al. Dietary α -linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. **Lipids**, v. 40, n. 8, p. 787-98, 2005.
- 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.
- 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.
- CALDER P. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83 (suppl), p. 1505S-19S, 2006.
- 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.
- CHEATHAM, C. L. et al. n-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1458S-66S, 2006.
- CHONG, E. W. T. et al. Dietary-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. **Archives Ophthalmology**, v. 126, p. 826-33, 2008.
- 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.

CONNERS, M. S. et al. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 10, p. 1963-71, sep. 1997.

CÓRNEA. InfoEscola. Disponível em: <http://www.infoescola.com/visao/cornea>. Acesso em: 03 fev. 2014.

COVINGTON, M. B. Omega-3 fatty acids. **American Family Physician**, v. 70, p. 133-40, 2004.

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 mucins (review). **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 2, p. 71-7, 2004.

DAVID, J. A., JENKINS, A. R. Fish oil and omega-3 fatty acids. **Canadian Medical American Journal**, v. 178, p. 150, 2008.

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.

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

GARDNER, M. D. **Anatomia: estudo regional do corpo humano**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 633-641.

GARÓFOLO, A, PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 5, p. 611-21, 2006.

GELATT K. N. **Veterinary Ophthalmology**, 3rd edn. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

GELATT, N. K. **Manual de oftalmologia veterinaria**. 3.ed. Sao Paulo: Manole, 2003. p. 594.

GODOY-ESTEVEES 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. Atualizacao no tratamento das ceratoconjuntivites superficiais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n.1, 2000.

HARTLEY, C. et al. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 1, p. 53-57, 2006.

HARRIS, W. S. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. **Cleveland Clinical Journal of Medicine**, v. 71, p. 208-21, 2004.

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.

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.

INNIS, S. M. Fatty acids and early human development. **Early Human Development**, v. 83, n. 12, p. 761-66, 2007.

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

KLEINNER, J. A. **Tratamento Cirurgico da Epífora Crônica em Animais de Companhia**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação em Veterinária, 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.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747–57, 2002.

LUU, N.T. et al. Dietary supplementation with fish oil modifies the ability of human monocytes to induce an inflammatory response. **Journal of Nutrition**, v. 137, n.12, p. 2769-74, 2007.

MAGGS, D. J. Basic diagnostic techniques. In: MAGGS D. J.; MILLER P. E.; OFRI, R. **Slater`s fundamentas of veterinary ophthalmology**. 4 ed. St Louis: Elsevier, 2008. p. 81- 106.

MAHAFFEY, K. Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. **Environment Research**, v. 95, p. 414-28, 2004.

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.

MCCULLEY, J. P. et al. Impact of evaporation on aqueous tear loss. **Transaction of the American Ophthalmological Society**, v. 104, 2006.

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.

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.

MOZAFFARIAN, D., RIMM, E. B. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. **Journal of American Medical Association**, v. 296, p. 1885-99, 2006.

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.

OEHLENSCHLAGER, J. Seafood: nutritional benefits and risk aspects. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 82, p. 168-72, 2012.

OFRI, R.; LAMBROU, G.N.; ALLGOEWER, I. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p.70-7, 2009.

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

PAWLOSKEY, R. J. et al. Effects of beef- and fish-based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 3, p. 565-72, 2003.

PIGATTO, J. A. T. et al. Ceratoconjuntivite seca em caes e gatos. **Acta ScientiaeVeterinariae**, v. 35, n. 2, p. 250-251, 2007.

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.

RAND, A. L.; ASBELL, P. A. Current Opinion in Ophthalmology Nutritional Supplements for Dry Eye Syndrome. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 22, p. 279-82, 2011.

RASHID, S.; JIN, Y.; ECOIFFER, T. 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.

RORIG, M. C. L. **Uso de pimecrolimus 0,5% no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. Sao Paulo: Roca, 2005. p. 686.

STELLA, J. M. Os métodos de diagnósticos e tratamento mais utilizados nas oftalmopatias em cães e gatos no Hospital de São Bernardo. 1999. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande.

SULLIVAN, B. et al. Correlation between nutrient intake and the polar lipid profiles of meibomian gland secretions in women with Sjogren's syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 506, p. 441-447, 2002.

TANG-LIU, D. D. S.; ACHEAMPONG, A. Ocular pharmacokinetics and safety of ciclosporin, a novel topical treatment for dry eye. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 3, p. 247-261, 2005.

TEAR FILM BREAK UP TIME. Dry Eye Information. 2015. Disponível em <http://www.systane.in/professional/tear-film-break-up-time.aspx>. Acesso em: 03 fev. 2015.

VANCASSEL, S. et al. Hyperactivity in the rat is associated with spontaneous low level of n-3 polyunsaturated fatty acids in the frontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 180, n. 2, p. 119-26, 2007.

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

WILKIE, D. A. Management of Keratoconjunctivitis sicca in dogs. In: GLAZE, M. B. **The compendium collection: ophthalmology in small animal practice**. 2.ed. New Jersey, Veterinary Learning Systems :p.234-238, 1996.

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

WOJTOWICZ, J. C.; BUTOVICH, I.; UCHIYAMA, E. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. **Cornea**, v. 30, p. 308-14, 2011.

WURTMAN, R. J. Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, n. 10, p. S6-S10, 2008.

ARTIGO CIENTÍFICO

Comparação entre o óleo de peixe e de linhaça por via oral no tratamento de ceratoconjuntivite seca experimentalmente induzida em coelhos

Danielle Alves Silva¹, Gisele Alborgetti Nai², Rogério Giuffrida³, Rafael Cabral Barbero³, Jacqueline Marcussi Pereira Kuhn³, Andressa Caroline da Silva³, Ricardo Henrique Zakir Pereira³, Maria Fernanda Abbade³, Luiz Felipe da Costa Zulim⁴, Carolina Silva Guimarães Pereira⁴ e Silvia Franco Andrade⁵

1. Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

2. Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina (Unoeste)

3. Curso de Medicina Veterinária (UNOESTE)

4. Residente da Clínica Médica de Pequenos Animais do Curso de Medicina Veterinária (UNOESTE)

5. Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais do Curso de Medicina Veterinária (UNOESTE)

Endereço para contato: S. F. Andrade Tel.: +55 18 3229 2067; Fax +55 18 3229 2036
e-mail: silviafranco@unoeste.br

Título Abreviado: Uso óleo de peixe e linhaça no olho seco em coelho

RESUMO

Objetivos Comparar a eficácia no tratamento de ceratoconjuntivite seca (CCS) induzida experimentalmente em coelhos, entre duas fontes de ômega 3 e 6 por via oral, o óleo de peixe (OP), o óleo de linhaça (OL) e a associação dos óleos (OPL).

Procedimento Foram utilizados 28 coelhos, fêmeas, da raça Nova Zelândia, divididos em 4 grupos com 7 animais cada: Grupo C (controle), Grupo OP (óleo de peixe), Grupo OL (óleo de linhaça) e Grupo OPL (óleo de peixe e óleo de linhaça). Os animais foram avaliados pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), Teste de Rosa Bengala (TRB), Teste de Fluoresceína (TF), Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), citologia esfoliativa ocular e análise histopatológica.

Resultados Houve aumento significativo nos valores de TLS e TRFL em todos os grupos de tratamento, porém esse aumento foi mais precoce no grupo OP. No TRB o desempenho dos grupos foi similar. Com relação ao parâmetro TF, a marcação negativa foi mais tardia no grupo OPL. Houve uma diminuição significativa no número de células calciformes no grupo OPL em relação aos demais grupos.

Conclusão: Os resultados demonstraram que o OP e OL por via oral melhoram os sinais clínicos da CCS, porém essa melhora foi mais precoce com o OP. O uso combinado dos óleos não trouxe benefício adicional. Esses resultados podem contribuir no futuro com novas formulações orais úteis no tratamento adjuvante da CCS.

Palavras-chave ceratoconjuntivite seca, coelhos, óleo de peixe, óleo de linhaça, ômega 3 e 6, oral

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), é uma doença inflamatória crônica frequente em cães e humanos, que ocorre devido a deficiência de produção da porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa) e/ou pela evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa), afetando principalmente a córnea e a conjuntiva, podendo evoluir para cegueira.¹⁻³ Na literatura há muitas indicações terapêuticas para CCS, como substitutos da lágrima, uso de imunossuppressores (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus) e anti-inflamatórios esteroides e não esteroides, controle de infecções secundárias com o uso de antibióticos, além de outros fármacos como pilocarpina (fármaco parassimpatomimético lacrimoestimulante) e acetilcisteína (mucolítico).¹⁻⁷

Estudos na Medicina e na Medicina Veterinária^{8,9} mostraram bons resultados no controle do olho seco com a utilização de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6), devido à sua capacidade de produzir mediadores anti-inflamatórios. Na Medicina, o uso dos ω -3 e ω -6, por via oral, demonstrou ser uma terapêutica alternativa para portadores das variadas formas de deficiência lacrimal bem como em pacientes portadores de síndrome de Sjögren.¹⁰⁻¹²

Os principais mediadores anti-inflamatórios (Figura 1), prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX) das séries 1, 3 e 5 são originados sob a ação enzimática da cicloxigenase 1 (COX1) e da lipoxigenase (LOX) nos AGE originados do ω -3, ácido γ -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) e do ω -6, ácido linoleico (LA), gama-linoleico (GLA) e ácido dihomo-gama-linoleico (DGLA). Os ω -3 e ω -6 são encontrados em muitos alimentos como nozes, peixes de águas frias, semente de soja, óleo de canola, óleo de oliva e o óleo de linhaça, porém há diferenças entre as concentrações destes AGE nas fontes naturais.¹⁰⁻¹²

O óleo de peixe (OP) é uma fonte importante de ω -3, além de possuir elementos essenciais tais como selênio, iodo e vitaminas A, B, D e E. É obtido de peixes de água fria como o salmão, atum e arenque. O OP é classificado como alimento funcional, propiciando a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e neurológicas, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer.¹³⁻¹⁹ Um estudo com dieta rica em ω -3 a partir de consumo de peixe demonstra um efeito protetor contra a degeneração macular em humanos.²⁰

O óleo de linhaça (OL) é obtido da semente da planta *Linum usitatissimum*, é uma fonte importante de ω -3 e ω -6, e possui uma relação ω -3: ω -6 de 3:1 que é considerada ideal. É rica também em lignana (fitoesteróide), fibras solúveis (lignina), vitaminas B1, B2, C, E, e minerais. Possui efeito imunomodulador pela inibição da interleucina-1, que inibe a produção e liberação de fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos e efeito anti-inflamatório pela formação de mediadores -inflamatórios a partir dos AGE ω -3 e ω -6.²¹⁻²³

Uma das principais diferenças entre o OP e o OL é que o OL necessita da conversão do ALA em EPA e DHA, enquanto no OP estes AGE essenciais já são pré-formados, devido à ingestão de plantas marinhas que contém o ω -3 sintetizado, porém o OL é uma fonte de ω -6 que a partir do DGLA origina PGE1 e TXA1 (Figura 1).^{15,16}

Como o óleo de peixe e o óleo de linhaça são fontes de AGE, porém com diferenças na sua composição e concentração, e até o presente momento não há um estudo comparativo da eficácia destes compostos no tratamento da CCS, o objetivo deste trabalho é comparar estas duas importantes fontes de ω -3 e ω -6, por via oral, no tratamento da CCS induzida experimentalmente em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNOESTE (protocolo n° 955) e está de acordo com as normas da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology – Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research). Foram utilizados 28 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, da raça Nova Zelândia, adultos com idade entre 18 a 22 meses e com peso variando entre 3 a 4 kg. Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais, com água e ração (ração para coelhos, Supra[®]) *ad libitum*.

O protocolo de indução da CCS foi baseado em estudos previamente publicados²⁴⁻²⁷ com instilação de 1 gota de atropina 1%, 3x/dia até o diagnóstico em média de 7 a 10 dias. A atropina é um bloqueador muscarínico e a glândula lacrimal é inervada pelo sétimo par de nervos cranianos, desta maneira, o uso tópico da atropina causa diminuição da produção lacrimal com consequente inflamação de maneira similar ao que ocorre na CCS.²⁴ A instilação da atropina foi realizada em ambos os olhos até o diagnóstico de CCS (TLS \leq 5mm e/ou TRFL \leq 10 segundos) e mantido este protocolo 2x/dia por 12 semanas.

Sete animais foram alocados no Grupo C (controle) sem indução da CCS e com administração de 1ml/dia/oral de solução fisiológica como placebo e o restante dos coelhos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de tratamento, sendo o Grupo OP (n=7): óleo de peixe (OP) (Omega 3 Dog[®], Organnact, Paraná, Brasil), 1g/dia/oral; Grupo OL (n=7): óleo de semente de linhaça (OL) (Drylin[®], Ophthalmos, São Paulo, Brasil), 1g/dia/oral; Grupo OPL (n=7): (OP (Omega 3 Dog[®]), 500mg/dia/oral + OL (Drylin[®]), 500mg/dia/oral), os animais receberam esse tratamento durante 12 semanas.

Foram realizados os exames oculares nos tempos T0 (antes da indução da CCS), T1 (1 semana após a indução da CCS), T6 (6 semanas após a indução) e T12 (12 semanas após a indução). Foi realizado exame ocular com lâmpada de fenda portátil identificando-se a

presença ou não de hiperemia conjuntival, secreção mucoide ou mucopurulenta, opacidade corneal, vascularização ou pigmentação corneal, com os seguintes escores: (0) nenhuma alteração; (1) leve; (2) moderada; (3) severa.

Os testes para diagnóstico da CCS foram realizados nos tempos T0 (antes da indução da CCS), T1 (1 semana após a indução da CCS), T2 (2 semanas após a indução da CCS), T4 (4 semanas após a indução da CCS), T8 (8 semanas após a indução da CCS), T12 (12 semanas após a indução da CCS).

O Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) foi realizado para avaliar a quantidade de lágrima produzida, no qual era realizado a limpeza ocular com um algodão seco, 0,5 cm da ponta do papel filtro (Teste de Schirmer[®], Ophthalmos, São Paulo, Brasil) foi introduzida no saco conjuntival por um período de 1 minuto. Após esse tempo o papel foi retirado e avaliado o valor da medição, sendo considerado positivo para CCS valores ≤ 5 mm/min.²⁸

O Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) avalia a deficiência de mucina ocular, sendo utilizada uma tira estéril de fluoresceína a 1% (Fita Estéril de Fluoresceína[®], Ophthalmos, São Paulo, Brasil) embebida em 1 gota de solução fisiológica e encostando-a no saco conjuntival, depois de 2 piscadas a pálpebra foi segura e observado a córnea com um biomicroscópio (lâmpada de fenda portátil) e registrado o TRFL. Este procedimento foi feito em duplicata e a média calculada. Valores ≤ 10 segundos foram considerados positivos para CCS.²⁹

O Teste de Fluoresceína (TF) observa se o estroma da córnea é corado e foi realizado através de uma tira estéril de fluoresceína a 1% (Fita Estéril de Fluoresceína[®], Ophthalmos, São Paulo, Brasil) embebida em 1 gota de solução fisiológica e encostando-a no saco conjuntival e observado se o estroma da córnea foi corado por quadrante (temporal superior, temporal inferior, nasal superior e nasal inferior). O escore do TF foi graduado em 0 a 4: (0)

sem corar; (1) 1 quadrante corado; (2) 2 quadrantes corados; (3) 3 quadrantes corados e (4) 4 quadrantes corados (Figura 2).²⁸

O Teste de Rosa Bengala (TRB) foi realizado para a coloração de células desvitalizadas pela CCS, onde foi utilizado colírio de Rosa Bengala a 1% (Colírio de Rosa Bengala[®], Ophthalmos, São Paulo, Brasil), com instilação prévia de colírio anestésico. Foi considerado positivo para CCS quando alguma área da córnea ou conjuntiva corou em rosa. O escore do TRB foi graduado em 0 a 3: (0) sem corar; (1) somente a conjuntiva corada; (2) somente a córnea corada; (3) conjuntiva e córnea coradas.²⁸

A citologia esfoliativa ocular foi realizada nos tempos T0, T1, T4, T8 e T12. Após a instilação de colírio anestésico, as amostras de células da conjuntiva (superior e inferior) e córnea, foram colhidas com swab estéril umedecido com solução fisiológica, e confeccionada uma lâmina de cada olho, que posteriormente foram fixadas em álcool por cinco minutos. Em seguida uma lâmina de cada região foi corada pela técnica de coloração do ácido periódico de Schiff (PAS) (Merck, EUA), hematoxilina (Dolles, São Paulo, Brasil).³⁰ Foram avaliados os seguintes parâmetros: quantidade de polimorfo e mononucleares, células caliciformes e metaplásicas, presença de mucina e relação núcleo-citoplasma. A contagem das células, em cada lâmina, foi feita em 10 campos(objetiva de 40x), aproximadamente 1mm², utilizando-se microscópio óptico. O escore da celularidade foi: (0) (ausente), (1) leve (1 a 3 células por campo), (2) moderada (4 a 6 células por campo) e (3) severa (>7 células por campo).³⁰

No final do experimento (T12), os coelhos foram submetidos à eutanásia utilizando-se tiopental sódico a 2,5% (Abbott Laboratories, Chicago, EUA) na dose de 200mg/kg por via IV.^{9,27}Foi realizado a enucleação transpalpebral, onde o globo ocular foi colocado em solução de formol a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) por 24 a 48 horas, e posteriormente submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Com auxílio de micrótomo rotativo

foram obtidos cortes de 5µm de espessura da córnea e conjuntiva, os quais foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil), PAS (Merck, EUA) e tricrômio de Masson (Merck, EUA) separadamente. Os parâmetros avaliados foram: quantidade de polimorfo e mononucleares, células caliciformes, presença de metaplasia escamosa no epitélio, edema e relação núcleo-citoplasma. A contagem das células, em cada lâmina, foi feita em 10 campos (objetiva de 40x), aproximadamente 1mm², utilizando-se microscópio óptico.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis TLS, TRFL e densidade de células caliciformes foram utilizados o teste de análise variância (ANOVA) para amostras pareadas com contrastes pelo método de Tukey. Para as variáveis TF e TRB foram utilizados os testes não paramétricos de Friedman, para comparação de momentos e Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Dunn, para comparação de grupos. Foi adotado o nível de significância de $P < 0.05$.³¹

RESULTADOS

Os sinais clínicos observados no início (uma semana de tratamento - T1), no meio (6 semanas de tratamento - T6) e no final do experimento (12 semanas de tratamento - T12) estão descritos na Tabela 1. Houve uma melhora significativa dos sinais de hiperemia conjuntival, secreção ocular e opacidade corneal do T1 até o T12 nos grupos OP, OL e OPL. Nenhum grupo apresentou vascularização ou pigmentação corneal. Houve aumento nos valores de TLS no grupo OP a partir do T2 enquanto que nos demais grupos, OL e OPL, apresentaram melhora nos valores a partir do T4 (Figura 2). No TRFL o grupo OP apresentou melhor resultado (Figura 3). No TF os grupos OP e OL, apresentaram-se negativos no T8, enquanto que o grupo OPL só apresentou-se negativo no T12 (Figura 4). Todas as

irregularidades da córnea que surgiram em decorrência da CCS foram de grau superficial (Figura 5A). Enquanto que no TRB (Figura 6) o desempenho entre os grupos foi similar. Todos os grupos marcaram positivo no TRB a partir do T1 (Figura 5B) .

Na citologia da conjuntiva no T1 (figura 7A), o grupo OPL apresentou 57% de presença moderada de escamas córneas, o grupo OP 35,7% e o grupo OL 42,8%. Enquanto no T4, o grupo OP, OL e OPL apresentaram respectivamente 78,5%, 85,7% e 92,8 % de presença moderada. Nos momentos T8 e T12 os grupos OP, OL, OPL apresentaram presença leve de escamas córneas. Nos valores obtidos da citologia da córnea no parâmetro escamas córneas os grupos OP, OL, OPL apresentaram presença leve em todos os momentos. A presença de células metaplásicas (figuras 7B e 7C) foram encontradas no momento T1 nos grupos OP, OL e OPL foram semelhantes. No grupo OPL no T1 em 7,1% foi encontrado células escamosa anucleadas (figura 7D), nos demais grupos não foi encontrado. No geral houve ausência de mucina nos grupos avaliados, porém no grupo OP 7,1% no T4 apresentou mucina neutra (figura 7E) e no grupo OPL 35,7% apresentou mucina ácida (figura 7F). Encontrou-se ainda, relação núcleo citoplasma preservada em 100% dos grupos avaliados em todos os momentos (T0, T1, T4, T8, T12).

Nos valores obtidos da histopatologia da conjuntiva houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) no número de células caliciformes (figuras 8A e 8B) da conjuntiva no grupo OPL ($5,4 \pm 2,2$) em relação aos grupos C ($8,9 \pm 1,8$), OL ($10,8 \pm 2,0$) e OP ($9,6 \pm 2,1$). No grupo OPL houve presença moderada de metaplasia escamosa em 50% do grupo e congestão moderada em 28,5% (figura 8C). O edema foi leve nos grupos OP e OL, respectivamente 21,4% e 35,7% e moderado no grupo OPL com 50%. Na histopatologia da córnea, o edema e congestão nos grupos OP, OL, OPL foi de grau leve (figura 8D) , respectivamente 7,1%, 14,2% e 21,4%. Na histopatologia da glândula lacrimal os grupos OP e OL não tiveram

alteração, enquanto no grupo OPL 35,7% apresentaram congestão e 7,1% apresentou infiltrado inflamatório (figuras 8E e 8F).

DISCUSSÃO

Os óleos de peixe e de linhaça melhoram os sinais clínicos da CCS induzida nos coelhos neste experimento, aumentando os valores de TLS e TRFL, e promovendo resolução das úlceras de córnea, possivelmente por esses óleos serem ricos em ômega 3 e 6. Os eicosanóides sintetizados dos ácidos derivados do ω -3, EPA e DHA, e os produzidos pelo AGE da série ω -6 competem com o ácido araquidônico (AA) pelas vias enzimáticas cicloxigenase e lipoxigenase, inibindo assim a formação de eicosanóides pró-inflamatórios e aumentando a formação de mediadores anti-inflamatórios.^{22,23}

O controle da inflamação por meio da diminuição da produção de intermediadores do processo inflamatório (citoquinas, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-1 beta), após consumo de óleo de linhaça e óleo de peixe, também foi demonstrado por estudos com voluntários saudáveis e com portadores de artrite reumatoide após dieta suplementar com estes AGE.³² Recentemente, um estudo na veterinária concluiu que o OL, tanto por via oral como tópica, foi eficaz no tratamento da ceratoconjuntivite seca induzida em coelhos e que pode ser um adjuvante natural no tratamento desta enfermidade.⁹

Estes resultados também estão de acordo com um estudo que utilizou uma formulação tópica contendo ômega-6 e ômega-3, em ratos experimentalmente induzidos para CCS, que apresentaram melhora dos sintomas inflamatórios da CCS¹¹, e com outro estudo³³ que relata que a aplicação tópica de lipídeos derivados de ômega-3, como o ácido docosahexanóico (DHA) previnem complicações da CCS como erosão e úlceras de córnea.

Neste estudo, o OP mostrou-se mais precocemente eficiente do que o OL na melhora dos testes da CCS, possivelmente por esse óleo já possuir o EPA e o DHA pré-formados devido à ingestão de plantas marinhas que contém o ω -3 sintetizado. Enquanto que no OL

precisa ocorrer a conversão do ALA para formação do EPA e DHA, e alguns autores ressaltam que o organismo humano consegue converter apenas 5 % do ALA em DHA.¹⁵⁻¹⁶

No presente estudo, o uso associado dos óleos (grupo OPL) não trouxe benefício demonstrando que a associação dos mesmos não potencializa seu efeito e nesse grupo o número de células caliciformes foi menor, uma vez que são elas responsáveis pela produção de mucina no filme pré-lacrimal, auxiliando na lubrificação ocular, sendo que a diminuição dessas células pode levar a deficiências de lubrificação da córnea.³⁴ Na avaliação citológica, o grupo OPL apresentou maior incidência de processo inflamatório, devido ter apresentado maior quantidade de escamas córneas em relação aos demais grupos em todos os momentos, ou seja, as células ganham mais queratina como defesa para se proteger da destruição celular.³⁵ Na avaliação histopatológica, o edema e congestão na conjuntiva foi maior no grupo OPL possivelmente devido ao processo inflamatório encontrado, além da presença de grau leve de mononucleares decorrente do processo inflamatório crônico.^{36,35}

Pode-se concluir que o OP e OL por via oral são eficientes na melhora dos sinais clínicos induzidos pela CCS em coelhos, possivelmente por esses óleos serem ricos em ômega 3 e 6 considerados anti-inflamatórios naturais, sendo que o OP demonstrou esses benefícios mais precocemente e a associação não trouxe benefícios adicionais. Esses resultados podem contribuir no futuro com novas formulações orais úteis no tratamento adjuvante da CCS.

BIBLIOGRAFIA

1. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Archives of Ophthalmology* 2012; **130**:90-100.
2. 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.
3. McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of dry eye. *Survey of Ophthalmology* 2012; **7**: 293-316.
4. Grahn BH; Storey ES. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2004; **34**:739-753.
5. Izci C, Celik I, Alkan F, Ogurtan Z, 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.
6. Ofri R, Lambrou GN, Allgoewer I, Graenitz U, Pena TM et al. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. *Veterinary Journal* 2009; **179**: 70– 77.
7. Berdoulay YA, English RV, Naldelstein B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear productin in dog with Keratoconjunctitis Sicca. *Veterinary Ophthalmology* 2005; **8**: 225–232.
8. 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.
9. 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.

10. Sullivan B, Cermak J, Sullivan R, Papas A *et al.* Correlation between nutrient intake and the polar lipid profiles of meibomian gland secretions in women with Sjogren's syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2002; **506**:441–447.
11. 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.
12. Wojtowicz JC, Butovich I, Uchiyama E. Pilot, prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial of an omega-3 supplement for dry eye. *Cornea* 2011; **30**:308-314.
13. Oehlenschläger J. Seafood: nutritional benefits and risk aspects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 2012; **82**:168-72.
14. Harris WS. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. *Cleveland Clinical Journal of Medicine* 2004; **71**:208–21.
15. David JA, Jenkins, Andrea R, Josse. Fish oil and omega-3 fatty acids. *Canadian Medical American Journal* 2008; **178**:150.
16. Rand AL, Asbell PA. Current Opinion in Ophthalmology Nutritional Supplements for Dry Eye Syndrome. *Current Opinion in Ophthalmology* 2011; **22**: 279–282.
17. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Journal of American Medical Association* 2006; **296**:1885–99.
18. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; **106**:2747–57.
19. Mahaffey K. Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environment Research* 2004; **95**:414–28.

20. Chong EWT, Kreis AJ, Wong TY et al. Dietary-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age related macular degeneration. A systematic review and meta-analysis. *Archives Ophthalmology* 2008; **126**: 826-33.
21. Roncone M, Bartlett H, Eperjesi, F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010; **33**:49-54.
22. Oomah BD. Flaxseed as functional source. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2001; **81**:889-894.
23. Covington MB. Omega-3 fatty acids. *American Family Physician* 2004; **70**:133-140.
24. Buralassi S, Panichi L, Chetoni P, Saettone MF, Boldrini E. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Research* 1999; **31**:229-235.
25. El-Shazly AH, El-Gohrany AH, El-Shazly LH, El-Hossary GG. Comparison between two cyclooxygenase inhibitors in an experimental dry eye model in albino rabbits. *Acta Pharmaceutica* 2008; **58**:163-173.
26. Shafaa MW, El shazly LH, El shazly AH, El gohary AA, El hossary GG. Efficacy of topically applied liposome-bound tetracycline in the treatment of dry eye model. *Veterinary Ophthalmology* 2011; **14**: 18-25.
27. 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.
28. 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.
29. Wei XE, Markoulli M, Zhao Z. Tear film break-up time in rabbits. *Clinical and Experimental Optometry* 2013; **96**:70–75.

30. Martinez AJ, Mills MB, Jaceldo KB et al. Standardization of conjunctival impression cytology. *Cornea* 1995; **14**:512-22.
31. Field A. *Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics*. 4. ed. Thousand Oaks: Sage Publications Limited Textbooks, 2012. p. 952.
32. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; **71**:343-348.
33. Jiucheng H, Bazan HEP. Omega-3 fatty acids in dry eye and corneal nerve regeneration after refractive surgery. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2010; **82**:319-325.
34. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucin (Review). *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**:71-7.
35. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Robbins & Cotran: Patologia – bases patológicas das doenças*. Elsevier, São Paulo: 2010; 972.
36. 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.

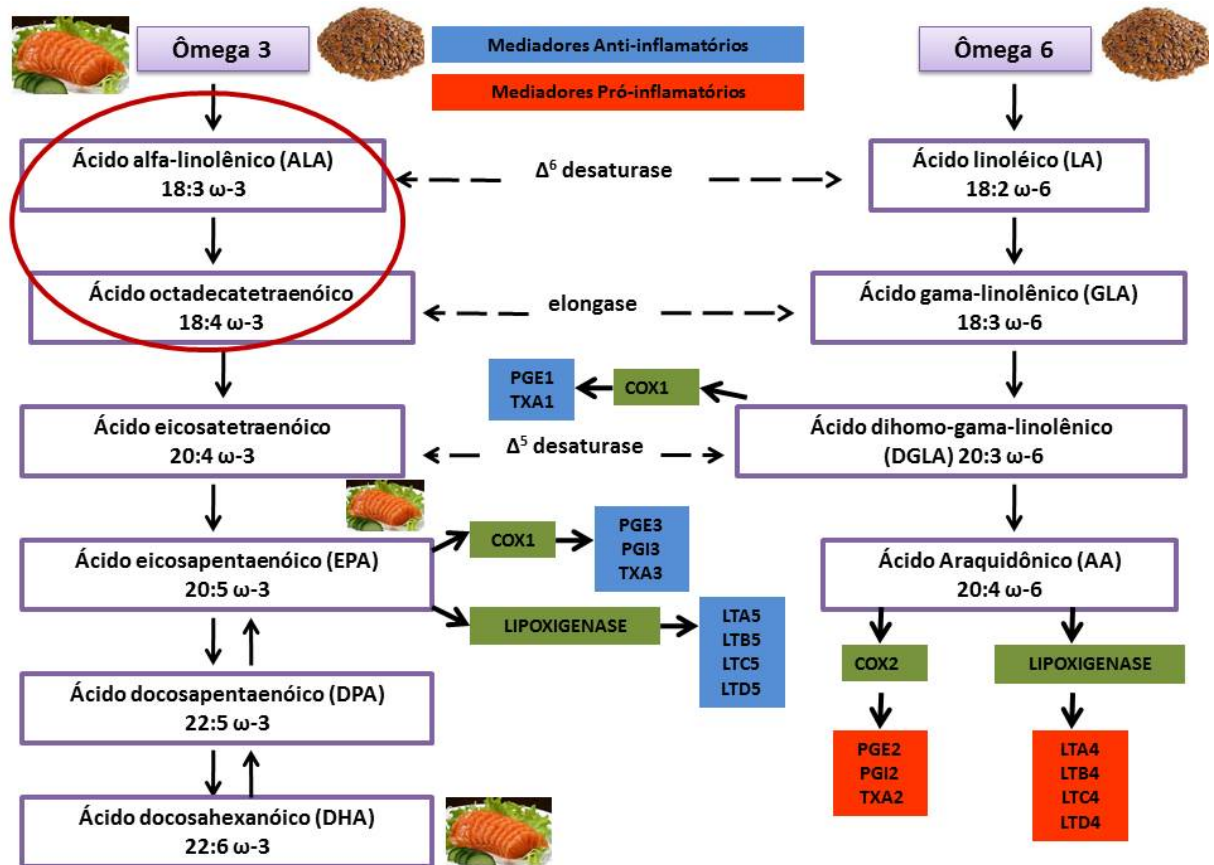


Figura 1. Via da formação de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios a partir dos ácidos graxos essenciais ômega-3 (ω-3) e ômega-6 (ω-3). A ilustração indica como fonte natural de ω-3 o peixe e a linhaça e de ω-6 a linhaça. O círculo em vermelho demonstra a necessidade de conversão do ALA pela enzima delta-6 desaturase no caso da linhaça enquanto no peixe o EPA e DHA já existem pré-formados.

Tabela 1. Médias e desvios padrões dos valores obtidos* dos sinais clínicos observados em 28 olhos de coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a tratamento por via oral com o óleo de linhaça (OL), óleo de peixe (OP) e óleo de peixe e óleo de linhaça (OPL).

Sintomas	T1				T6				T12			
	C	OP	OL	OPL	C	OP	OL	OPL	C	OP	OL	OPL
Hiperemia conjuntival	0,0±0,0	2,0±0,7	2,0±0,5	2,0±0,5	0,0±0,0	1,0±0,5	1,0±0,5	1,0±0,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Secreção mucóide ou purulenta	0,0±0,0	1,0±0,5	0,5±0,5	2,0±0,5	0,0±0,0	0,0±0,5	0,0±0,5	1,0±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Opacidade corneal	0,0±0,0	1,0±0,5	1,0±0,5	1,0±0,5	0,0±0,0	0,0±0,5	0,0±0,5	0,0±0,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Vascularização ou pigmentação corneal	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

*(0) nenhuma alteração; (1) leve; (2) moderada; (3) severa

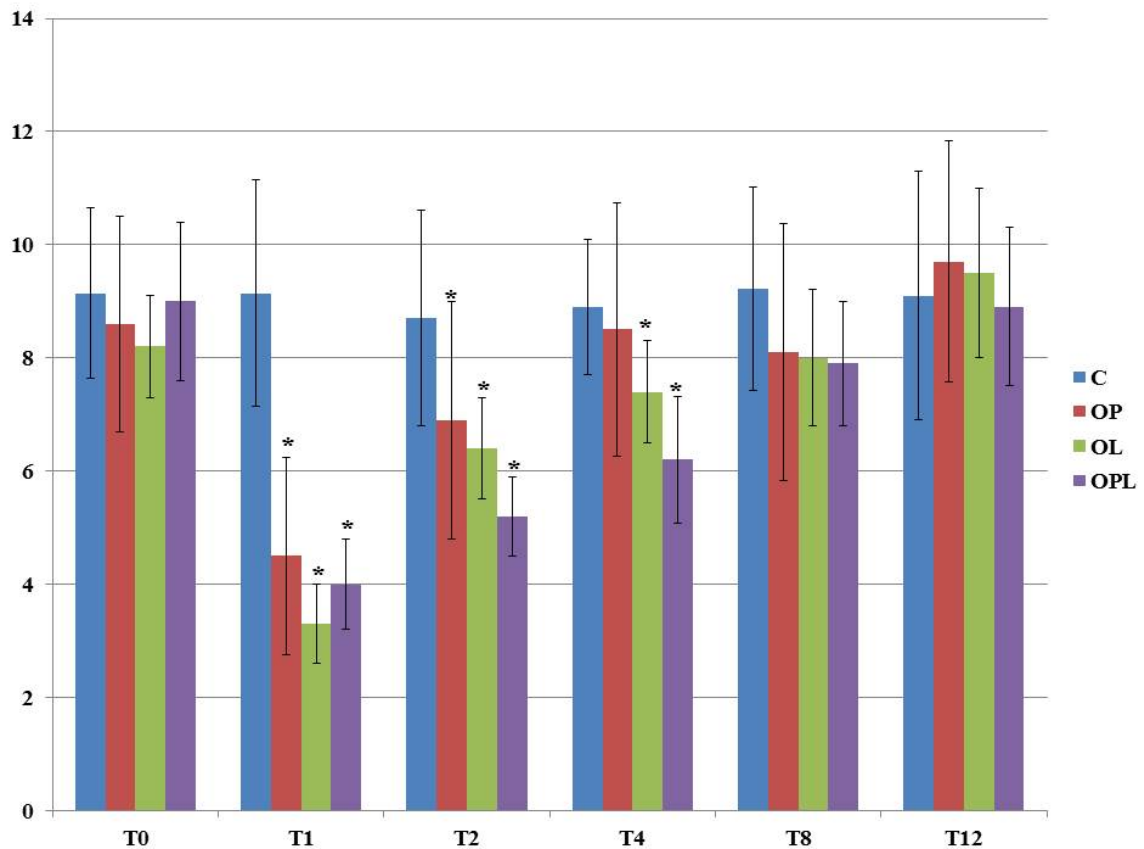


Figura 2. Médias e desvios padrões dos valores obtidos do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)^a em mm/min em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a tratamento por via oral com o óleo de peixe (OP), óleo de linhaça (OL), e óleo de peixe e óleo de linhaça (OPL).

^avalores ≤ 5 mm/min (positivo para CCS)

* $P < 0,05$ (Teste de Tukey comparado com o grupo Controle em cada momento)

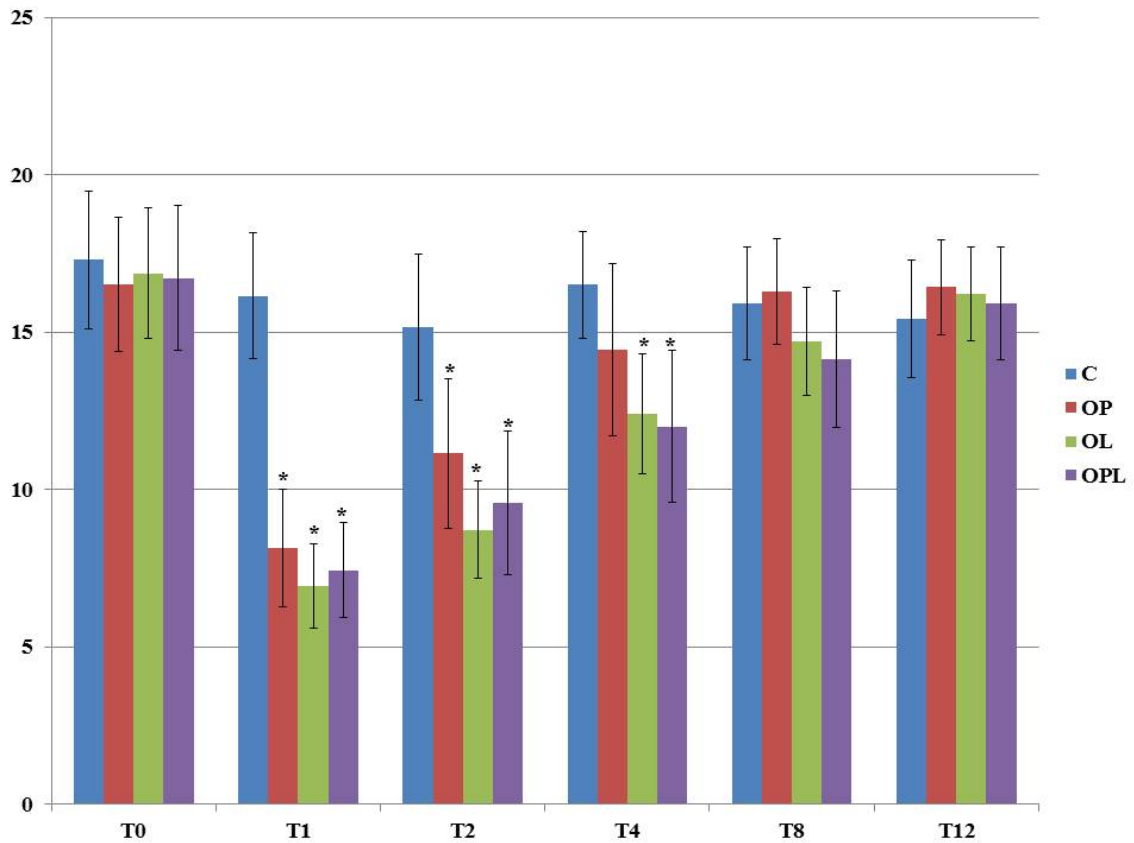


Figura 3. Médias e desvio padrões dos valores obtidos do Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL)^a em segundos, em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a tratamentos por via oral com óleo de peixe (OP), óleo de linhaça (OL), e óleo de peixe e óleo de linhaça (OPL).

^aTRFL ≤ 10 segundos (positivo para CCS)

*P < 0,05 (Teste de Tukey comparado com o grupo Controle em cada momento)

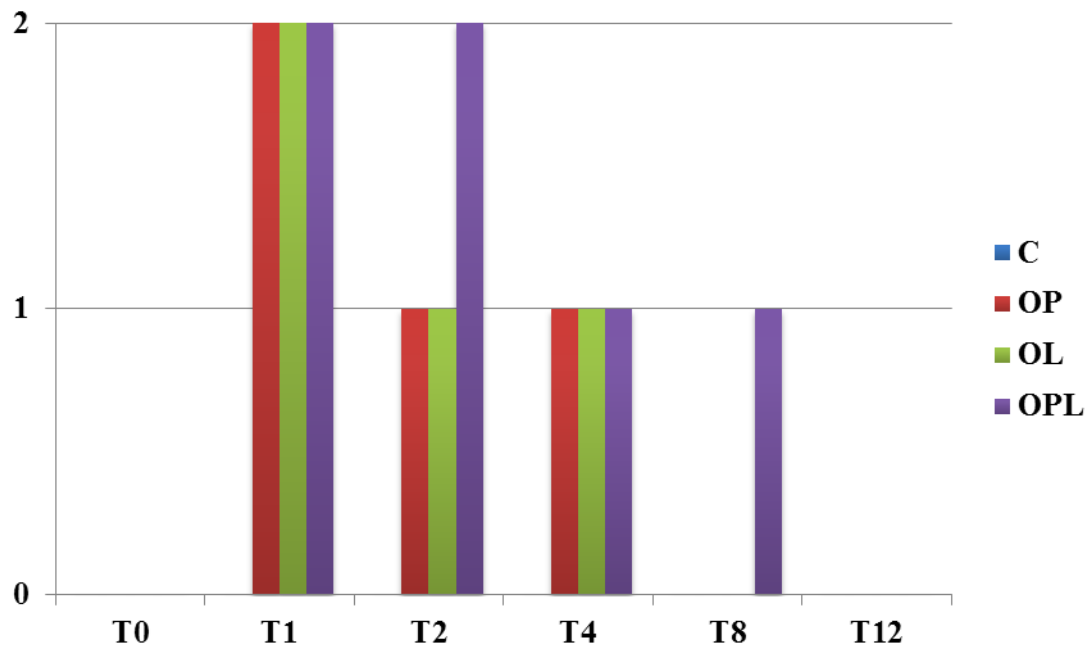


Figura 4. Medianas dos valores obtidos do Teste de Fluoresceína*, em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a tratamentos por via oral com o óleo de peixe (OP), óleo de linhaça (OL), e óleo de peixe e óleo de linhaça (OPL).

*(0) sem corar; (1) 1 quadrante corado; (2) 2 quadrantes corados; (3) 3 quadrantes corados e (4) 4 quadrantes corados



Figura 5. (A) TF positivo demonstrando uma irregularidade superficial de córnea e hiperemia conjuntival do coelho n.5 do grupo OPL no T8. (B) TRB positivo no quadrante superior corneal do coelho n.2 do grupo OL no T2.

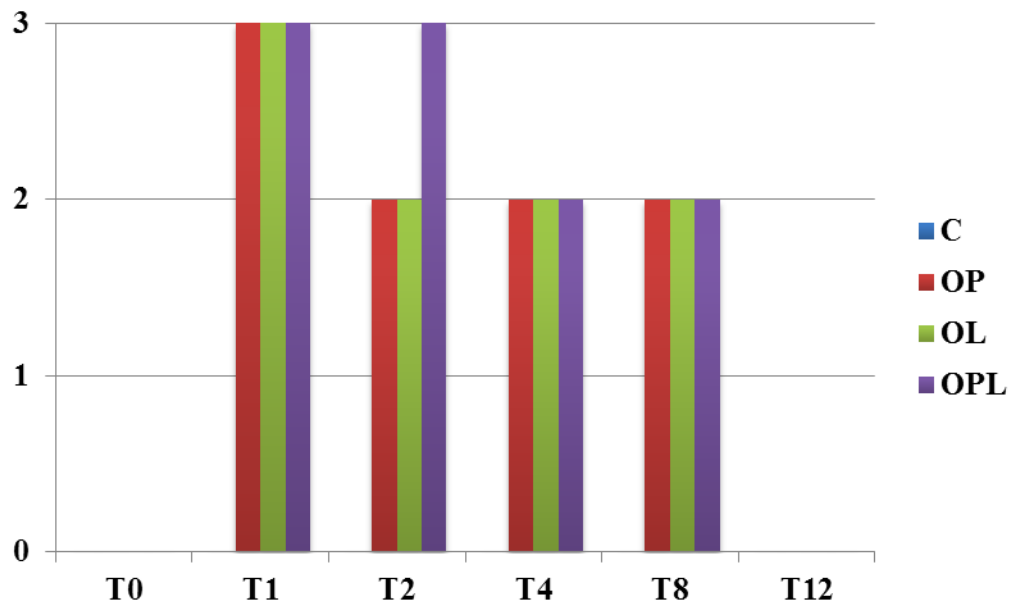


Figura 6. Medianas dos valores obtidos do Teste de Rosa Bengala*, em coelhos experimentalmente induzidos para ceratoconjuntivite seca (CCS) e submetidos a tratamentos por via oral com o óleo de peixe (OP), óleo de linhaça (OL), e óleo de peixe e óleo de linhaça (OPL).

*(0) sem corar; (1) somente a conjuntiva corada; (2) somente a córnea corada; (3) conjuntiva e córnea corada.

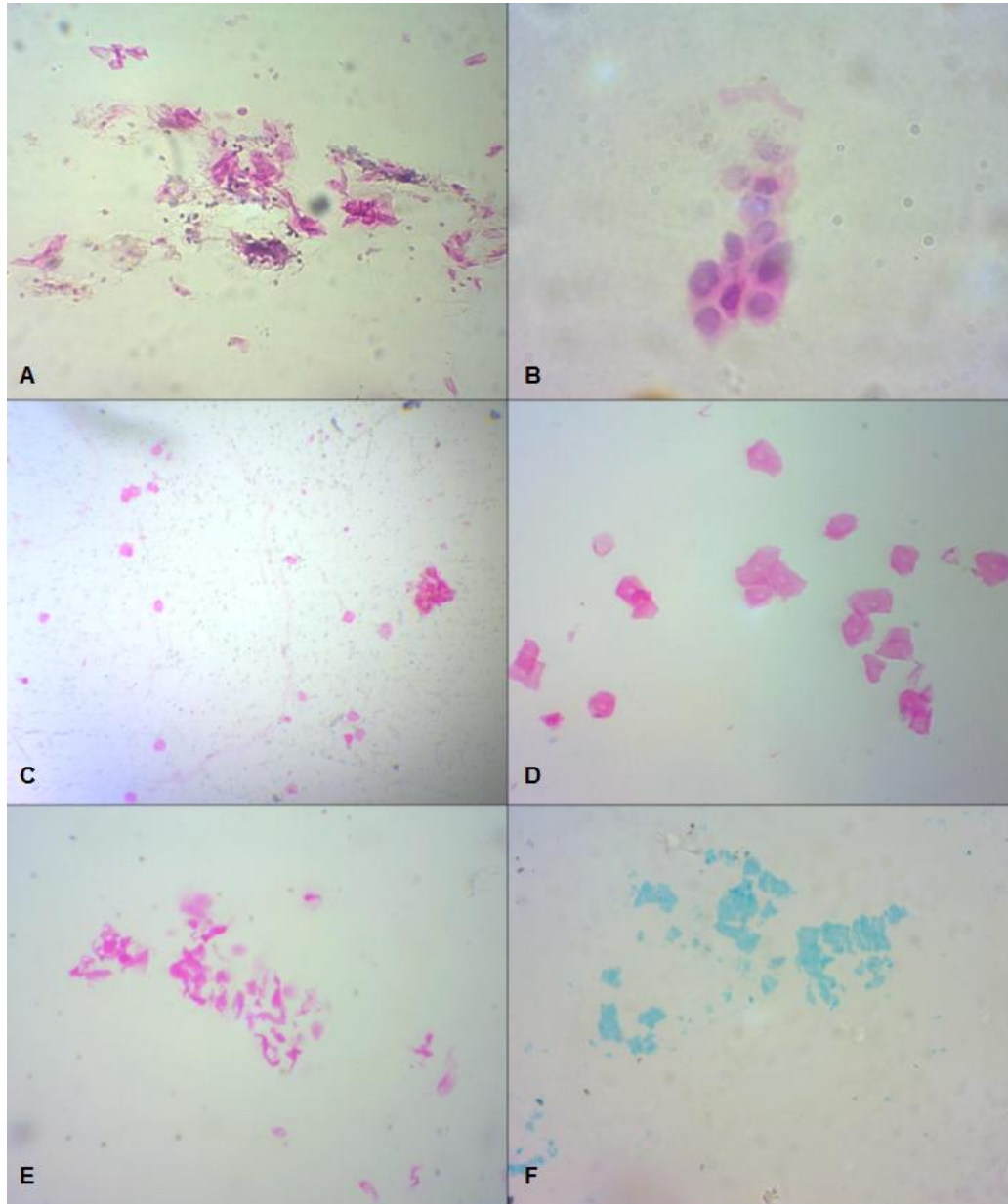


Figura 7 – Esfregaços citológicos: A – T1 – Grupo OPL (óleo de linhaça e óleo de peixe) – olho esquerdo – escamas córneas em meio a células inflamatórias (Hematoxilina-eosina, 100x). B – T1 – Grupo OPL – olho esquerdo - células metaplásicas (Hematoxilina-eosina, 400x). C – T1 – Grupo OPL – olho esquerdo - escamas córneas e células metaplásicas em meio a células inflamatórias (Hematoxilina-eosina, 100x). D – T1 – Grupo OPL – olho esquerdo - Células escamosas anucleadas (Hematoxilina-eosina, 200x). E – T4 – Grupo OP (óleo de peixe) – olho direito - muco neutro (PAS-Azul de Alcian, 100x). F – T4 – Grupo OPL – olho direito – muco ácido (PAS-Azul de Alcian, 100x).

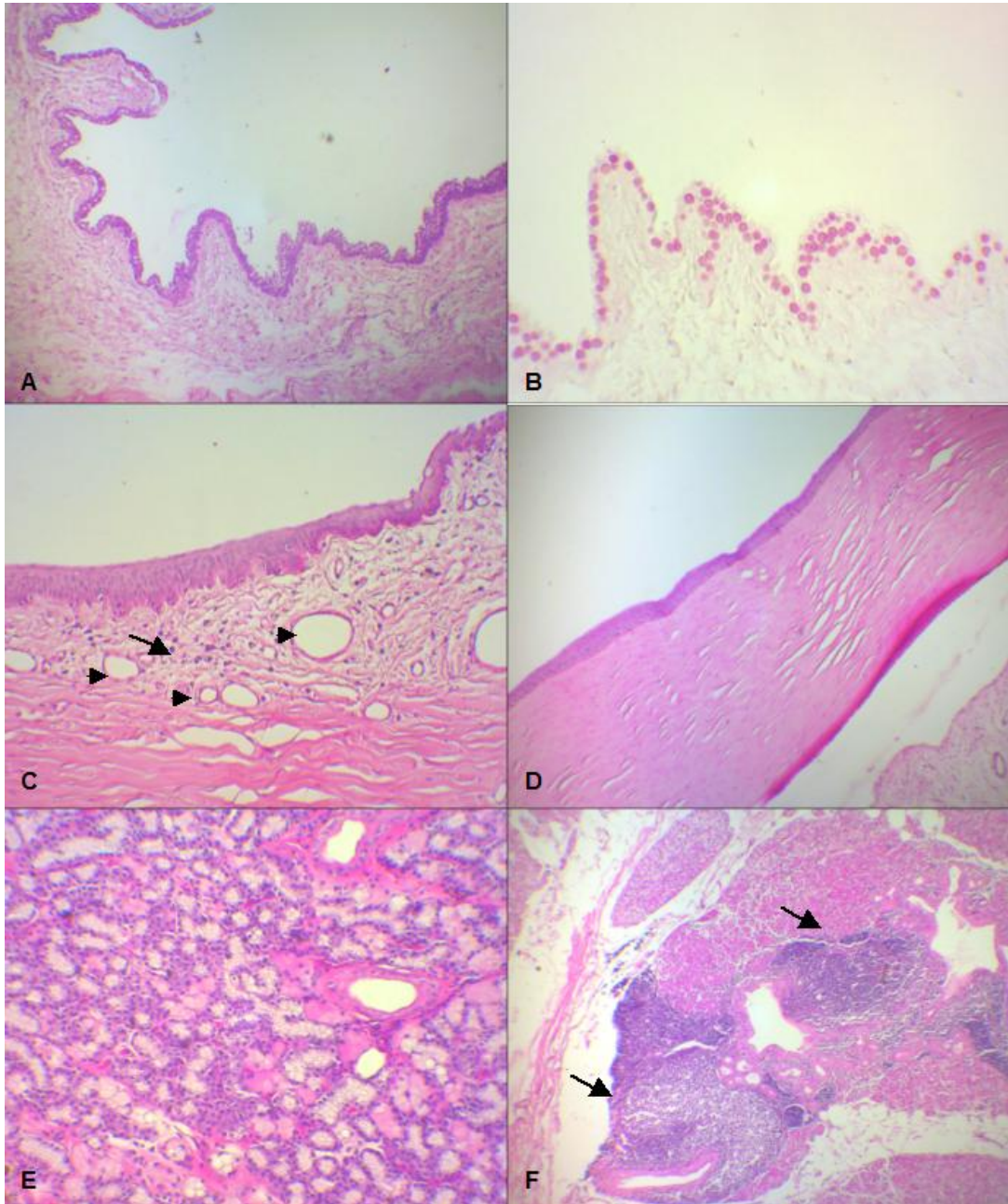


Figura 8 – Exame histopatológico – T12: Figura – A – Grupo OL (óleo de linhaça) – Conjuntiva com grande número de células caliciformes (Hematoxilina-eosina, 100x). B – Grupo OL – Células caliciformes (PAS-Azul de Alcian, 200x). C – Grupo OPL – Conjuntiva com metaplasia escamosa, discreto infiltrado de linfócitos (seta) e congestão vascular (cabeças de seta) (Hematoxilina-eosina, 200x). D – Grupo OL – Córnea com edema (Hematoxilina-eosina, 200x). E – Grupo OP (óleo de peixe) – Glândula lacrimal normal (Hematoxilina-eosina, 200x). F – Grupo OP – Glândula lacrimal com moderada infiltrado inflamatório (setas) (Hematoxilina-eosina, 100x).

ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Veterinary Ophthalmology

Published on behalf of

Edited by:

David A. Wilkie

Print ISSN: 1463-5216

Online ISSN: 1463-5224

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 13 / 2010

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

Impact Factor: 1.559

TopAuthor Guidelines

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

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

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

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

Getting Started

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

Submitting Your Manuscript

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

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

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

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

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

Manuscript Style

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

Title Page

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

Abstract and Keywords

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

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

Main Text

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

References

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

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

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

Electronic Artwork

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

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

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

Video Files

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

Tables

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

Acknowledgements

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

Author Editing Services

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission or during the review process. Authors wishing to pursue a professional English-language editing service should make contact and arrange payment with the editing service of their choice. For more details regarding the recommended services, please refer to http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. 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.