

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGVET

DÁBILA ARAÚJO SONEGO

**EFEITOS SISTÊMICOS E NA SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES SUBMETIDOS À
INSTILAÇÃO DE CETOROLACO DE TROMETAMOL POR 30 DIAS**

Cuiabá
2023

DÁBILA ARAÚJO SÔNEGO

**EFEITOS SISTÊMICOS E NA SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES SUBMETIDOS À
INSTILAÇÃO DE CETOROLACO DE TROMETAMOL POR 30 DIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso, para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pinto Ribeiro

Cuiabá
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

A663e Araújo Sônego, Dábila.

EFEITOS SISTÊMICOS E NA SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES SUBMETIDOS À INSTILAÇÃO DE CETOROLACO DE TROMETAMOL POR 30 DIAS [recurso eletrônico] : Efeitos do colírio cetorolaco de trometamol no hemograma, na bioquímica sérica e na urinálise em cães saudáveis; Efeitos do cetorolaco de trometamol tópico nos parâmetros lacrimais, na densidade de células caliciformes e no estresse oxidativo da conjuntiva de cães saudáveis / Dábila Araújo Sônego. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 111 f., pdf). -- 2023.

Orientador: Alexandre Pinto Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2023.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITOS SISTÊMICOS E NA SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES SUBMETIDOS A INSTILAÇÃO DE CETOROLACO DE TROMETAMOL POR 30 DIAS".

AUTORA: DOUTORANDA DÁBILA ARAÚJO SONEGO

Tese defendida e aprovada em 26 de maio de 2023.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Doutor Alexandre Pinto Ribeiro (Presidente Banca/ Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Lianna Ghisi Gomes (Examinador Interno)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Caroline Argenta Pescador (Examinador Interno)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Gabriela Moraes Madruga (Examinador Externo)

Instituição: Médica veterinária autônoma

Doutor Tiago Barbalho Lima (Examinador Externo)

Instituição: Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Doutor Pedro Eduardo Brandini Néspoli (Examinador Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Cuiabá, 26 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **LIANNA GHISI GOMES, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 29/05/2023, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Moraes Madruga, Usuário Externo**, em 30/05/2023, às 05:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALEXANDRE PINTO RIBEIRO, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 30/05/2023, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Barbalho Lima, Usuário Externo**, em 30/05/2023, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CAROLINE ARGENTA PESCADOR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 16/06/2023, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5832085** e o código CRC **C4290F4C**.

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de estudos,

A Dra Natalie Dower, por disponibilizar o aparelho OSAVET,

Ao laboratório de Patologia Clínica do HOVET-UFMT, pela colaboração na realização de exames

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. Efeitos do colírio ceterolaco de trometamol no hemograma, na bioquímica sérica e na urinálise em cães saudáveis.....	8
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1. Cascata do ácido aracdônico e ação geral dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)	11
3.2. Ceterolaco de trometamol (CT).....	12
3.3. Efeitos adversos relacionados aos AINEs	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1. Aspectos éticos	13
4.2. Seleção de cães	14
4.3. Avaliação sistêmica	14
4.4. Tratamentos e procedimentos	15
4.5. Análise estatística	15
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2. Efeitos do ceterolaco de trometamol tópico nos parâmetros lacrimais, na densidade de células calciformes e no estresse oxidativo da conjuntiva de cães saudáveis	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. OBJETIVOS	31
3. REVISÃO DE LITERATURA	32
3.1. Soluções oftálmicas a base anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)	32
3.2. O sistema lacrimal	33
3.3. Avaliação do filme lacrimal.....	34
3.4. Biomarcadores do estresse oxidativo	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	36

4.1. Aspectos éticos.....	36
4.2. Critérios de inclusão	37
4.3. Tratamentos.....	37
4.4. Avaliação do filme lacrimal e meibografia.....	37
4.5. Biópsia conjuntival e determinação da densidade de células caliciformes (DCC).....	41
4.6. Quantificação de biomarcadores de estresse oxidativo (BEO)	42
4.7. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Avaliação do filme lacrimal e meibografia.....	43
5.2. Densidade de células califormes (DCC) conjuntivais.....	48
5.3. Biomarcadores do estresse oxidativo (BEO)	51
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO I. Comprovante de submissão do artigo “Effects of trometamol ketorolac eye drops on blood count, serum biochemistry, and urinalysis in healthy dogs” ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, <i>quallis</i> B1	70
APÊNDICE A – Arquivo submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia	71
ANEXO II. Comprovante de submissão do artigo “Effects of topical trometamol ketorolac on tears parameters, goblet cell density and the oxidative stress of the conjunctiva of healthy dogs” ao periódico Veterinary Ophtalmology, fator de impacto 1,44	81
APÊNDICE B – Submissão ao periódico Veterinary Ophtalmology	83
APÊNDICE C – Artigo aceito e publicado no periódico Acta Scientiae Veterinariae	104

CAPÍTULO 1. Efeitos do colírio ceterolaco de trometamol no hemograma, na bioquímica sérica e na urinálise em cães saudáveis

RESUMO

Objetivou-se avaliar se a instilação de solução oftálmica de anti-inflamatório não esteroidal a base de ceterolaco de trometamol durante 30 dias consecutivos alteraria os parâmetros clínicos, em hemograma, bioquímica sérica e na urinálise de cães saudáveis. Onze cães de pequeno porte (2,9-10 kg) com idades entre 2 e 10 anos foram recrutados para a pesquisa. Os cães foram tratados a cada 12 h com 40 µL de ceterolaco de trometamol a 0,4% em ambos os olhos, durante 30 dias consecutivos. As coletas de sangue e urina foram realizadas para obtenção de valores basais e aos 15 e 30 dias após o início do tratamento. A creatinina se elevou de forma significativa decorridos 15 ($1,21 \pm 0,1$ mg/ dL) e 30 dias ($1,22 \pm 0,1$ mg/ dL) da avaliação basal ($0,94 \pm 0,1$ mg/ dL) ($p < 0,01$). O potássio se elevou significativamente apenas ao 30º dia ($4,66 \pm 0,15$ mEq /L), comparativamente a avaliação do 15º dia ($4,32 \pm 0,12$ mEq /L) e ao basal ($4,36 \pm 0,15$ mEq /L) ($p < 0,05$). Embora a significância, tanto creatinina quanto potássio permaneceram dentro do intervalo de referência para a espécie. Os demais parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários não se alteraram de forma significativa durante o estudo ($p > 0,05$), concluindo que a instilação de ceterolaco de trometamol por 30 dias não provocou alterações relevantes nestes parâmetros, em cães saudáveis.

Palavras-chave: creatinina, sódio, AINE tópico, absorção sistêmica.

Effects of trometamol ketorolac eye drops on blood count, serum biochemistry, and urinalysis in healthy dogs

ABSTRACT

This study aimed to evaluate whether the instillation of a non-steroidal anti-inflammatory ophthalmic solution based on trometamol ketorolac for 30 consecutive days may change the blood count, the serum biochemistry profile, and the urinalysis of healthy dogs. Eleven small breed dogs (2.9-10 kg), with ages ranging from 2 to 10 years were enrolled in the study. Dogs received 40 μ L of 0.4% trometamol ketorolac eye drops, every each 12 h in both eyes for 30 consecutive days. Blood and urinary samples were collected at baseline, and following 15 and 30 days of the beginning of the treatment. Creatinine levels increased significantly at day 15 (1.21 ± 0.1 mg/dL) and 30 (1.22 ± 0.1 mg/dL) when compared with baseline (0.94 ± 0.1 mg/dL) ($p < 0.01$). Significantly increased values of serum potassium were observed only at day 30 (4.66 ± 0.15 mEq/L), when compared with day 15 (4.32 ± 0.12 mEq/L) and baseline (4.36 ± 0.15 mEq/L) ($p < 0.05$). The other hematological and biochemical parameters did not change significantly during the study ($p > 0.05$). Despite significance, both creatinine and potassium remained within the reference range for the species. The other hematological, biochemical and urinary parameters did not change significantly during the study ($p > 0.05$), concluding that the instillation of trometamol ketorolac for 30 days did not cause relevant changes in these parameters in healthy dogs.

Keywords: creatinine, sodium, lactate, topical NSAID, systemic absorption.

1. INTRODUÇÃO

Quando soluções oftálmicas são instiladas, uma porção do fármaco é absorvida sistemicamente via vasos conjuntivais e drenagem nasolacrimal, onde pode ser absorvida pela mucosa nasal ou deglutida (SEGABB *et al.*, 2020; EWALD *et al.*, 2022).

A ocorrência de eventos sistêmicos adversos secundários a instilação ocular de AINEs, embora rara, foi relatada em seres humanos, como a inibição *in vitro* da função plaquetária e exacerbação da asma brônquica (FALCINELLI *et al.*, 2019; SYED *et al.*, 2021). A absorção sistêmica após a instilação de AINEs oftálmicos também foi confirmada em frangos, coelhos e gatos (HSU *et al.*, 2015; LANUZA *et al.*, 2016; GRIGGS *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019).

Em frangos, a administração tópica de diclofenaco em um ou ambos os olhos diminuiu os níveis de proteína total, mas não alterou os níveis plasmáticos de ácido úrico (GRIGGS *et al.*, 2017). Da mesma forma, Pereira *et al.* (2019) demonstraram que coelhos tratados por 90 dias com uma solução oftálmica tópica de cetorolaco de trometamol (CT) não desenvolveram eventos sistêmicos adversos com base em sinais clínicos, consumo de alimentos, achados laboratoriais e histopatologia dos rins e do fígado. Dois estudos em gatos saudáveis mostraram que a instilação de diclofenaco ou flurbiprofeno como soluções oftálmicas, não induziu anormalidades clinicamente relevantes no hemograma total, na urinálise ou perfil bioquímico sérico de algumas enzimas (HSU *et al.*, 2015; LANUZA *et al.*, 2016). Entretanto, em um desses estudos, Hsu *et al.* (2015) relataram que gatos tratados com diclofenaco apresentaram redução significativa na taxa de filtração glomerular (TFG), presumivelmente devido à hipovolemia iatrogênica.

Desconhecem-se estudos anteriores reportando possíveis eventos sistêmicos adversos após a administração de AINEs tópicos como soluções oftálmicas em cães. Considerando que cães são comumente tratados com medicações tópicas, incluindo AINEs, por longos períodos antes e após a cirurgia de catarata, é importante avaliar as possíveis alterações nos parâmetros sistêmicos em indivíduos que recebem essa classe de medicamentos.

2. OBJETIVOS

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar se a instilação de CT por 30 dias consecutivos afetaria os valores de hematócrito, hemoglobina, plaquetas, leucograma, albumina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina, lactato, sódio, potássio e parâmetros da urinálise em cães saudáveis.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Cascata do ácido araquidônico e ação geral dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)

A ocorrência de qualquer tipo de injúria celular provoca a liberação do ácido araquidônico da membrana celular pela ação da fosfolipase A₂ (GORNIAK, 2011). Em seguida, o ácido araquidônico sofre a ação das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). A COX converte o ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina, enquanto a LOX converte em leucotrienos, hidroperóxido e hidroxi-eicosatetraenóicos (WOERDT, 2001). A ciclooxigenase-1 (COX-1) é responsável pela conversão do ácido araquidônico em tromboxano (tromboxano A₂), prostaglandinas (PGD₂, PGE, PPGF₂) e prostaciclina (PGI₂) enquanto a ciclooxigenase-2 (COX-2) produz um grande espectro de prostaglandinas, especificamente PGE₂ e prostaciclina (SPARKES *et al.*, 2010). A PGE₂ é a prostaglandina mais importante, pois atua como mediador dos sinais típicos da inflamação: rubor, calor, dor, tumor e diminuição da função (STAREK, 2011).

A COX-1 é considerada constituinte predominante expresso em quase todos os tecidos e envolvendo a produção de prostaglandinas responsáveis por manter as funções do tecido como efeito citoprotetor da mucosa gástrica, função plaquetária e manutenção da perfusão renal. A COX-2 aparece de forma mais restrita, embora presente como COX-1 no sistema nervoso central, rins, endotélio vascular, trato reprodutivo e gastrointestinal, onde contribui para funções de homeostase. É induzida e permanece indetectável em células não estimuladas de mamíferos, sendo expressa abundantemente durante a inflamação, regulando a síntese de PGE₂, que por sua vez exerce atividade imunossupressora e vasodilatadora, melhorando a permeabilidade

vascular e facilitando a invasão patogênica (KIM *et al.*, 2006; SPARKES *et al.*, 2010). Portanto, a COX-1 é a enzima predominantemente constitutiva, enquanto a COX-2 é a enzima predominantemente induzida por mediadores como as citocinas e diretamente associada a processos patológicos (SPARKES *et al.*, 2010; GORNIK, 2011).

Os AINES podem inibir ao mesmo tempo a(s) COX(s), enzima responsável por catalisar a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (HILTON *et al.*, 2011). São classificados de acordo com a seletividade em inibir uma ou mais isoformas da enzima COX (MCCANN *et al.*, 2005; RANKIN *et al.*, 2013).

3.2. Ceterolaco de trometamol (CT)

O CT é um AINE não seletivo para as COXs, pertencendo ao grupo do ácido heteroaril acético (WATERBURY, 2018). Em cães, a dose recomendada pela via intravenosa (IV) é de 0,5 mg/kg, sendo que a sua ligação com as proteínas plasmáticas é de 98,7% (CAGNARDI *et al.*, 2013). Nessa espécie, o CT atinge a sua máxima concentração plasmática de 2,48 µ/mL nos primeiros minutos após a sua administração, sendo que a eliminação da sua meia vida leva 10,95 h (CAGNARDI *et al.*, 2013). Em cães, a administração direta de CT a 0,3% na câmara anterior atingiu níveis vítreos e retinianos significativos, mesmo após 10 h de sua administração (WATERBURY, 2018).

O CT é um AINE comumente prescrito como solução oftálmica em oftalmologia veterinária. Em comparação com os corticosteroides tópicos, os AINES tópicos são uma escolha terapêutica mais prudente no tratamento de pacientes com diabetes que apresentam ceratouveíte ulcerativa ou abscessos estromais (GIULIANO, 2004).

3.3. Efeitos adversos relacionados aos AINES

Em cães, os efeitos adversos associados ao uso de AINES sistêmicos incluem distúrbios gastrointestinais, discrasias sanguíneas, hipoproteïnemia, broncoconstrição, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (GIULIANO, 2004; LIESER *et al.*, 2021). Após a instilação de soluções oftálmicas, uma porção do fármaco é

absorvida sistemicamente via vasos conjuntivais e drenagem nasolacrimal, onde pode ser absorvida pela mucosa nasal ou deglutida (SEGABB *et al.*, 2020; EWALD *et al.*, 2022).

A ocorrência de eventos sistêmicos adversos secundários a instilação ocular de AINEs, embora rara, foi relatada em seres humanos, como a inibição *in vitro* da função plaquetária e exacerbação da asma brônquica (FALCINELLI *et al.*, 2019; SYED *et al.*, 2021). A absorção sistêmica após a instilação de AINEs oftálmicos também foi confirmada em frangos, coelhos e gatos (HSU *et al.*, 2015; LANUZA *et al.*, 2016; GRIGGS *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019). Em frangos, a administração tópica de diclofenaco em um ou ambos os olhos diminuiu os níveis de proteína total, mas não alterou os níveis plasmáticos de ácido úrico (GRIGGS *et al.*, 2017). Da mesma forma, Pereira *et al.* (2019) demonstraram que coelhos tratados por 90 dias com uma solução oftálmica tópica de CT não desenvolveram eventos sistêmicos adversos com base em sinais clínicos, consumo de alimentos, achados laboratoriais e histopatologia dos rins e do fígado. Dois estudos em gatos saudáveis mostraram que a instilação de diclofenaco ou flurbiprofeno como soluções oftálmicas, não induziu anormalidades clinicamente relevantes no hemograma total, na urinálise ou perfil bioquímico sérico de algumas enzimas (HSU *et al.*, 2015; LANUZA *et al.*, 2016). Entretanto, em um desses estudos, Hsu *et al.* (2015) relataram que gatos tratados com diclofenaco apresentaram redução significativa na taxa de filtração glomerular (TFG), presumivelmente devido à hipovolemia iatrogênica.

A eficácia do CT em reduzir a síntese de PGE₂ ou a quantificação da sua taxa de absorção sistêmica após administração como solução oftálmica nunca foram determinados em cães.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), sob o número de protocolo 23108.043452/2022-05.

4.2. Seleção de cães

Quatro cães machos castrados e sete cadelas castradas (n=11), com idades entre 2 e 10 anos e peso de 1,9 a 10,3 kg foram incluídos neste estudo. As raças incluídas foram as seguintes: Schnauzer (1), Pincher (3), Dachshund (1), Yorkshire Terrier (2) e sem raça definida (4). Anamnese e exame físico geral foram realizados em cada paciente, avaliando mucosas, ausculta pulmonar e cardíaca, palpação de linfonodos, temperatura corporal, presença de ectoparasitas, e tempo de preenchimento capilar. Os critérios de exclusão foram perfil do tutor, comportamento agressivo ou intolerância a contenção, tratamento atual ou recente (30 dias antes) com qualquer medicamento oftálmico sistêmico ou tópico e histórico de alterações oftálmicas ou qualquer outra comorbidade sistêmica conhecida.

4.3. Avaliação sistêmica

Foram coletados 5 mL de sangue da veia jugular para avaliação hematológica (hematócrito, hemoglobina, plaquetas, leucograma e proteína total) e análise bioquímica sérica (albumina, ALT, FA, uréia, creatinina, lactato, sódio e potássio) de cada cão. Para a realização de alguns dos exames laboratoriais descritos acima, foram utilizados analisadores hematológicos automatizados (pocH-100iv Diff, Sysmex, Brasil) e bioquímicos (CM 250, Wiener lab group, Brasil). As contagens de hematócrito e plaquetas foram determinadas manualmente usando microscopia de luz. Os níveis de lactato foram determinados com um lactímetro portátil (Accutrend Plus®, Roche, Brasil). Os níveis de sódio e potássio foram medidos usando um analisador de eletrólitos (EasyLite, Grupo Kovalent, Brasil).

Amostras frescas de urina foram coletadas via cistocentese guiada por ultrassom em cadelas e cateterismo uretral em cães machos para realização da urinálise e determinação da relação de proteína/creatinina (PCU). Na urinálise, a densidade específica foi medida por refratometria (Atago Refractometer®). O pH e outros parâmetros químicos foram avaliados com tiras reagentes (Combur10 Test UX, Roche, Brasil) e registrados em leitor específico (Urisys 1100, Roche, Brasil). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em cada cão, aproximadamente uma

semana antes do início do estudo para garantir que todos os indivíduos estivessem saudáveis para determinação dos valores basais.

4.4. Tratamentos e procedimentos

Uma vez selecionados, os 11 cães receberam 40 µL de solução oftálmica CT 0,4% em ambos os olhos, a cada 12 h, por 30 dias consecutivos. O estado geral dos animais e a tolerância gastrointestinal (ingestão alimentar, vômitos, diarreia e melena) aos AINEs foram avaliados diariamente. Exame físico, peso corporal e parâmetros sanguíneos e urinários foram avaliados até um dia antes, 15 e 30 dias após o início do tratamento com CT. Todos os cães incluídos no estudo foram mantidos em suas casas, tratados e examinados diariamente por veterinários envolvidos no estudo. Para coleta de amostras de sangue e urina, os cães foram levados ao hospital e conduzidos pelos mesmos veterinários. Uma mensagem automática foi enviada duas vezes ao dia, a todos os veterinários participantes do estudo, como um lembrete para verificar se o tratamento estava sendo administrado corretamente, e perguntando sobre a ocorrência de vômito, diarreia, melena ou anorexia. Os participantes que não respondessem às mensagens ou não conseguissem administrar os tratamentos em um determinado momento, tiveram seus cães excluídos do estudo.

4.5. Análise estatística

O tamanho da amostra foi determinado com uma taxa de erro alfa de 5% e poder de 80% com base no desvios padrões e no limites de equivalência para valores hematológicos e bioquímicos publicados anteriormente em estudos que usaram 6 cães por grupo como modelo animal para tolerância a AINEs administrados sistemicamente (LUNA *et al.*, 2007; FUSELLIER *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2013). Maior ou igual a 7 cães foi definido como tamanho de amostra apropriado (www.sealedenvelope.com). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Todas as variáveis foram comparadas por meio de análise de variância unidirecional para medidas repetidas, seguida do teste de múltiplas comparações de Bonferroni para avaliar as possíveis diferenças nos valores observados nos dias 15 e 30 em relação aos valores basais. As diferenças foram

consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$ (Prism 4.0-GraphPad Software inc, Califórnia, EUA). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5. RESULTADOS

No presente estudo, a instilação de CT por 30 dias consecutivos não resultou em anormalidades e no quantitativo de eritrócitos e plaquetas ($p > 0,05$) (Tabela 1). Bem como nos níveis de ALT e FA, que permaneceram dentro da faixa de referência para cães e não se alteraram significativamente ao longo do período do estudo ($p = 0,58$) (Tabela 1). Embora a ureia e a creatinina tenham permanecido dentro do intervalo de referência para cães, os níveis de creatinina aumentaram significativamente ($p = 0,0006$) no dia 15 (Tabela 1).

Não foram observadas alterações nos níveis séricos de potássio ($p = 0,06$) (Tabela 1). Em contraste, os níveis de sódio aumentaram significativamente nos dias 15 e 30 em comparação com os valores basais ($p < 0,01$) (Tabela 1). Entretanto, esses valores permaneceram dentro do intervalo de referência em todos os momentos. Durante todo o período do estudo, os níveis séricos de proteína total permaneceram constantes e dentro da faixa de referência para cães ($p = 0,06$) (Tabela 1). Os níveis de albumina também permaneceram dentro do intervalo de referência durante o estudo, no entanto, em comparação com o período basal, os níveis de albumina foram significativamente maiores no dia 15 ($p < 0,001$) (Tabela 1). Acerca dos níveis de lactato, os valores eram normais e não se alteraram durante o estudo ($p = 0,37$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ desvio padrão f de hematócrito (HTC), hemoglobina (Hb), plaquetas, leucócitos totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (AP), uréia, creatinina, lactato, sódio (Na) e potássio (K) durante a avaliação basal e após a instilação de cetorolaco e trometamol por 15 e 30 dias em cães híidos.

	Referência	valor basal	dia 15	dia 30	valor p
Hb (g/dL)	12 - 18	16,05 $\pm$ 2,00	16,64 $\pm$ 1,63	16,34 $\pm$ 1,75	0,44
HTC (%)	37 - 55	47,65 $\pm$ 5,68	50,41 $\pm$ 5,52	49,82 $\pm$ 4,87	0,13
Leucócitos (cél.x10 ³ /μL)	6 - 17	9,54 $\pm$ 2,69	9,51 $\pm$ 2,46	8,84 $\pm$ 2,50	0,36
Plaquetas (cél.x10 ³ /μL)	175 - 500	344,7 $\pm$ 123,1	335,5 $\pm$ 80,43	291,4 $\pm$ 108,2	0,09
Proteína total (g/dL)	5,5 – 8,0	6,81 $\pm$ 0,53	7,16 $\pm$ 0,91	7,23 $\pm$ 0,79	0,06
Albumina (g/dl)	3.2 – 4.1	3,19 $\pm$ 0,21	3,61 $\pm$ 0,24 ^a	3,43 $\pm$ 0,24	<0,001
ALT (U/L)	21 – 102	51,91 $\pm$ 43,83	55,45 $\pm$ 33,73	46,27 $\pm$ 20,11	0,58
FA (U/L)	20 – 156	70,27 $\pm$ 19,19	74,27 $\pm$ 20,69	71,55 $\pm$ 23,10	0,58
Uréia (mg/dL)	21 - 59,9	33,55 $\pm$ 8,23	40,82 $\pm$ 12,25	38,91 $\pm$ 10,83	0,20
Creatinina (mg/dL)	0,5 - 1,5	0,95 $\pm$ 0,17	1,17 $\pm$ 0,21 ^a	1,13 $\pm$ 0,21	0,0006
Lactato (mmol/L)	2,0 - 3,9	2,67 $\pm$ 0,51	3,25 $\pm$ 0,48	3,25 $\pm$ 1,15	0,37
Na (mmol/L)	141 – 154	141,3 $\pm$ 3,21	143,9 $\pm$ 3,27 ^a	145,2 $\pm$ 1,42 ^b	<0,01
K (mmol/L)	3,90 - 5,65	4,37 $\pm$ 0,13	4,40 $\pm$ 0,15	4,56 $\pm$ 0,19	0,06

6. a,b : Difere significativamente da linha dos valores basais.

Relativamente à urinálise, um a três traços de sangue foram encontrados nas amostras de urina de quatro cães (três machos e uma fêmea) no presente estudo (Tabela 2). No entanto, a detecção de proteína ($p = 0,79$) e sangue ($p = 0,64$) na urina não diferiu entre os momentos (Tabela 2). Em relação a PCU, os resultados aqui apresentados demonstraram que tal parâmetro permaneceu dentro da faixa normal para cães e não se alterou significativamente do início até o 30º dia de avaliação ($p = 0,38$) (Tabela 2), assim como os valores médios de bilirrubina urinária, sem alteração significativa ao longo do estudo ($p = 0,18$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios $\pm$ desvio padrão da urinálise durante o período basal e após a instilação de cetorolaco de trometamol por 15 e 30 dias em cães hípidos.

	Referência	valor basal	Dia 15	dia 30	valor P
Leucócitos	Ausente	0,00	0,00	0,00	-
Densidade Específica	1.015 - 1.045	1,032 $\pm$ 11,15	1,038 $\pm$ 13,52	1,038 $\pm$ 13,34	0,36
Proteína	Ausente	0,18 $\pm$ 0,40	0,09 $\pm$ 0,30	0,09 $\pm$ 0,30	0,79
Glicose	Ausente	0,00	0,00	0,00	-
Corpos cetônicos	Ausente	0,00	0,00	0,00	-
Bilirrubina	Ausente	0,09 $\pm$ 0,30	0,63 $\pm$ 0,80	0,36 $\pm$ 0,80	0,18
pH	5,0 - 7,0	6,81 $\pm$ 1,07	7,40 $\pm$ 0,97	7,00 $\pm$ 1,26	0,47
Eritrócitos	0 – 3	0,63 $\pm$ 0,92	0,54 $\pm$ 0,68	0,36 $\pm$ 0,50	0,64
PCU (mg/dL)	< 0,20 – 0,5	0,12 $\pm$ 0,14	0,08 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,06	0,38

Nenhum dos cães apresentou vômito, diarreia, melena ou anorexia no decorrer dos 30 dias de estudo.

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar os possíveis eventos adversos em cães tratados com a solução oftálmica CT por 30 dias consecutivos. Embora a absorção

sistêmica de CT não tenha sido investigada no presente estudo, ela certamente ocorreu. Tal informação pode ser reforçada por estudos que confirmaram que tanto a prednisolona como a dexametasona já foram detectadas no plasma de cães saudáveis decorridos 1, 7 e 14 dias da administração de ambos os fármacos como soluções oftálmicas (SEGABB *et al.*, 2020; EWALD *et al.*, 2022). Ademais, a absorção sistêmica após a instilação de AINEs oftálmicos foi confirmada em frangos (diclofenaco), coelhos (diclofenaco e CT) e em gatos (flurbiprofeno e diclofenaco) (GRIGGS *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019; HSU *et al.*, 2015; LANUZA *et al.*, 2016). No presente estudo, os cães não foram mantidos em ambiente controlado. No entanto, todos pertenciam a veterinários participantes no estudo. Todos os participantes residiam na mesma cidade e foram tratados no mesmo período (de julho à agosto de 2022), o que possibilitou tratamentos e exames diários.

No presente estudo, a instilação de CT por 30 dias consecutivos não resultou em anormalidades no formato e no quantitativo de eritrócitos. Da mesma forma, um estudo anterior realizado em cães mostrou que a administração oral de meloxicam e carprofeno por 10 ou mais dias não resultou em discrasia eritrocitária ou danos oxidativos aos eritrócitos (LIESER *et al.*, 2021). Distúrbios da coagulação, como inibição da COX plaquetária, redução na formação do eicosanóide pró-agregador tromboxano A₂, além de distúrbios da agregação plaquetária, são efeitos adversos que podem ocorrer após administração sistêmica de AINEs a longo prazo (GIULIANO, 2004). A contagem de plaquetas, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina não se alteraram significativamente em coelhos que receberam CT ou diclofenaco como soluções oftálmicas por 90 dias consecutivos (PEREIRA *et al.*, 2019). No entanto, nenhum estudo prévio ou relato de caso avaliaram os possíveis eventos adversos relacionados à contagem sanguínea ou plaquetária de cães que receberam AINEs como soluções oftálmicas. Os resultados do presente estudo mostraram que a instilação de CT como solução oftálmica não alterou os parâmetros após 15 e 30 dias de tratamento. Um estudo *in vitro* realizado com sangue de humanos tratados com AINEs oftálmicos mostrou que a indometacina, mas não o diclofenaco, teve um efeito antiplaquetário sistêmico significativo (FALCINELLI *et al.*, 2019). No entanto, tal avaliação não foi realizada na medicina veterinária. Uma limitação do presente estudo

é a falta de avaliação do tempo de sangria, que é um dos melhores testes *in vivo* para avaliação da hemostasia primária (LUNA *et al.*, 2007). Um estudo anterior em cães, mostrou que a administração sistêmica de diferentes AINEs por 90 dias consecutivos não alterou a contagem de plaquetas, mas aumentou significativamente os tempos de sangria (LUNA *et al.*, 2007).

A intoxicação hepatocelular associada à administração alternada de carprofeno oral e meloxicam foi relatada em Husky Siberiano (NAKAGAWA *et al.*, 2005). No entanto, em um estudo conduzido em gatos tratados com solução oftálmica a base de diclofenaco, por quatro vezes/dia e por 7 dias consecutivos, não ensejou nenhuma alteração os níveis séricos de ALT, FA ou γ -glutamil transpeptidase (HSU *et al.*, 2015). Da mesma forma, a histologia do fígado permaneceu inalterada em coelhos tratados com as soluções oftálmicas a base de CT ou de diclofenaco, por 90 dias consecutivos (PEREIRA *et al.*, 2019). Valores normais de ALT e FA também foram relatados em cães que receberam AINEs orais por 90 dias consecutivos (LUNA *et al.*, 2007). No presente estudo, os níveis de ALT e FA permaneceram dentro da faixa de referência para cães e não se alteraram significativamente ao longo do período do estudo. Apesar dos resultados, uma ou duas cruzes relativas a vestígios de bilirrubina foram encontrados no exame de urina em 6/11 cães ao longo do experimento. Não obstante, nenhum desses cães apresentou níveis anormais de ALT ou FA durante as avaliações realizadas nos dias 15 e 30, e os valores médios de bilirrubina urinária não se alteraram significativamente ao longo do estudo. Os níveis séricos de bilirrubina não foram mensurados neste estudo. Porém, a quantificação da bilirrubina conjugada urinária por tira e a bilirrubinúria geralmente precedem a hiperbilirrubinemia na maioria das espécies (PIECHE *et al.*, 2019). Uma possível explicação para achados aqui reportados é que traços de bilirrubinúria podem ocorrer em cães saudáveis com urina adequadamente concentrada (PIECHE *et al.*, 2019). Isso se deve ao baixo limiar renal para bilirrubina e à capacidade de suas células epiteliais tubulares renais em converter o heme em bilirrubina não conjugada, que é então excretado na urina (PIECHE *et al.*, 2019). Com base nas informações acima e em outros parâmetros avaliados no exame de urina (Tabela 2), supõe-se que os traços de bilirrubina encontrados na urina desses cães não tenham sido associados à administração oftálmica de CT.

Embora a ureia e a creatinina tenham permanecido dentro do intervalo de referência para cães ao longo do estudo, os níveis de creatinina aumentaram significativamente no dia 15. Da mesma forma, as soluções oftálmicas a base de diclofenaco e de flurbiprofeno aumentaram significativamente os valores de ureia e creatinina, sendo que os mesmos se mantiveram dentro da faixa de referência, em gatos saudáveis (LANUZA *et al.*, 2016). Em coelhos, as mesmas enzimas e a histologia dos rins permaneceram normais após 90 dias com diclofenaco ou CT administrados sob a forma de solução oftálmica (PEREIRA *et al.*, 2019). Mesmo em cães que receberam diferentes AINEs por 7, 10 ou 90 dias consecutivos, os níveis séricos de uréia e creatinina permaneceram dentro da faixa de referência (LUNA *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2013; FUSELLIER *et al.*, 2008).

Embora as concentrações de ureia e creatinina possam ser usadas para avaliar a função renal, esses marcadores não são sensíveis o suficiente para estabelecer um diagnóstico precoce de insuficiência renal, porque seus níveis aumentam apenas quando o dano renal é grave (LUNA *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2013; SANT'ANNA *et al.*, 2019). Em contraste, a proteinúria pode indicar dano renal antes do desenvolvimento de azotemia em cães (PIECHE *et al.*, 2019; SANT'ANNA *et al.*, 2019). A urina normal contém pouca ou nenhuma proteína detectável devido a reabsorção efetiva pelas células epiteliais tubulares renais proximais (PIECHE *et al.*, 2019). Um traço de proteína foi detectado em três cadelas: um no início do estudo, um no dia 15 e um no dia 30. Esse traço único pode estar associado à proteinúria pós-renal, provavelmente causada por trauma induzido por cistocentese, pois a contaminação sanguínea na amostra de urina também pode contribuir para a proteinúria (PIECHE *et al.*, 2019). De fato, um a três traços de sangue também foram encontrados nas amostras de urina de quatro cães (três machos e uma fêmea) no presente estudo. No entanto, a detecção de proteína e sangue na urina não diferiu entre os momentos e não acreditada-se estar associada ao uso de CT. Em um estudo anterior conduzido em cães tratados com AINEs orais por 90 dias consecutivos, a densidade da urina, o pH e os níveis de proteína permaneceram dentro da faixa de referência (LUNA *et al.*, 2007).

A relação PCU é responsável pelas variações no volume de urina ao longo do dia com base na concentração de creatinina. Em cães, os valores de PCU correlacionam-se bem com a excreção de proteínas na urina durante 24 h (PIECHE *et al.*, 2019; SANT'ANNA *et al.*, 2019). Portanto, optou-se por avaliar o PCU no presente estudo. Os resultados aqui apresentados demonstraram que tal parâmetro permaneceu dentro da faixa normal para cães e não se alterou significativamente do início até o 30º dia de avaliação. Em outro estudo, o PCU de gatos também não se alterou após 7 dias de instilação contínua de solução oftálmica de diclofenaco (HSU *et al.*, 2015). A TFG é outro teste útil para avaliar o progresso da insuficiência renal e outras nefropatias, mesmo nos estágios iniciais (HSU *et al.*, 2015; FUSELLIER *et al.*, 2008). Um estudo experimental conduzido em gatos sugeriu que a aplicação tópica de diclofenaco como solução oftálmica pode estar associada à redução da TFG; no entanto, os achados são confusos, pois a diminuição da TFG foi associada à hipovolemia iatrogênica devido à repetidas coletas de sangue (HSU *et al.*, 2015). Em contraste, em um estudo no qual cães receberam meloxicam oral, a TFG permaneceu normal após 7 dias consecutivos de tratamento (FUSELLIER *et al.*, 2008). Considerando que os cães permaneceram internados por no máximo um dia para coleta de sangue, a TFG não pôde ser avaliada no presente estudo.

No presente estudo, a instilação de CT não induziu alterações nos níveis séricos de potássio. Em contraste, os níveis de sódio aumentaram significativamente nos dias 15 e 30 em comparação com aos valores basais. Entretanto, esses valores permaneceram dentro do intervalo de referência em todos os momentos e tais flutuações provavelmente não estavam relacionadas ao uso de CT. Em dois estudos conduzidos em cães tratados com diferentes AINEs orais durante 7 dias consecutivos, os níveis séricos de sódio e potássio não se alteraram significativamente entre os grupos controle e tratamento (FUSELLIER *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2013).

Durante todo o período do estudo, os níveis séricos de proteína total permaneceram constantes e dentro da faixa de referência para cães. Os níveis de albumina também permaneceram dentro do intervalo de referência durante o estudo; no entanto, em comparação com o período basal, os níveis de albumina foram significativamente maiores no dia 15. Os níveis de proteína total e albumina também

não se alteraram significativamente em gatos tratados com solução oftálmica de diclofenaco por 7 dias (HSU *et al.*, 2015). No entanto, níveis significativamente mais baixos de albumina foram observados em frangos que receberam diclofenaco tópico por 7 dias. No estudo de Griggs *et al.* (2016), embora os níveis de albumina tenham permanecido dentro da faixa de referência para frangos, os autores não puderam concluir se esse achado estava associado à uma possível ocorrência de glomerulonefrite.

Outra limitação do presente estudo foi a de não investigar a ocorrência de sangue oculto nas fezes, pois a administração prolongada de AINEs orais pode causar lesões gástricas (LUNA *et al.*, 2007; DOBBERSTEIN *et al.*, 2022). Em contrapartida, reportou-se respectivamente que, 82% e 63% dos cães com úlceras gastrointestinais perfuradas apresentaram vômitos e anorexia (DOBBERSTEIN *et al.*, 2022). No entanto, vômitos, anorexia e melena não foram observados em nenhum dos cães durante o estudo.

Os níveis séricos de lactato têm sido usados para prever a gravidade de uma doença e o risco de mortalidade em muitas condições como infecções, trauma, câncer e sepse (MOONEY *et al.*, 2014; FRANCO *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que os níveis séricos de lactato estão associados ao prognóstico de pacientes que apresentam sangramento gastrointestinal superior (SHA *et al.*, 2014; EI-KERSH *et al.*, 2015; KO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2017). Em um desses estudos, demonstrou-se que níveis mais altos de lactato observados 24 h após a admissão hospitalar foram associados a reinternações mais frequentes nos 7 dias seguintes, além de taxa de mortalidade mais alta aos 30 dias (LEE *et al.*, 2017). Em medicina veterinária, a hiperlactatemia está associada a vários graus de hipoperfusão e é frequentemente utilizada como um indicador prognóstico em cães com dilatação-vólvulo gástrica (MOONEY *et al.*, 2014; VERSCHOOF *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que neutrofilia com desvio à esquerda e a hiperlactatemia foram as anormalidades hematológicas (83,3%) e bioquímicas (54,5%) mais comumente encontradas em cães com úlceras gastroduodenais, associadas a administração oral de AINEs (DOBBERSTEIN *et al.*, 2022). Portanto, a aferição dos níveis de lactato nos cães do presente estudo pode ser considerada um método indireto para avaliar possíveis

lesões no trato gastrointestinal. Em um estudo conduzido em cães saudáveis com peso entre 1 a 26 kg, que utilizou o mesmo lactímetro portátil referido na presente pesquisa, determinou-se níveis de lactato variando de 2,0 a 3,9 mmol/L (FRANCO *et al.*, 2016). Na presente pesquisa, os níveis de lactato estavam normais e não se alteraram durante o estudo.

7. CONCLUSÃO

Com base em observações descritas no presente estudo, conclui-se que a instilação de CT, a cada 12 h, por 30 dias consecutivos não causa alterações clinicamente relevantes no hemograma, no perfil bioquímico ou exame de urina de cães saudáveis.

REFERÊNCIAS

BORGES, M.; MARINI FILHO, R.; LAPOSY, C.B., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: changes on renal function of healthy dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, n. 28, v. 12, p.842-847, 2013.

DOBBERSTEIN, R. E. A.; OBLAK, M. L.; BRISSON, B. A. et al. Primary repair of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated full thickness gastrointestinal ulcers in 11 dogs. **Veterinary Surgery**, n. 51, v. 7, p.1096-1105, 2022.

EL-KERSH, K.; CHADDHA, U.; SINHA, R. S. et al. Predictive role of admission lactate level in critically ill patients with acute upper gastrointestinal bleeding. **Journal of Emergency Medicine**, n. 49, v. 3, p.318-25, 2015.

EWALD, M.; RANKIN, A.J.; MEEKINS, J.M. et al. Prednisolone and dexamethasone are systemically absorbed after topical application of ophthalmic suspensions in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, n. 83, v. 4, p.339-348, 2022.

FALCINELLI, E.; IANNONE, A.; MEZZASOMA, A. M. et al. Inhibition of platelet function after ocular administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Thrombosis Research**, n.175, p.1-5, 2019.

FRANCO, R. P.; MASSUFARO, C. R., MARTINELI J. et al. Valores de lactato sérico e sua correlação com parâmetros clínicos de cães saudáveis, mensurados durante atendimento ambulatorial veterinário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 36, v. 6, p. 509-515, 2016.

FUSELLIER, M.; DESFONTIS, J.C.; LE ROUX, A. et al. Effect of short-term treatment with meloxicam and pimobendan on the renal function in healthy beagle dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, p.150-155, 2008.

GIULIANO, E. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, n. 34, v. 3, p. 707-723, 2004. Disponível em: 10.1016/j.cvsm.2003.12.003. Acesso em: 29 abr. 2023.

GRIGGS, A. N.; YAW, T. J.; HAYNES, J. S. et al. Bioavailability and biochemical effects of diclofenac sodium 0.1% ophthalmic solution in the domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Vetirinary Ophthalmology**, n. 20, v. 2, p.171-176, 2017.

HSU, K. K.; PINARD, C. L.; JOHNSON, R. J. et al. Systemic absorption and adverse ocular and systemic effects after topical ophthalmic administration of 0.1% diclofenac to healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, n. 76, v. 3, p. 253-265, 2015.

KO, B.S.; KIM, W.Y.; RYOO, S.M.; AHN, S. et al. Predicting the occurrence of hypotension in stable patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: point-of-care lactate testing. **Critical Care Medicine**, n.43, v. 11, p.2409-2415, 2015.

LANUZA, R.; RANKIN, A. J.; KUKANICH, B.; MEEKINS, J. M. Evaluation of systemic absorption and renal effects of topical ophthalmic flurbiprofen and diclofenac in healthy cats. **Veterinary Ophthalmology**, n. 19, p. 24-29, 2016.

LIESER, J.; SCHWEDES, C.; WALTER, M.; LANGENSTEIN, J.; MORITZ, A.; BAUER, N. Oxidative damage of canine erythrocytes after treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere**, n. 49, v. 6, p. 407-413, 2021.

LUNA, S. P.; BASÍLIO, A. C., STEAGALL, P. V. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, n. 68, v. 3, p.258-264, 2008.

MOONEY, E.; RAW, C.; HUGHES, D. Plasma lactate concentration as a prognostic biomarker in dogs with gastric dilation and volvulus. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 29, p. 71-76, 2014.

NAKAGAWA, K.; YAMAGAMI, T.; TAKEMURA, N. Hepatocellular toxicosis associated with the alternate administration of carprofen and meloxicam in a Siberian Husky. **Journal of Veterinary Medical Science**, n. 67, v. 10, p.1051-1053, 2005.

PEREIRA, F. Q.; SANTOS, B.; CARBONI, T. et al. Systemic absorption and adverse effects of topical ocular use of ketorolac tromethamine and sodium diclofenac in New Zealand rabbits for 90 days. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 71, v. 6, p.1865-1872, 2019.

PIECH, T. L.; WYCISLO, K. L. Importance of urinalysis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, n. 49, v. 2, p.233-245, 2019.

SANT'ANNA, M. C., MARTINS, G. F., FLAIBAN, K. K. M. C., TRAUTWEIN, L. G. C., MARTINS, M. I. M. Protein-to-creatinine urinary in the early diagnosis of renal injury in canine pyometra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 39, v. 3, p.186-191, 2019.

SEBBAG, L.; KIRNER, N. S., WULF, L. W., MOCHEL, J. P. Tear film pharmacokinetics and systemic absorption following topical administration of 1% prednisolone acetate ophthalmic suspension in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, n. 7, 2020.

SHAH, A.; CHISOLM-STRAKER, M.; ALEXANDER, A.; et al. Prognostic use of lactate to predict inpatient mortality in acute gastrointestinal hemorrhage. **The American Journal of Emergency Medicine**. n.32, p.752-755, 2014.

SYED, M. F.; REHMANI, A.; YANG, M. Ocular side effects of common systemic medications and systemic side effects of ocular medications. **Medical Clinics of North America**, n. 105, v. 3, p.425-444, 2021.

VERSCHOOF, J.; MORITZ, A.; KRAMER, M.; BAUER, N. Hemostatic variables, plasma lactate concentration, and inflammatory biomarkers in dogs with gastric dilatation-volvulus. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere**, n.43, v. 6, p.389-398, 2015.

CAPÍTULO 2. Efeitos do ceterolaco de trometamol tópico nos parâmetros lacrimais, na densidade de células caliciformes e no estresse oxidativo da conjuntiva de cães saudáveis

RESUMO

Objetivou-se avaliar e comparar se a instilação de ceterolaco de trometamol (CT), contendo ou não cloreto de benzalcônio (CB), duas vezes ao dia durante 30 dias consecutivos, pode afetar os parâmetros do filme lacrimal e a meibografia em cães saudáveis. Além disso, avaliamos se os tratamentos afetariam a densidade de células caliciformes (DCC) e os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (BEO) na conjuntiva dos mesmos cães. Onze cães saudáveis foram selecionados e avaliados pelo OSAvet[®], para determinação dos valores basais da espessura da camada lipídica (ECL), altura do menisco lacrimal (AML), tempo de ruptura lacrimal não invasivo (TRFL ni) e taxa de perda de glândulas Meibomianas (GM). Um fragmento de conjuntiva foi coletado para determinação de BEO e quantificação de DCC. Durante 30 dias, a cada 12 h, um olho recebeu 40 µL de solução oftálmica CT com CB (CTCB), enquanto o outro recebeu 40 µL da mesma solução oftálmica livre de CB (CTSC). Os parâmetros lacrimais e a meibografia foram reavaliados pelo OSAvet[®] 15 e 30 dias depois. No dia 30, nova amostra conjuntival foi coletada, com os mesmos propósitos. No dia 15, a taxa de perda de GM aumentou apenas nos olhos tratados com CTSC ($p < 0,001$). No dia 30, ambos os tratamentos elevaram a taxa de perda de GM e reduziram os valores de TRFL ni, a DCC e os níveis de CAT ($p < 0,05$). No dia 30, os olhos tratados com CBCT apresentaram níveis mais baixos de superóxido dismutase ($P = 0,006$) e níveis mais altos de malondialdeído ($p = 0,02$). No entanto, não foram observadas diferenças entre os tratamentos para nenhum parâmetro em nenhum momento ($p > 0,05$). A DCC se correlacionou com o TRFL ni e todos os BEO em ambos os olhos tratados ($p < 0,05$). Os resultados do nosso estudo mostraram que a instilação duas vezes ao dia de CT, contendo ou não CB, por 30 dias consecutivos, foi capaz de diminuir o TRFL ni e aumentar a taxa de perda de GM em cães saudáveis. Além disso, ambas as formulações reduziram a DCC conjuntival. Nossos resultados também mostraram que os menores valores de TRFL ni encontrados em ambos os tratamentos estão associados a uma redução do DCC e não estão correlacionados com um aumento na taxa de perda de GM. Os níveis reduzidos de SOD, seguidos pelos níveis mais elevados de MDA observados nos olhos que receberam CBCT sugerem que o CB estimula uma maior peroxidação lipídica e, portanto, ainda desempenha um papel prejudicial ao tecido conjuntival, apesar da ausência de significância estatística entre os tratamentos encontrados nos parâmetros clínicos avaliados pelo OSAvet[®] e no DCC avaliado pela histologia.

Palavras-chave: benzalcônio, OSAvet, meibômio, superóxido dismutase, malondialdeído.

Effects of topical trometamol ketorolac on tears parameters, goblet cell density and the oxidative stress of the conjunctiva of healthy dogs

ABSTRACT

To evaluate and compare whether a twice-daily instillation of ketorolac tromethamine (KT), containing or not benzalkonium chloride (BC), for 30 consecutive days may affect tear film parameters and the meibography in healthy dogs. In addition, we assessed whether the same treatments would affect the goblet cell density (GCD) and the levels of oxidative stress biomarkers (OSB) in the conjunctiva of the same dogs. Eleven healthy dogs were selected and baseline values of the lipid layer thickness, tear meniscus height, non-invasive tear break-up time (ni TFBT), and the Meibomian gland (MG)-rate loss were assessed by OSAvet®. One fragment of conjunctiva was collected for GCD determination and quantitation of OSB. For 30 days, and every each 12 h, one eye received 40 µL of KT ophthalmic solution (BCKT), while the other received 40 µL of same ophthalmic solution free of BC (FKT). Tear parameters and meibography assessed by OSAvet® were repeated 15, and 30 days later. At day 30, another conjunctival sample was collected with the same purposes. At day 15, the MG-loss rate increased only in FKT treated-eyes ($P < 0.001$). At day 30, both treatments elevated the MG-loss rate, and reduced the ni TFBT values, the GCD, and the levels of catalase ($P < 0.05$). At day 30, BCKT treated-eyes showed lower levels superoxide dismutase ($P = 0.006$) and higher levels of malondialdehyde ($P = 0.02$). However, differences between treatments were not observed for any parameter at any time point ($P > 0.05$). The GCD correlated with the ni TFBT and all biomarkers of the oxidative stress in both treated-eyes ($P < 0.05$). Results of our study showed the twice-daily instillation of KT, containing or not BC, for 30 consecutive days was able to decrease the ni TFBT and to increase the MG-loss rate of healthy dogs. In addition, both formulations reduced the conjunctival GCD. Our results also showed that the lower ni TFBT values found in both treatments are associated with a reduction of the GCD and are not correlated with an increase in the MG-loss rate. The reduced levels of SOD, followed by the higher levels of MAD observed in the eyes that received BCKT suggests that BC stimulates a higher lipid peroxidation, and therefore still plays a detrimental role to the conjunctival tissue, despite the absence of statistical significance between treatments found in the clinical parameters assessed by OSAvet® and the GCD assessed by histology.

Keywords: benzalkonium, OSAvet, meibomium, superoxide dismutase, malondialdehyde.

1. INTRODUÇÃO

Os eventos adversos locais mais comuns dos AINEs oculares são ardor e hiperemia conjuntival, hipoestesia de córnea e, mais raramente, a ceratomalácia (RIGAS *et al.*, 2020). Em gatos, a hiperemia conjuntival leve foi o único evento ocular adverso detectado após 7 dias de tratamento consecutivo com diclofenaco tópico (HSU *et al.*, 2015). Em relação à possível interferência dos AINEs tópicos na atividade nociceptiva corneana, um estudo mostrou que o diclofenaco, mas não o CT, diminuiu a sensibilidade da córnea em cães (CANTARELLA *et al.*, 2017). Da mesma forma, o CT não teve efeito sobre a sensibilidade da córnea em gatos que receberam solução oftálmica tópica de CT por 5 dias consecutivos (ROBERTS *et al.*, 2021).

Estudos *in vitro* relataram que a citotoxicidade das soluções oftálmicas de AINEs depende tanto dos componentes farmacêuticos da solução, quanto do conservante utilizado (AYAKI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015). O conservante mais comum presente em medicamentos oculares é o cloreto de benzalcônio (CB). No entanto, o uso de soluções enriquecidas com CB por um longo prazo está associado a anormalidades do filme lacrimal como hiperosmolaridade, instabilidade e aumento do estresse oxidativo (GOLDSTEIN *et al.*, 2021; SEDLAK *et al.*, 2021). Além disso, o uso crônico de soluções enriquecidas com CB pode causar disfunção das GM, diminuição da densidade das células caliciformes da conjuntiva (DCC), apoptose das células epiteliais da córnea e da conjuntiva, danos aos nervos da córnea, bem como inflamação dos tecidos oculares e reação fibrótica (GOLDSTEIN *et al.*, 2021).

Vários estudos relataram um estado de estresse oxidativo anormal em diferentes doenças corneoconjuntivais de coelhos, camundongos, humanos, gatos e cães (DEMIR *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2013; KOJIMA *et al.*, 2015; NEZZAR *et al.*, 2017; FARGHALI *et al.*, 2021; SEDLAK *et al.*, 2021). O papel dos AINEs sobre o estresse oxidativo é controverso (DIXIT *et al.*, 2020; NAWAS *et al.*, 2020). Além disso, não há estudos publicados mostrando os efeitos dos AINEs oftálmicos sobre o estado de estresse oxidativo na superfície ocular de cães.

Foi relatado *in vitro*, que as soluções oftálmicas de diclofenaco e bromofenac, ambas preservadas com CB, foram mais citotóxicas às células corneoconjuntivais de humanos, em comparação às placas expostas aos mesmos componentes livres de

conservantes (AYAKI *et al.*, 2010). Considerando que os cães são comumente tratados por longos períodos antes e após a cirurgia de catarata com medicamentos tópicos, incluindo AINEs, é importante avaliar possíveis alterações causadas por essa classe de fármacos nos parâmetros lacrimais, bem como no tecido conjuntival.

2. OBJETIVOS

O CT está disponível no mercado como solução oftálmica enriquecida ou não com CB. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar se a instilação de CT, a intervalos regulares de 12 h, contendo ou não CB, por 30 dias consecutivos, poderia afetar os parâmetros do filme lacrimal e a meibografia em cães saudáveis. Além disso, avaliou-se, se os mesmos tratamentos afetariam a DCC e os níveis de SOD, CAT e MDA na conjuntiva dos mesmos cães.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soluções oftálmicas a base anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)

Em comparação aos corticosteroides tópicos, AINEs tópicos representam uma escolha terapêutica mais prudente para o tratamento de pacientes com diabetes Mellitus e em olhos acometidos por ceratouveíte ulcerativa ou abscessos estromais (GIULIANO, 2004). O CT é um AINE não seletivo, capaz de inibir a COX-1 e a COX-2 (WATERBURY, 2018). O fármaco é comumente prescrito em humanos para o alívio da inflamação ocular e dor após a cirurgia da catarata, as cirurgias refrativas e para prevenção de miose intraoperatória durante a facoemulsificação (NARVÁEZ *et al.*, 2004; BUCCI *et al.*, 2011; SULEIMAN *et al.*, 2010; JUN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019; SCHWARZENBACHER *et al.*, 2020). Em pacientes humanos, o CT tópico atinge maior concentração no humor aquoso e é mais eficiente em inibir os níveis de PGE₂ no humor aquoso, quando comparado ao nepafenaco e bromofenac (BUCCI *et al.*, 2007; BUCCI *et al.*, 2011).

O conservante mais comum presente em medicamentos oculares é o CB, que é um agente antimicrobiano eficaz com atividade de amplo espectro. Suas propriedades surfactantes permitem a solubilização de componentes iônicos de solventes inicialmente imiscíveis e posterior estabilização das substâncias (GOLDSTEIN *et al.*, 2021; SEDLAK *et al.*, 2021). No entanto, o uso de soluções enriquecidas com CB por um longo prazo está associado a anormalidades do filme lacrimal como hiperosmolaridade, instabilidade e aumento do estresse oxidativo (GOLDSTEIN *et al.*, 2021; SEDLAK *et al.*, 2021). Além disso, o uso crônico de soluções enriquecidas com CB pode causar disfunção das GM, diminuição da DCC conjuntivais, apoptose das células epiteliais da córnea e da conjuntiva, danos aos nervos da córnea, bem como inflamação dos tecidos oculares e reação fibrótica (GOLDSTEIN *et al.*, 2021).

Os eventos adversos locais mais comuns dos AINEs oculares são ardor e hiperema conjuntivais, hipoestesia córnea e, mais raramente, a ceratomalácia (RIGAS *et al.*, 2020). Em gatos, a hiperemia conjuntival leve foi o único evento ocular adverso detectado após 7 dias de tratamento consecutivo com diclofenaco tópico (HSU *et al.*,

2015). Em relação à possível interferência dos AINEs tópicos na atividade nociceptiva corneana, um estudo mostrou que o diclofenaco, mas não o CT, diminuiu a sensibilidade da córnea em cães (CANTARELLA *et al.*, 2017). Da mesma forma, o CT não teve efeito sobre a sensibilidade da córnea em gatos que receberam solução oftálmica tópica de CT por 5 dias consecutivos (ROBERTS *et al.*, 2021). Estudos *in vitro* relataram que a citotoxicidade das soluções oftálmicas de AINEs depende tanto dos componentes farmacêuticos da solução, quanto do conservante utilizado (AYAKI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015). Foi relatado *in vitro*, que as soluções oftálmicas de diclofenaco e bromofenac, ambas preservadas com CB, foram mais citotóxicas às células corneconjuntivais de humanos, em comparação às placas expostas aos mesmos componentes livres de conservantes (AYAKI *et al.*, 2010).

3.2. O sistema lacrimal

O sistema lacrimal é composto por componentes secretores e excretores, responsáveis pela produção e excreção do filme lacrimal, respectivamente. A porção secretora compreende às glândulas lacrimal principal da órbita, da membrana nictitante, acessórias e de Meibômio, além de células caliciformes conjuntivais. O excretor é composto pelos orifícios e canalículos lacrimais, ducto nasolacrimal e ponto nasal (CABRAL *et al.*, 2005; SLATTER, 2005).

A superfície ocular é coberta pelo filme lacrimal protetor, um fluido complexo trilaminar, medindo aproximadamente 7 a 10µm. A camada mais externa consiste em lipídios produzidos pelas glândulas do tarso (GM) que formam uma fina capa oleosa (0,05-0,1µm) sobre a camada aquosa de lágrima, reduzindo assim os efeitos da evaporação. O intermediário ou aquoso é secretado pela glândula lacrimal orbital (60%) e glândula da terceira palpebra (40%), citado como a maior camada da lágrima filme, medindo aproximadamente 7µm. Além da água, esta camada contém eletrólitos, glicose, uréia, polímeros de superfície, glicoproteínas e proteínas lacrimais, incluindo imunoglobulina A, albumina, beta-lisina, lisozima e lactoferrina, sendo os três últimos componentes agentes antimicrobianas (GRAHN *et al.*, 2004). Conquanto estudo posterior demonstrou que o componente predominante do filme lacrimal pré-corneano

é a camada mucosa, e a espessura total varia de 35 a 45 μm em humanos (HISEY *et al.*, 2023).

As GM são essenciais para a produção da camada lipídica externa da lágrima, que desempenham um papel importante na estabilização do filme lacrimal após o ato de piscar, evitando assim, a sua evaporação (KIM *et al.*, 2022; ZWIAUER – WOLFBEISSER *et al.*, 2023). Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados em humanos mostraram que soluções oftálmicas enriquecidas com CB causaram danos mais severos às GMs, em comparação às soluções oftálmicas sem conservantes (HA *et al.*, 2019; RATH *et al.*, 2019). A camada de mucina é derivada das células caliciformes. Esse filme é a base que recobre o complexo glicocálice-microvilosidades, auxiliando a camada aquosa do filme lacrimal permanecer ancorada sobre a superfície ocular. A redução na DCC leva à diminuição da secreção de mucina, que por consequência, promove a instabilidade do filme lacrimal. Esse evento reduz a nutrição do epitélio córneo-conjuntival, resultando em aumento do dano mecânico nessa região (MOORE *et al.*, 1987; MADRUGA *et al.*, 2018; HORI 2018). Em um estudo realizado em coelhos, a DCC conjuntival reduziu significativamente após 30 de tratamento com soluções oftálmicas enriquecidas com CB (KAHOOK *et al.*, 2008). Os resultados de um estudo clínico, mostraram que a DCC e o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) reduziram significativamente mesmo em humanos tratados por 30 dias com solução oftálmica de diclofenaco sem conservante, após facoemulsificação (KATO *et al.*, 2017).

3.3. Avaliação do filme lacrimal

Classicamente, o teste da lágrima de Schirmer-1 é o método ouro para avaliar a produção quantitativa do filme lacrimal. Ele é capaz de mensurar a produção basal e reflexa através de uma fita milimetrada. Entretanto, para avaliar desordens qualitativas da produção lacrimal (redução da produção de mucina ou disfunção das GM), o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) é amplamente realizado na rotina oftálmica (HISEY *et al.*, 2023).

Para realização do TRFL clássico, instila-se 0,1mL de fluoresceína sódica 1% sobre a conjuntiva bulbar dorsolateral e a pálpebra é mantida fechada. Em sincronia com o disparo do tempo por cronômetro, a pálpebra é aberta e a superfície

dorsolateral da córnea é observada com auxílio de biomicroscópio com lâmpada de fenda, com magnificação de 16x e filtro azul de cobalto para intensificar a luminescência da fluoresceína. A contagem se encerra ao obter o primeiro sinal de ruptura do filme lacrimal, que é interpretado pela observação de estrias escuras na superfície ocular de cor verde-amarelo. Em cães com olhos saudáveis, o valor deste teste oscila de 7,4 até 21 segundos (LEONARD *et al.*, 2018; MADRUGA *et al.*, 2018; REYNOLDS, 2022; HISEY *et al.*, 2023). Na região de Cuiabá, MT, estimou-se o valor do TRFL em cães como sendo 11,34 segundos (MADRUGA *et al.*, 2018). Entretanto, valores mais baixos, com média de 5,7 segundos foram reportados em cães braquicefálicos do Irã (FAGHIHI *et al.*, 2022). No Brasil, resultados similares foram descritos em Shih Tzus do estado da Bahia, com valores médios de 5,33 segundos (SEBAGG *et al.*, 2022). Em outro estudo brasileiro, conduzido também em Shih Tzus da região do interior paulista, o valor médio reportado foi de 13,66 segundos (KOBASHIGAWA *et al.*, 2015).

A camada de mucina pode ser mensurada clinicamente pela meibometria de contato, que consiste em colher lágrima com tira específica e quantificar os lipídeos lacrimais em um aparelho específico (HISEY *et al.*, 2023). Entretanto apenas dois estudos reportaram valores relativamente ao seu uso (HISEY *et al.*, 2023). Biópsia conjuntival e determinação da DCC, também pode ser considerado um método para avaliação da produção de mucina (LIMA *et al.*, 2011; LEONARD *et al.*, 2018; MADRUGA *et al.*, 2018). Alterações relativamente a DCC em cães saudáveis e naqueles com ceratoconjuntivite seca (CCS) são contraditórias, sendo que um estudo brasileiro reportou queda na DCC em cães com CCS moderada e severa, ao passo que em outro conduzido na América do Norte, não demonstrou alterações nas contagens (LEONARD *et al.*, 2018; MADRUGA *et al.*, 2018). Em outro estudo brasileiro conduzido em Shih Tzus com olhos saudáveis, a DCC conjuntivais foi menor que as previamente reportadas em cães não braquicefálicos (LIMA *et al.*, 2011; MADRUGA *et al.*, 2018).

Dispositivos específicos capazes de avaliar a espessura da camada lipídica do filme lacrimal, a altura do menisco lacrimal, a taxa de perda de GM e o TRFL sem o uso de fluoresceína, têm sido usados em cães saudáveis e naqueles com disfunção

de GMs (VIÑAS *et al.*, 2019; JEONG *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2022; FAGHIHI e RAJAEI, 2022; REYNOLDS *et al.*, 2022).

3.4. Biomarcadores do estresse oxidativo

A córnea e o epitélio conjuntival estão expostos à atmosfera e a altas concentrações de oxigênio. Portanto, torna-se necessário existir um mecanismo capaz de combater o estresse oxidativo gerado nessa região (HSUEH *et al.*, 2022). A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) atuam juntas como precursoras antioxidantes no esforço de remover espécies reativas de oxigênio (ERO) (NEZZAR *et al.*, 2017). Nesse contexto, a SOD converte os ânions superóxido em H_2O_2 e O_2 por meio de uma reação de dismutação, e a CAT quebra ainda a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 (HSUE *et al.*, 2022). O alvo principal das EROs são os ácidos graxos poliinsaturados nos lipídios da membrana, levando à peroxidação lipídica, resultando em danos à estrutura e função celular, assim, a avaliação da concentração de malondialdeído (MDA), pode quantificar a peroxidação lipídica (HSUE *et al.*, 2022). Vários estudos relataram um estado de estresse oxidativo anormal em diferentes doenças corneconjuntivais de coelhos, camundongos, humanos, gatos e cães (DEMIR *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2013; KOJIMA *et al.*, 2015; NEZZAR *et al.*, 2017; FARGHALI *et al.*, 2021; SEDLAK *et al.*, 2021). O papel dos AINEs sobre o estresse oxidativo é controverso (DIXIT *et al.*, 2020; NAWAS *et al.*, 2020). Além disso, não há estudos publicados mostrando os efeitos dos AINEs oftálmicos sobre o estado de estresse oxidativo na superfície ocular de cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA da UFMT, sob o número de protocolo 23108.043452/2022-05.

4.2. Critérios de inclusão

Os critérios de exclusão foram raça braquicefálica, comportamento agressivo, tratamento atual ou recente (30 dias antes) com qualquer medicamento sistêmico ou tópico, teste da lágrima de Schirmer (TLS) com valores ≤ 15 mm/min., TRFL < 10 s, anormalidades nos anexos (incluindo cirurgia prévia), doença da superfície da córnea ou doenças intraoculares, como uveíte e catarata detectadas no exame oftalmológico completo. Ademais, apenas cães sem comorbidades sistêmicas após passarem por um exame físico geral e avaliação laboratorial (vide capítulo 1) foram recrutados para participação do estudo. No total, 22 olhos dos mesmos 11 cães selecionados para a pesquisa descrita no capítulo 1, foram utilizados para a pesquisa a ser descrita a seguir. Para todas as avaliações descritas a seguir, os cães foram levados ao HOVET e liberados imediatamente ao final dos procedimentos.

4.3. Tratamentos

Uma vez selecionado, um dos olhos foi escolhido aleatoriamente (<http://www.randomization.com>) e tratado com 40 μ L de solução oftálmica a 0,45% CT sem conservante (CTSC) (Acular[®] CMC, Allergan, Guarulhos, SP, Brasil), enquanto o outro olho recebeu 40 μ L de solução oftálmica a 0,4% de CT com CB (CTCB) (Acular[®] LS, Allergan, Guarulhos, SP, Brasil), a cada 12 h, por 30 dias consecutivos.

4.4. Avaliação do filme lacrimal e meibografia

Um analisador de superfície ocular portátil (OSA-VET[®], SBM Sistemi, Turin, Itália), equipado com luz led branca, foi utilizado para realizar a interferometria sem contato (Figura 1). Para a realização da interferometria, os cães foram submetidos a contenção manual leve e, após fechar e abrir as pálpebras manualmente com mínima pressão, foi determinada a espessura da camada lipídica (ECL) do filme lacrimal pré-corneano. A escala de classificação, relativa a ECL gerada pelo fabricante do instrumento consiste em intervalos de 0 – 14, 15 – 30, 31 – 60, 70 – 80, 90 – 100 ou >100 nm (Figura 2). Na sequência, o filme lacrimal foi novamente avaliado pela interferometria, e a altura do menisco lacrimal (AML) foi definida. Para essa aferição, considerou-se a distância entre os limites superior e inferior, existentes no ponto médio

do menisco lacrimal inferior. Para concluir a AML, comparou-se o diâmetro da luz branca refletida pelo instrumento (Figura 3). Ao final, uma grade de anéis foi posicionada sobre a imagem interferométrica do filme lacrimal e o tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo (TRFL ni) foi avaliado. Nessa aferição, o crômetro é disparado no momento da centralização do anel gradeado, sendo o mesmo parado, no momento em que, pelo menos, uma linha da grade apresentasse distorção (Figura 4).

A luz infravermelha do mesmo equipamento (OSAvet[®], SBM Sistemi, Turin, Itália) foi utilizada para realizar a meibografia sem contato da pálpebra superior. Durante o exame, o software integrado ao equipamento, destaca a área da GM por linhas verdes. A taxa de perda de GM é automaticamente calculada em percentual, em relação a toda a área da placa tarsal (Figura 5 e 6). Todos os procedimentos citados acima foram executados antes dos tratamentos para obtenção dos valores basais e repetidos após 15 e 30 dias do início dos tratamentos. Para evitar diferenças na aferição de tais parâmetros, todas as leituras do OSAvet[®] foram feitas sempre às 18h e sempre pelo mesmo examinador, o qual era cego aos tratamentos administrados em cada olho.



Figura 1. Procedimento padrão de interferometria que permite selecionar diversas funções (espessura da camada lipídica, altura do menisco lacrimal e tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo). Fonte: https://www.sbmsistemi.com/v20/res/ATLASVET_eng.pdf.

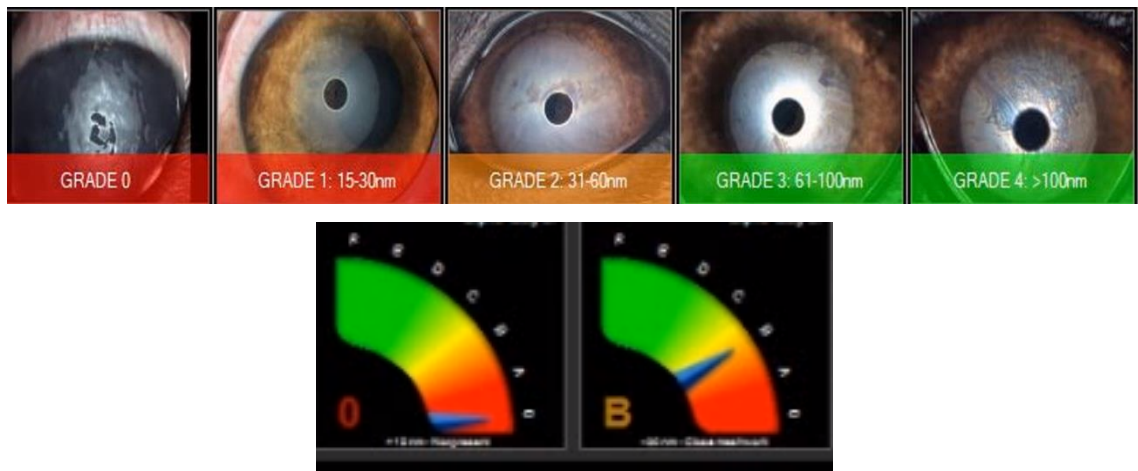


Figura 2. Escala colorimétrica que indica a espessura da camada lipídica da lágrima. De acordo com a concentração de lipídios dispersos na lágrima o ponteiro oscila. Nessa escala, o vermelho varia de grau 0 a 1, sendo grau 0 (ausência de camada lipídica) e 1 (camada lipídica oscilando entre 15-30 nm). Na escala amarela (grau 2), a camada lipídica apresenta-se de 31-60 nm. Na escala verde, a espessura da camada lipídica varia de 61-100 nm (grau 3) e acima de 100 nm (grau 4). Fonte: https://www.sbmsistemi.com/v20/res/ATLASVET_eng.pdf.

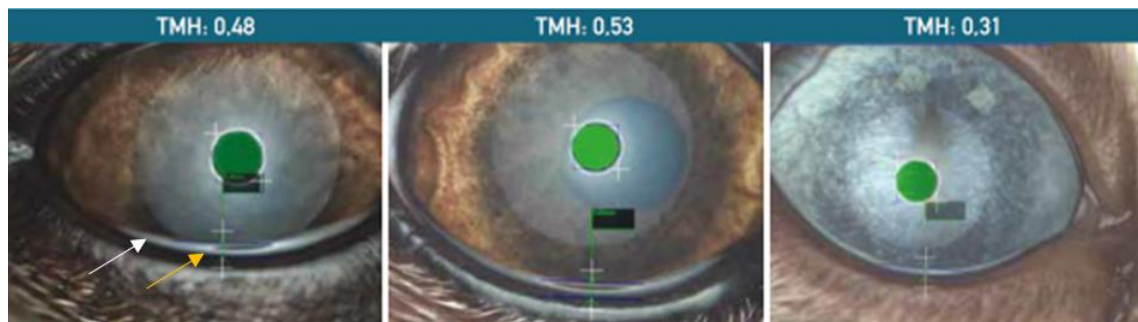


Figura 3. Esquema utilizado para quantificação da espessura do menisco lacrimal. Após centralizar a pupila no ponto central verde, o menisco lacrimal se evidencia na região palpebral ventral (seta branca). Na sequência, ao se posicionar dois cursores (seta laranja), a altura do menisco lacrimal é quantificada. Fonte: https://www.sbmsistemi.com/v20/res/ATLASVET_eng.pdf.

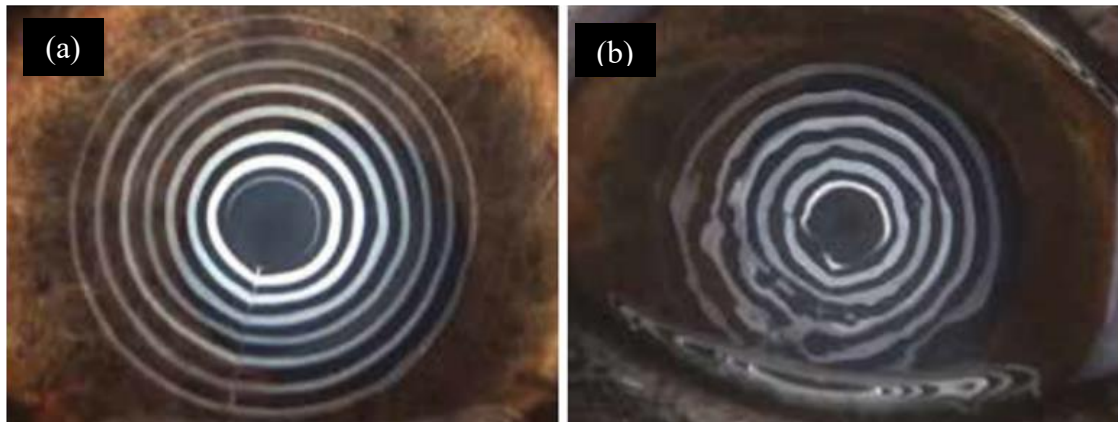


Figura 4. Realização do tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo. Após centralizar o anel gradeado no eixo pupilar inicia-se a contagem do cronômetro (A). A distorção de uma das linhas contidas nas grades do ceratômetro, indicam o início do tempo de ruptura do filme lacrimal e o crômetro é pausado (B). Fonte: https://www.sbmsistemi.com/v20/res/ATLASVET_eng.pdf.

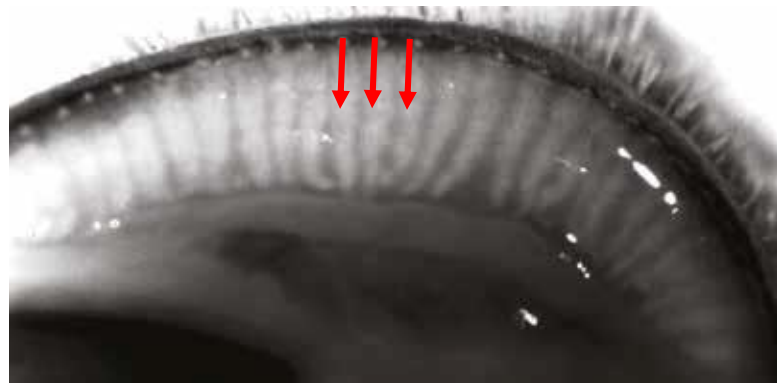


Figura 5. Para realização da Meibomiografia, utiliza-se a luz infravermelha do aparelho. Após a inversão da pálpebra superior, uma imagem da região da conjuntiva palpebral dorsal é obtida para que as glândulas de Meibômio (setas vermelhas) possam ser identificadas. Fonte: https://www.sbmsistemi.com/v20/res/ATLASVET_eng.pdf.

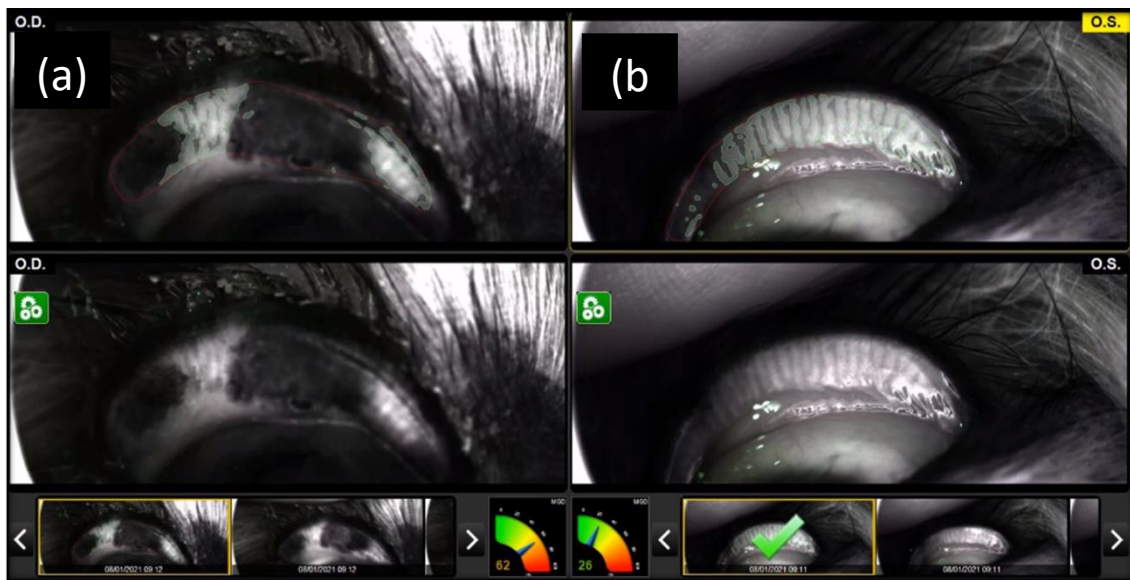


Figura 6. Meibomiografia. Após selecionar as glândulas de Meibômio, o ponteiro da escala colorimétrica determina automaticamente a perda da área que não apresenta glândulas de meibômio (%). Em A, observa-se canalículos presentes em menor quantidade e o ponteiro oscilando na escala amarela, atribuindo 62% de perda. Em B, observa-se a distribuição normal dos canalículos das glândulas de Meibômio e o ponteiro oscilando na escala verde, atribuindo nota 26% de perda. Fonte: https://www.sbmsistemi.com/v20/res/ATLASVET_eng.pdf.

4.5. Biópsia conjuntival e determinação da densidade de células caliciformes (DCC)

Ao final das avaliações do OSAvet®, a superfície ocular foi lavada com solução de iodopovidona a 0,5%. Em seguida, foi instilada uma gota de proxymetacaína a 0,5% (Anestalcon® Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e após dois minutos de intervalo, colheu-se uma amostra de conjuntiva palpebral, medindo aproximadamente 3,0mm, do fornice ventro-nasal. O mesmo procedimento foi repetido 30 dias após o início dos tratamentos, longe da área de onde a biópsia prévia foi realizada. As amostras foram divididas ao meio, sendo uma parte preservada em formol a 10%, destinada a análise histopatológica. Essa amostra foi corada com ácido periódico Shiff e contracoradas com hematoxilina e eosina. Para determinação da

DCC foram, utilizou-se o aumento de 40x e foram contadas todas as células caliciformes presentes entre 50 células epiteliais da conjuntiva.

4.6. Quantificação de biomarcadores de estresse oxidativo (BEO)

Imediatamente após a coleta, os fragmentos destinados à análise BEO foram preservados em inibidor de protease e mantidos a -80°C . Homogenizados foram preparados por fragmentação mecânica do tecido conjuntival e a concentração de proteína total foi determinada pelo teste de Bradford (BRADFORD, 1976). A atividade SOD foi realizada conforme já descrito, com algumas modificações (EWING *et al.*, 1995). O sistema de reação completo (em 0,25 mL de volume total) consistia em 50 mM de tampão fosfato, pH 7,4, contendo 0,1 mM de EDTA, 50 μM de NBT, 78 μM de NADH, 3,3 μM de PMS (concentração final) e 500 ng de proteína. Para avaliar a atividade da CAT, a amostra foi diluída 10 vezes em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 foi usado para determinar a atividade da CAT (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Para a quantificação de MDA livre, as amostras foram homogeneizadas em 2,0 mL de cloreto de potássio a 1,15% e depois centrifugadas a 3350 xg a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e armazenado em gelo até a análise. Para a medição, foram adicionados 100 μL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,144% (solubilizado em tampão fosfato 75 mM, pH 2,5) e 0,5 mL da amostra (utilizou-se água para o branco). A solução foi agitada vigorosamente e então colocada em banho-maria aquecida a 94°C por 60 min. Além disso, 200 μL de álcool n-butílico foram adicionados e a mistura foi homogeneizada. A mistura foi então centrifugada a 1884 xg por 10 min a 4°C (PERCÁRIO, 2010). O sobrenadante foi separado e a absorbância a 535 nm foi determinada usando um espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

4.7. Análise estatística

O tamanho da amostra foi determinado com uma taxa de erro alfa de 5% e poder de 80% com base em desvios padrões e valores limite de equivalência detectados em um estudo piloto com 14 cães saudáveis e estudos publicados

anteriormente que avaliaram os parâmetros OSAvet® em cães com olhos saudáveis e doentes (JEONG *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2022; REYNOLDS *et al.*, 2022; FAGHIHI *et al.*, 2022). Para todas as avaliações, calculou-se que 10 ou mais olhos por tratamento seria um número de amostra apropriado (www.sealedenvelope.com).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Todas as variáveis avaliadas pelo OSAvet® dentro do mesmo tratamento foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni quando necessário. As diferenças entre os tratamentos avaliadas pelo OSAvet® foram comparadas por ANOVA regular, seguida do teste de múltiplas comparações de Bonferroni quando necessário. A DCC quantificada anteriormente e 30 dias após os tratamentos foi comparada dentro de um mesmo olho-tratado pelo teste T student pareado. Para avaliar diferenças entre os tratamentos (olhos distintos) nos mesmos períodos, utilizou-se o teste T student não pareado.

Os níveis de CAT, SOD e MDA quantificados anteriormente e 30 dias após os tratamentos foram comparados dentro de um mesmo olho-tratado pelo teste de Wilcoxon. Para avaliar diferenças entre os tratamentos (olhos distintos) nos mesmos períodos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. O teste de Person foi utilizado para verificar possíveis correlações entre os parâmetros avaliados pelo OSAvet®, assim como entre DCC vs. TRFLni. O teste de Spearman foi utilizado para verificar possíveis correlações entre DCC e os BEO. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$ (Prism 4.0-GraphPad Software inc, Califórnia, EUA). Nas avaliações relativas aos BEO, os dados encontram-se expressos na forma de mediana (mínimo e máximo). Em todos os demais, são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do filme lacrimal e meibografia

Os valores de ECL e AML não mudaram desde a aferição basal até o dia 30 nos olhos que receberam CTSC ou CTCB ($p > 0,05$) (Tabela 1, Figura 7, 8 e 9). Em comparação ao período basal, o TRFLni foi menor em ambos os tratamentos, nas

avaliações dos dias 15 e 30. Porém, diferença significativa foi alcançada apenas nas comparações entre o dia 30 e o valor basal, para ambos os tratamentos ($p < 0,01$) (Tabela 1, Figuras 7 e 10).

A taxa de perda de GM aumentou nos dias 15 e 30 em ambos os tratamentos. Entretanto, apenas os olhos que receberam CTSC esse aumento foi significativo ao dia 15 ($p < 0,01$) (Tabela 1, Figura 7). Na avaliação do dia 30, ambos os tratamentos elevaram a taxa de perda de GM de forma significativa ($p < 0,05$) (Figura 11). Em todos os parâmetros avaliados com OSAvet®, não foram observadas diferenças entre os tratamentos em quaisquer dos momentos avaliados ($p > 0,05$) (Tabela 1, Figura 7). Ademais, não houve correlação entre os parâmetros avaliados com OSAvet® (Tabela 2).

Tabela 1. Média $\pm$ DP da espessura da camada lipídica, taxa de perda da glândula meibomiana (GM), altura do menisco lacrimal e tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo (TRFL ni) avaliados durante os pontos de tempo em os olhos que receberam cetorolaco de trometamol contendo (CTCB) ou não cloreto de benzalcônio (CTSC).

	valor basal	15 dias	30 dias	valor-p
Espessura da camada lipídica (nm)				
CTSC	39,55 $\pm$ 26,78	32,27 $\pm$ 24,63	21,82 $\pm$ 7,83	0,10
CTCB	40,91 $\pm$ 25,77	33,64 $\pm$ 23,99	29,09 $\pm$ 18,41	0,42
valor p	0,37			
Altura do menisco lacrimal (mm)				
CTSC	0,32 $\pm$ 0,14	0,35 $\pm$ 0,20	0,41 $\pm$ 0,22	0,46
CTCB	0,36 $\pm$ 0,18	0,40 $\pm$ 0,29	0,38 $\pm$ 0,16	0,92
valor p	0,89			
TRFL ni (s)				
CTSC	16,36 $\pm$ 8,43	9,79 $\pm$ 5,40	7,32 $\pm$ 4,75*	<0,01
CTCB	14,78 $\pm$ 7,85	9,97 $\pm$ 6,98	8,52 $\pm$ 4,75*	0,03
valor-p	0,65	0,94	0,55	
Taxa de perda de GM (%)				
CTSC	13,73 $\pm$ 12,45	34,82 $\pm$ 11,81 ^a	38,91 $\pm$ 17,25*	<0,01 ^a, <0,001*
CTCB	22,00 $\pm$ 14,35	35,00 $\pm$ 10,61	41,64 $\pm$ 12,89*	<0,01
valor-p	0,16	0,97	0,67	

a: Difere significativamente da linha dos valores basais

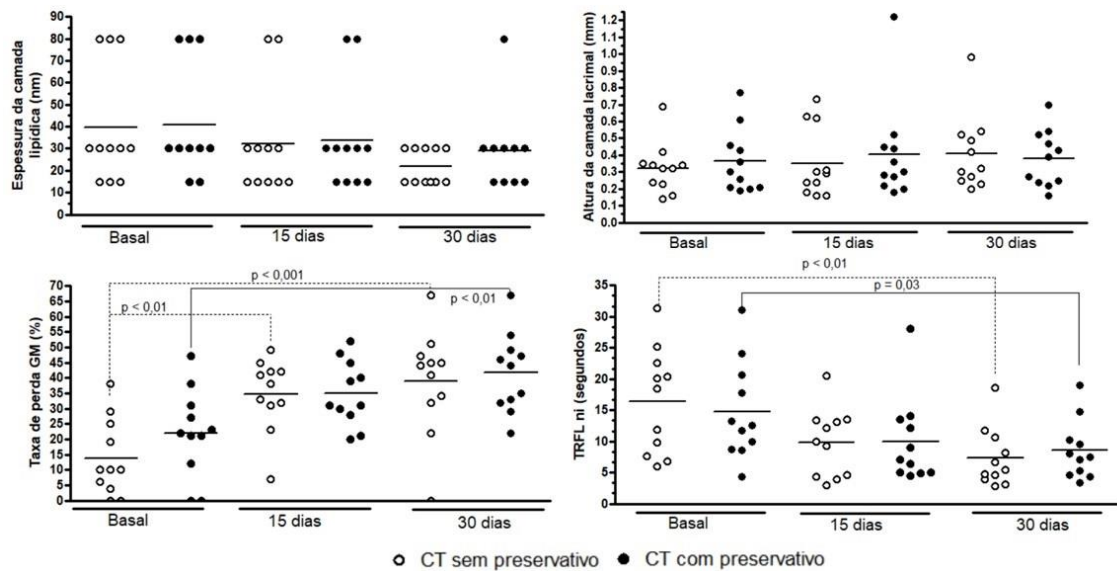


Figura 7. Espessura da camada lipídica, altura do menisco lacrimal, tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo (TRFL ni) e taxa de perda de glândulas Meibômio (taxa de perda de GM) avaliada durante o período basal nos olhos que receberam cetorolaco de trometamol (CT) contendo ou não cloreto de benzalcônio. A linha representa a média e os círculos referem-se a dispersão individual.

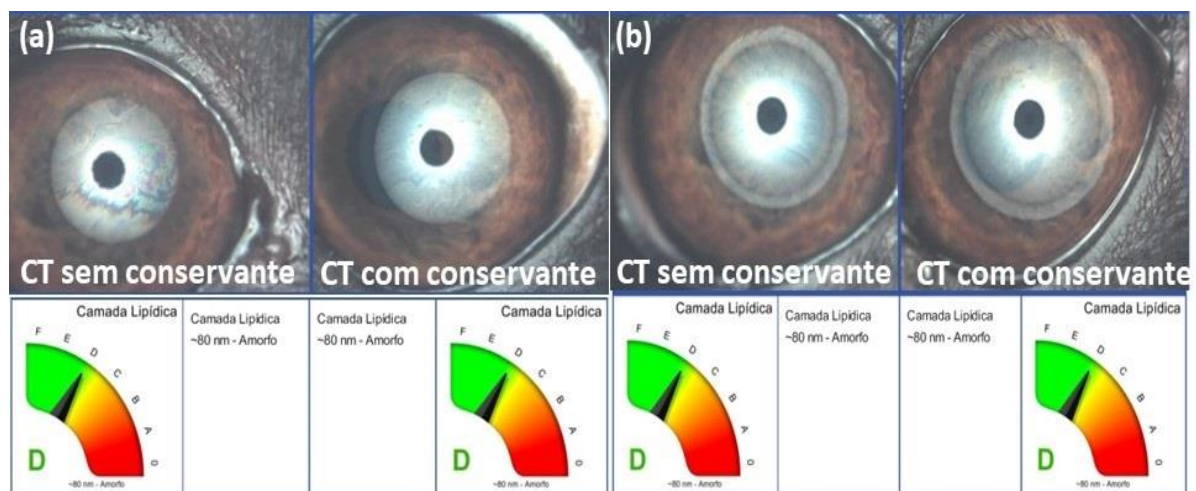


Figura 8. Imagens do mesmo cão relativas à quantificação da espessura da camada lipídica, avaliadas pelo OSAvet® no período basal (a) e 30 dias (b) após os tratamentos.

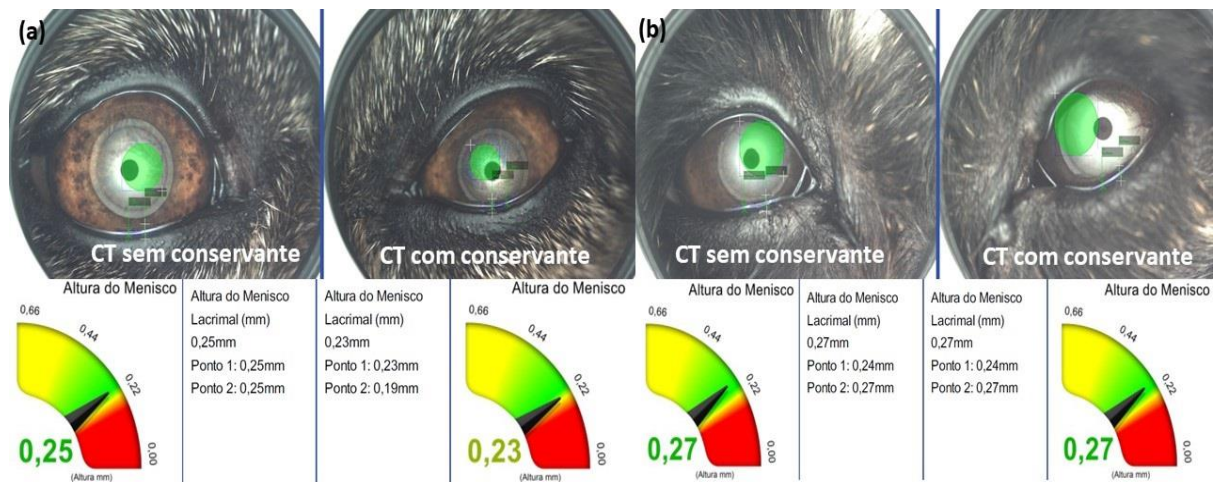


Figura 9. Imagens do mesmo cão relativas à mensuração da altura do menisco lacrimal, avaliadas pelo OSAvet® no período basal (a) e 30 dias (b) após os tratamentos.

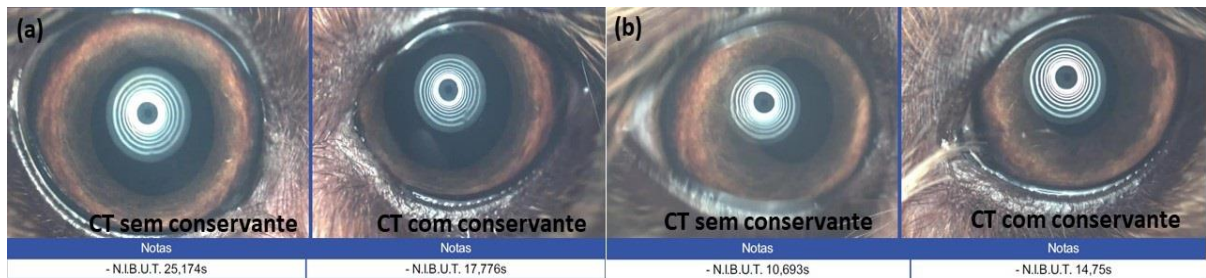


Figura 10. Imagens do mesmo cão relativas à mensuração do tempo de ruptura do filme lacrimal avaliadas pelo OSAvet® no período basal (a) e 30 dias (b) após os tratamentos.

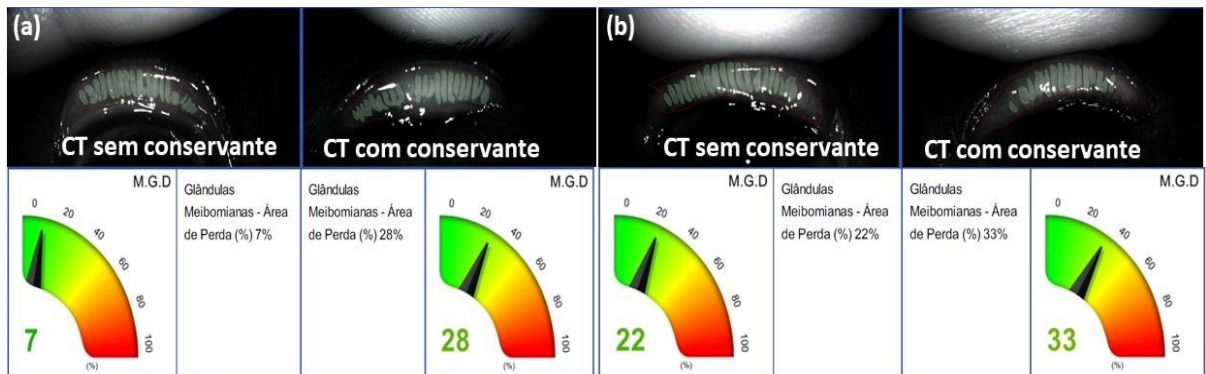


Figura 11. Imagens do mesmo cão relativas à meibografia, avaliadas pelo OSAvet® no período basal (a) e 30 dias (b) após os tratamentos

Tabela 2. Correlações entre os parâmetros lacrimais avaliados pelo OSAvet®, nos olhos que receberam cetorolaco de trometamol contendo (CTCB) ou não cloreto de benzalcônio (CTSC)

	Person r	valor-p
TRFL ni vs. Espessura da camada lipídica		
CTSC	0,01	0,93
CTCB	0,08	0,65
TRFL ni vs. taxa de perda de GM		
CTSC	-0,21	0,23
CTCB	-0,28	0,10
TRFL ni vs. Altura do menisco lacrimal		
CTSC	-0,26	0,13
CTCB	-0,10	0,56
Taxa de perda de GM vs. Espessura da camada lipídica		
CTSC	-0,19	0,28
CTCB	-0,16	0,35
Taxa de perda de GM vs. Altura do menisco lacrimal		
CTSC	-0,05	0,76
CTCB	-0,15	0,38
Altura do menisco lacrimal vs. Espessura da camada lipídica		
CTSC	-0,25	0,16
CTCB	0,06	0,73

5.2. Densidade de células califormes (DCC) conjuntivais

A DCC diminuiu significativamente no dia 30 em ambos os tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 3) (Figura 12 e 13). No entanto, não foram observadas diferenças entre os tratamentos no período basal e no dia 30 ($p > 0,05$) (Figura 2). Correlações positivas entre TRFL ni e a DCC foram observadas nos olhos que receberam CTSC ($r = 0,84$, $p < 0,0001$) e CTCB ($r = 0,88$, $p < 0,0001$) (Figura 14).

Tabela 3. Média $\pm$ DP da densidade de células caliciformes da conjuntiva avaliada durante o período basal e após 30 dias nos olhos que receberam cetorolaco de trometamol contendo (CTCB) ou não cloreto de benzalcônio (CTSC).

	valor basal	30 dias	valor-p
CTSC	35,91 $\pm$ 6,74	20,64 $\pm$ 6,90	0,002
CTCB	36,64 $\pm$ 10,41	24,73 $\pm$ 10,62	0,0002
valor-p	0,84	0,29	

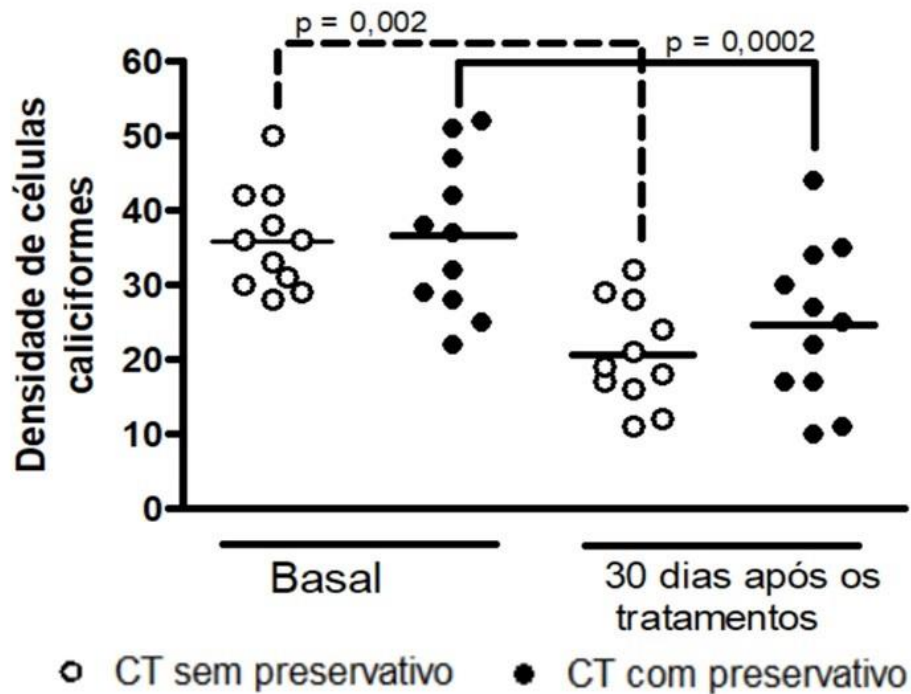


Figura 12. Densidade de células caliciformes conjuntivais avaliada durante o período basal e após 30 dias de tratamento com cetorolaco de trometamol (CT) contendo ou não cloreto de benzalcônio. A linha representa a média e os círculos referem-se às dispersões individuais.

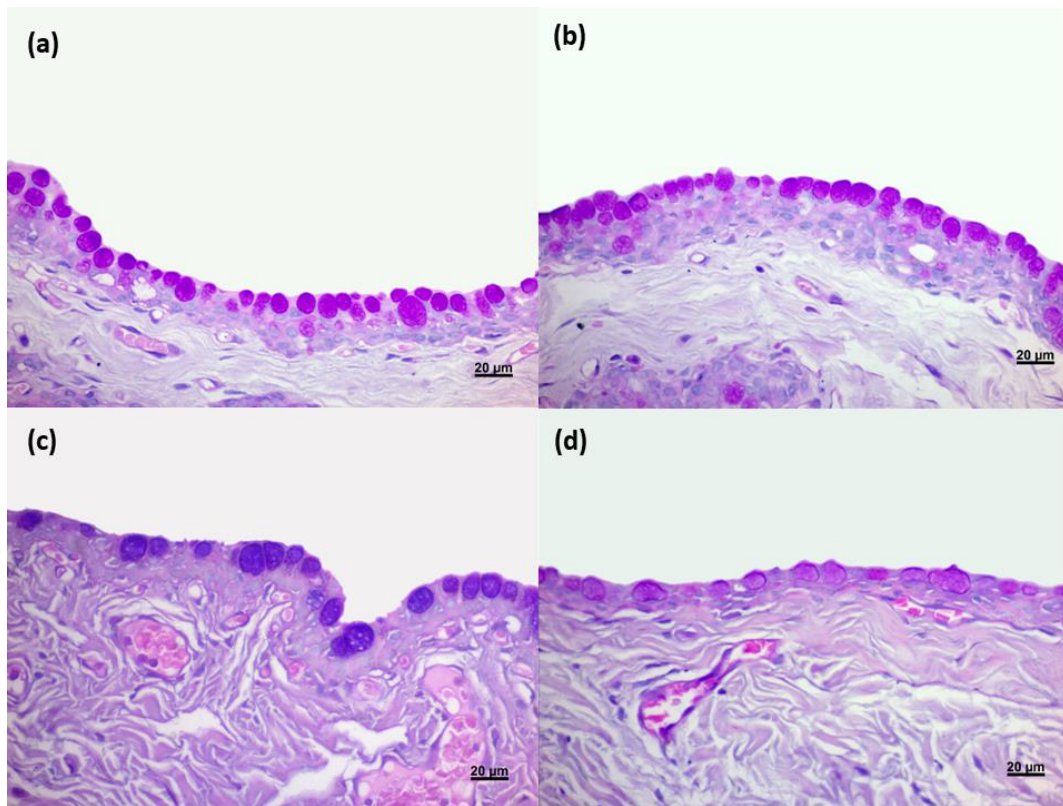


Figura 13. Densidade de células caliciformes conjuntivais avaliada no período basal, nos olhos a serem tratados supostamente com cetorolaco de trometamol contendo (a) ou não cloreto de benzalcônio (b). Amostras conjuntivais coletadas dos mesmos olhos, 30 dias após o tratamento com cetorolaco de trometamol contendo (c) ou não cloreto de benzalcônio (d). Coloração em Ácido Periódico Schiff/Hematoxilina & Eosina (aumento de x40).

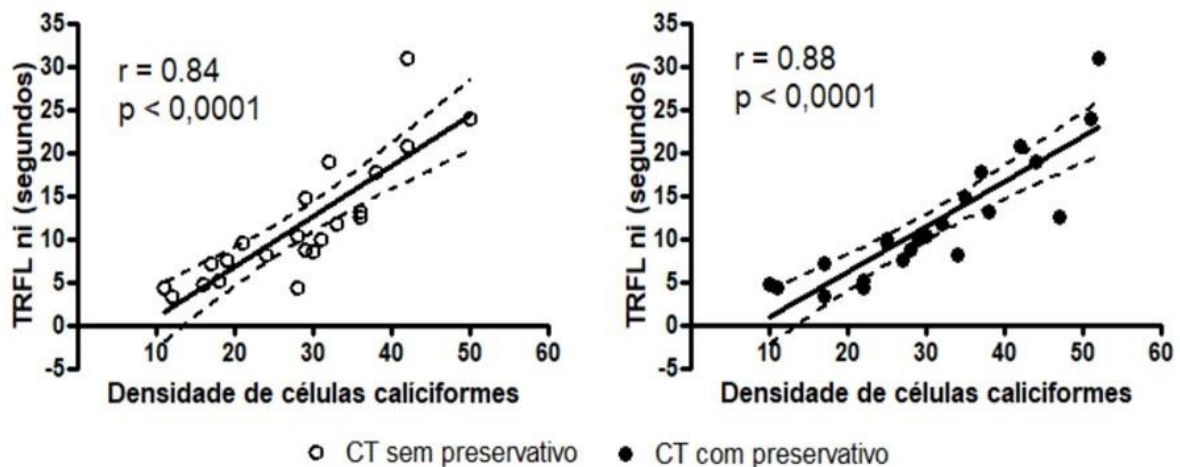


Figura 14. Curvas de regressão linear mostrando correlação positiva entre o tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo (TRFL ni) e a densidade de células caliciformes em ambos tratamentos. A linha pontilhada indica o intervalo de confiança de 95%.

5.3. Biomarcadores do estresse oxidativo (BEO)

Quando comparada com o período basal, a enzima SOD diminuiu significativamente apenas nos olhos tratados com CTCB ($p = 0,006$) (Tabela 4). A enzima CAT diminuiu significativamente no dia 30 em ambos os tratamentos ($p = 0,001$). No entanto, apenas os olhos tratados com CTCB apresentaram valores significativamente maiores de MDA no dia 30 ($p = 0,002$). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ou em quaisquer momentos avaliados em nenhum BEO avaliado ($p > 0,05$) (Tabela 3). Todos os BEO avaliados correlacionaram-se significativamente com a DCC conjuntivais ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 4. Valores medianos (mínimo e máximo) da catalase conjuntival, da superóxido dismutase e do malondialdeído quantificados antes e após 30 dias de tratamento com cetorolaco de trometamol contendo (CTCB) ou não cloreto de benzalcônio (CTSC).

	Valor basal	30 dias	valor-p
Superóxido dismutase (U/mg)			
CTSC	14,37 (13,10 a 29,90)	14,04 (10,14 a 22,51)	0,46
CTCB	15,01 (12,16 a 21,30)	12,96 (10,21 a 15,04)	0,006
valor-p	0,64	0,37	
Catalase (U/mg)			
CTSC	4,77 (0,54 a 69,11)	2,38 (0,27 a 34,55)	0,001
CTCB	3,08 (0,52 a 17,36)	1,54 (0,2 a 8,68)	0,001
valor-p	0,43	0,43	
Malondialdeído (µmol/g)			
CTSC	2,12 (0,66 a 3,87)	3,02 (0,6 a 9,62)	0,19
CTCB	2,12 (0,66 a 3,06)	3,13 (1,05 a 6,52)	0,002
valor-p	0,89	0,29	

Tabela 5. Correlações entre biomarcadores do estresse oxidativo vs. densidade de células caliciformes nos olhos que receberam cetorolaco de tromatamol contendo (CTCB) ou não cloreto de benzalcônio (CTSC).

	Sperman r	valor-p
Densidade de células caliciformes vs. Catalase		
CTSC	0,77	<0,0001
CTCB	0,95	<0,0001
Densidade de células caliciformes vs. Superóxido dismutase		
CTSC	0,77	<0,0001
CTCB	0,97	<0,0001
Densidade de células caliciformes vs. Malondialdeído		
CTSC	-0,85	<0,0001
CTCB	-0,69	<0,0003

6. DISCUSSÃO

Dispositivos específicos capazes de avaliar a ECL do filme lacrimal, a AML, a taxa de perda de GM e o TRFL sem o uso de fluoresceína (TRFLni), têm sido usados em cães saudáveis e naqueles com disfunção de GMs (VIÑAS *et al.*, 2019; JEONG *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2022; FAGHIHI *et al.*, 2022; REYNOLDS *et al.*, 2022). No entanto, apenas dois desses estudos relataram os resultados do TRFLni em cães saudáveis (JEONG *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2022). Em um desses estudos, os valores de TRFLni avaliados em 17 cães de diferentes raças variaram de 7 a 12 segundos (JEONG *et al.*, 2022); enquanto no outro, os valores de TRFLni avaliados em 10 beagles variaram de 8,2 a 37 segundos (média de $19,1 \pm 9,5$ segundos) (KIM *et al.*, 2022). No presente estudo, os valores médios de TRFLni entre os olhos direito e esquerdo avaliados antes dos tratamentos foram de 15,57 segundos, a similitude dos valores relatados anteriormente (JEONG *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2022).

Até o momento, não há padronização de um sistema de classificação ou estadiamento para o diagnóstico da taxa perda de GM através da meibografia infravermelha (HISEY *et al.*, 2023). Três estudos anteriores, realizados em cães saudáveis, utilizaram uma avaliação quantitativa adaptada, daquela estabelecida em

oftalmologia humana, para avaliar esse parâmetro (JEONG *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2022; REYNOLDS *et al.*, 2022). Em um desses estudos, a taxa de perda de GM foi inferior a 25% em 11/20 olhos e variou de 26 a 50% nos outros 9 olhos (KIM *et al.*, 2022). Jung *et al.* (2022) relataram uma taxa de perda de GM de 0% em 18/25 olhos avaliados, enquanto os outros 7 olhos mostraram uma taxa de perda de GM de 33%. Outro estudo relatou que apenas 4/42 olhos apresentaram uma taxa de perda de GM superior a 25% (REYNOLDS *et al.*, 2022). No presente estudo, a taxa de perda de GM avaliada durante o período basal pode ser considerada normal (menor que 25%) em 72,72% dos olhos (16/22). Nos outros 6 olhos, a taxa de perda de GM avaliada durante esse período variou de 27 a 47%, o que também fora reportado anteriormente em cães saudáveis (JEONG *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2022).

Os resultados relativos a ECL em cães saudáveis foram relatados anteriormente em apenas três estudos (FAGHIHI *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2022; REYNOLDS *et al.*, 2022). Em um desses estudos, valores de ECL oscilaram de 30 a 80 nm (11/20 olhos) (KIM *et al.*, 2022), o que corresponde aos intervalos descritos entre os graus 1-3 (Figura 2). Faghihi *et al.* (2022) avaliaram 82 olhos e constataram que o grau 1 (ECL de 15nm) foi o escore mais frequente, seguido pelo grau 2 (ECL de 15–30 nm). No entanto, 52/82 dos olhos classificados como grau 1 eram pertencentes a raças braquicefálicas (FAGHIHI *et al.*, 2022). Reynolds *et al.* (2022) relataram em uma população de 21 cães (42 olhos) valores de referência para a ECL como sendo $59,2 \pm 34,9$ nm. Tais valores são superiores aos encontrados no presente estudo e naquele previamente relatado por outros pesquisadores (FAGHIHI *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2022). No presente estudo, a média da ECL aferida durante o período basal foi de 40,23 nm, o que corresponde aos graus 1-3, a similitude do que fora descrito em cães da Coreia do Sul (KIM *et al.*, 2022).

Em dois estudos realizados em cães da Coreia do Sul, a AML foi de $0,52 \pm 0,27$ (JEONG *et al.*, 2022) e $0,41 \pm 0,21$ mm (KIM *et al.*, 2022). Durante a avaliação basal, o AML médio foi de $0,34 \pm 0,16$ mm, sendo inferior aos valores relatados anteriormente (JEONG *et al.*, 2022, KIM *et al.*, 2022). Após 30 dias de tratamento com ambos os colírios, a AML não se alterou em quaisquer dos olhos. Até o momento, apenas um estudo avaliou possíveis correlações entre os parâmetros lacrimais

avaliados com um analisador de superfície ocular, semelhante ao usado aqui (KIM *et al.*, 2022). Neste estudo, todavia, apenas o TRFLni e a AML se correlacionaram positivamente (KIM *et al.*, 2022). Diferentemente, no presente estudo não foram encontradas correlações entre os parâmetros avaliados pelo OSAvet®.

Em humanos, estudos clínicos e *in vitro* mostraram que soluções oftálmicas de análogos de prostaglandinas (APGs) enriquecidas com CB causaram danos mais graves as GM em comparação com soluções oftálmicas de APGs sem conservantes (HA *et al.*, 2019; RATH *et al.*, 2019). No entanto, não há estudos anteriores comparando os possíveis efeitos de soluções oftálmicas a base de AINEs sobre as GM. Os resultados do nosso estudo mostraram que a instilação contínua de CT por 30 dias consecutivos, contendo ou não CB, é prejudicial as GM, conforme demonstrado pelas avaliações do OSAvet®. O presente resultado sugere que tanto o componente ativo quanto o conservante CB das soluções oftálmicas de CT podem contribuir para a disfunção das GM. Por outro lado, apenas uma ligeira diminuição na ECL ocorreu desde a avaliação basal até o dia 30 em ambos os tratamentos. Essa observação pode provavelmente ter resultado na ausência de correlação entre a taxa de perda de GM vs. ECL. Nossos resultados contrastam com os achados relatados em humanos, que mostraram que o número de GM está negativamente correlacionado com a ECL (PULT *et al.*, 2012; EOM *et al.*, 2013). Embora uma taxa de perda de GM significativamente maior tenha sido observada 15 dias antes nos olhos tratados com CTSC, acredita-se que esse achado não foi causado pela formulação em si, mas pelo menor número de GM contida nos olhos alocados neste tratamento, conforme observado nas avaliações basais (Figura 7).

O TRFLni foi outro parâmetro que também diminuiu significativamente em ambos os tratamentos após 30 dias. Como os demais, esse parâmetro também não se correlacionou com a ECL e com a taxa de perda de GM. Reportou-se que em pacientes com disfunção das GM, ocorre elevação nos valores do TLS para compensar essa taxa de perda de GM (ARITA *et al.*, 2015). No entanto, nesse mesmo estudo, os pesquisadores não encontraram nenhuma correlação entre a taxa de perda de GM e o TRFL, a similitude do que fora descrito na presente pesquisa (ARITA *et al.*, 2015). No presente estudo, não foram avaliados os possíveis efeitos do CT sobre o

TLS, mas a AML não se alterou durante o curso de 30 dias em ambos tratamentos. Apenas dois estudos anteriores realizados em humanos relataram os possíveis efeitos adversos de soluções oftálmicas a base de AINEs sobre parâmetros lacrimais (KAWAHARA *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2017). Em um desses estudos, o TRFL, o TLS e a AML não se alteraram após 30 dias de tratamento com diclofenaco ou nepafenaco tópico, em pacientes submetidos a facoemulsificação (KAWAHARA *et al.*, 2016). Diferentemente, outro estudo mostrou que o TRFL reduziu significativamente, mesmo em indivíduos tratados por 30 dias consecutivos com solução oftálmica de diclofenaco sem conservante, após facoemulsificação (KATO *et al.*, 2017). No entanto, este mesmo estudo não considerou a inclusão de um grupo tratado com diclofenaco preservado com CB (KATO *et al.*, 2017).

Dois estudos *in vitro* relataram que o uso de soluções oftálmicas a base de AINEs tópicos pode induzir efeitos colaterais em linhagens de células corneconjuntivais de humanos (AYAKI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015). Em um desses estudos, Lee *et al.* (2015) relataram que a quantidade de conservantes na solução oftálmica de diclofenaco sódico era maior, comparativamente a outras soluções oftálmicas contendo outros AINEs. Ademais, os mesmos autores relataram que a migração celular da córnea foi significativamente mais lenta em 48 h, nas placas expostas ao diclofenaco, comparativamente àquelas tratadas com bromofenac e pranoprofeno (LEE *et al.*, 2015). Em outro estudo, pacientes humanos tratados com diclofenaco tópico apresentaram pontuações de coloração de fluoresceína conjuntival e corneana significativamente mais altas, quatro semanas após a facoemulsificação, comparativamente aos pacientes tratados com nepafenaco tópico (KAWAHARA *et al.*, 2016). Não obstante, nenhum desses estudos comparou os efeitos do diclofenaco com CT (AYAKI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015; KAWAHARA *et al.*, 2016). Apenas um estudo clínico realizado em humanos comparou os possíveis efeitos adversos de soluções oftálmicas a base de diclofenaco, CT e outros AINEs na superfície ocular (CONGDON *et al.* 2001). Os resultados desse estudo mostraram que as complicações corneais associadas aos AINEs tópicos foram confirmadas em 81,8% dos casos e envolveram o uso de diclofenaco genérico em 53,8% (CONGDON *et al.* 2001). Os casos associados ao uso de CT eram mais propensos a ter comorbidade ocular e a

receberem doses totais significativamente maiores (CONGDON et al. 2001). Embora uma avaliação mais detalhada da superfície da córnea não tenha sido realizada no presente estudo (como a coloração com verde de Lissamine ou microscopia confocal *in vivo*) é possível que alterações nestes tecidos, possam ter ocorrido. Portanto é necessário realizar outras investigações, considerando comparar diferentes soluções oftálmicas a base de AINEs utilizados em cães.

Reportou-se que as soluções oftálmicas de diclofenaco e bromofenac, ambas preservadas com CB, foram mais citotóxicas para células corneconjuntivais de humanos, comparativamente às culturas de células expostas aos mesmos componentes livres de conservantes (AYAKI, *et al.*, 2010). No entanto, outro estudo realizado com pacientes humanos mostrou que mesmo uma solução oftálmica de diclofenaco, livre de conservante, utilizada por 30 dias após a facoemulsificação foi capaz de reduzir significativamente a DCC conjuntival (KATO *et al.*, 2017). Tal achado corrobora com nossos resultados, que mostraram que ambas as formulações de CT foram igualmente prejudiciais para a DCC conjuntival, após 30 dias de tratamento. Uma possível explicação para a ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos na maioria dos parâmetros avaliados em nosso estudo pode ser atribuída a maior biodisponibilidade e taxa de absorção do CTSC. Em um estudo, Attar *et al.* (2010) avaliaram os possíveis efeitos das mesmas formulações de CT aqui utilizadas. Nessa pesquisa, reportou-se que a formulação de CT contendo carboximetilcelulose como preservativo, aumentou a biodisponibilidade do CT em duas vezes no humor aquoso, e em três vezes no corpo ciliar, em comparação ao grupo tratado com CTCB. Dessa forma, Attar *et al.* (2010) concluíram que o esquema posológico pudesse ser reduzido de quatro vezes ao dia, para duas vezes ao dia em olhos tratados com CTSC (Attar *et al.*, 2010). Em gatos, a instilação de diclofenaco sódico a 0,1%, quatro vezes ao dia, durante 7 dias por semana, não alterou os valores do TLS e do TRFL, sendo a hiperemia conjuntival constadada como único efeito adverso (HSU *et al.*, 2015).

Quando o equilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade de um antioxidante para removê-los é interrompido, instala-se o processo oxidativo (NEZZAR *et al.*, 2017; FARGHAHI *et al.* 2021). A avaliação dos BEO no tecido conjuntival mostrou que ambos os tratamentos, induziram a uma redução nos níveis de CAT, o

que sugere que essa enzima desempenhou um papel significativo na proteção do tecido conjuntival contra os efeitos do CT. No entanto, uma redução no quantitativo de SOD seguida por uma elevação na produção de MDA foi observada apenas nos olhos que receberam CTCB. Em humanos com pterígio de primeira ocorrência, os níveis conjuntivais de SOD, CAT e glutathione peroxidase tendem a diminuir, em comparação com pacientes com olhos normais, mas reduções significativas dessas enzimas foram observadas apenas em pacientes com pterígio recorrente (KORMANOVSKI *et al.*, 2014). Um comportamento anormal nos BEO, na forma de SOD e CAT reduzidos e MDA elevado também foi observado nos tecidos conjuntivais e corneais de coelhos expostos à luz ultravioleta (DEMIR *et al.*, 2005, RUBAN *et al.*, 2019), e nas lágrimas de cães e gatos com diferentes tipos de úlcera de córnea (FARGHALI *et al.* 2021). Nesses estudos supracitados, indivíduos tratados com um medicamento supostamente antioxidante apresentaram níveis mais altos de SOD e CAT, e níveis mais baixos de MDA (DEMIR *et al.*, 2005; RUBAN *et al.*, 2019; FARGHALI *et al.* 2021). De fato, outro estudo mostrou que as quantidades de ânions superóxido são maiores em linhagens celulares epiteliais conjuntivais de humanos tratados com APGs contendo CB, comparativamente aqueles tratados com uma formulação de APG sem CB (BRASNU *et al.*, 2008). Portanto, os níveis reduzidos de SOD, seguidos pelos níveis mais elevados de MDA observados nos olhos que receberam CTCB, sugerem que o CB estimula uma maior peroxidação lipídica, desempenhando um papel prejudicial ao tecido conjuntival, apesar da ausência de significância estatística entre os tratamentos, em relação aos parâmetros avaliados pelo OSAvet[®] e a DCC quantificadas pela histologia.

Reportou-se que que AINEs quando associados a nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidases, a lipoxigenase, a isoforma do óxido nítrico, a xantina oxidorreductase, o citocromo P450s e as ciclooxigenases são capazes de gerar ERO em sistemas biológicos (GALATI *et al.*, 2002). De fato, um estudo mostrou que os níveis sanguíneos de MDA aumentam de forma linear e significativa em pacientes humanos tratados por longo período com AINEs sistêmicos (NAWAS *et al.*, 2020). No entanto, outro estudo mostrou o contrário e reportou que o diclofenaco, o meloxicam e o celecoxibe apresentaram efeitos antioxidantes em extensões variáveis, podendo

diminuir os níveis sanguíneos de MDA e aumentar os níveis sanguíneos de SOD, em pacientes humanos com artrite reumatóide (DIXIT *et al.*, 2020). No contexto da oftalmologia, um estudo mostrou que a mesma solução de CTSC aqui utilizada, foi capaz de reduzir a inflamação e de atrasar a cicatrização corneana de coelhos, sem impactar a expressão da isoforma do óxido nítrico ou da metaloprotease-9 (LIMA *et al.*, 2015).

Este foi o primeiro estudo a mostrar que BEO estão correlacionados com a DCC conjuntivais em cães. Um estudo demonstrou que durante o envelhecimento em linhagens de camundongos que não expressam o gene SOD-1 (*SOD1-knockout mice*), que ocorre a exacerbação do estresse oxidativo (KOJIMA *et al.*, 2015). Tal exacerbação no estresse oxidativo, induz a metaplasia escamosa do epitélio conjuntival com consequente redução do TRFL (KOJIMA *et al.*, 2015). Tais resultados estão de acordo com os achados aqui reportados, que mostraram que não apenas a diminuição no quantitativo de SOD, mas também nos níveis de CAT e no aumento dos níveis de MDA estão correlacionados com a DCC do tecido conjuntival. As principais enzimas antioxidantes expressas no tecido conjuntival de humanos são as glutathionas peroxidases (GPx) e a SOD-1, seguido, em menores proporções pela CAT (NEZZAR *et al.*, 2017). No tecido conjuntival de humanos, essas enzimas estão distribuídas em no espaço extracelular (NEZZAR *et al.*, 2017). A expressão de GPx no tecido conjuntival, não foi quantificada, mas uma redução significativa nos níveis de SOD e CAT conjuntival sugerem que essas enzimas desempenharam um papel significativo na proteção do tecido conjuntival contra os efeitos do CT.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do nosso estudo mostraram que a instilação de CT, a cada 12, contendo ou não CB, por 30 dias consecutivos foi capaz de diminuir o TRFL ni, a DCC conjuntivais e de aumentar a taxa de perda de GM de cães saudáveis. Nossos resultados também mostraram que os menores valores de TRFL ni encontrados em ambos os tratamentos estão associados a uma redução da DCC. Os níveis reduzidos de SOD, seguidos por níveis de MDA mais elevados, observados nos olhos que

receberam CTCB sugerem que, o CB estimula uma maior peroxidação lipídica e, portanto, ainda desempenha um papel prejudicial ao tecido conjuntival, apesar da ausência de significância estatística entre os parâmetros avaliados pelo OSAvet® e na DCC avaliada pela histologia.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. **Academic Press**, n. 105, p. 121-126, 1984.

ARITA, R.; MORISHIGE, N.; KOH, S.; SHIRAKAWA, R.; KAWASHIMA, M.; SAKIMOTO, T.; SUZUKY, T. Increased Tear Fluid Production as a Compensatory Response to Meibomian Gland Loss. **Ophthalmology**, n. 122, v. 5, p. 925-933, 2015..

ATTAR, M.; SCHIFFMAN, R.; BORBRIDGE, L.; FARNES, Q.; WELTY, D. Ocular pharmacokinetics of 0.45% ketorolac tromethamine. **Clinical ophthalmology**, Auckland, n. 4, p. 1403–1408, 2010.

AYAKI, M.; IWASAWA, A.; SODA, M.; YAGUCHI, S.; KOIDE, R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneoconjunctival cell lines. **Clinical ophthalmology**, n. 20, v. 4, p. 1019-1024, 2010.

BORGES, M.; MARINI FILHO, R.; LAPOSY, C.B., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: changes on renal function of healthy dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, n. 28, v. 12, p.842-847, 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for a Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein – Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRASNU, E.; BRIGNOLE-BAUDOUIN, F.; RIANCHO, L.; GUENOUN, J. M.; WARNET, J. M.; BAUDOUIN, C. In vitro effects of preservative-free tafluprost and preserved latanoprost, travoprost, and bimatoprost in a conjunctival epithelial cell line. **Current eye research**, n. 33, v. 4, p. 303–312, 2008.

BUCCI, F. A. JR.; WATERBURY, L. D. Prostaglandin E2 inhibition of ketorolac 0.45%, bromfenac 0.09%, and nepafenac 0.1% in patients undergoing phacoemulsification. **Advances in therapy**, n. 28, v. 12, p. 1089–1095, 2011.

BUCCI, F. A. JR.; WATERBURY, L. D.; AMICO, L. M. Prostaglandin E2 inhibition and aqueous concentration of ketorolac 0.4% (acular LS) and nepafenac 0.1% (nevanac) in patients undergoing phacoemulsification. **American journal of ophthalmology**, n. 144, v. 1, p. 146–147, 2007.

CANTARELLA, R. A.; DE OLIVEIRA, J. K.; DORBANDT, D. M.; MONTIANI-FERREIRA, F. Effects of topical flurbiprofen sodium, diclofenac sodium, ketorolac tromethamine and benzalkonium chloride on corneal sensitivity in normal dogs. **Open veterinary journal**, n. 7, v. 3, p. 254–260, 2017.

CAGNARDI, P.; ZONCA, A.; GALLO, M.; VILLA, R.; CARLI, S.; BECCAGLIA, M.; FONDA, D.; RAVASIO, G. Pharmacokinetics and perioperative efficacy of intravenous ketorolac in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 603–608, 2013.

CHEN, B. Y.; LIN, D. P.; CHANG, L. S.; HUANG, T. P.; LIU, H. J.; LUK, C. P.; LO, Y. L.; CHANG, H. H. Dietary α -lipoic acid prevents UVB-induced corneal and conjunctival degeneration through multiple effects. **Investigative ophthalmology & visual science**, n. 54, v. 10, p. 6757–6766, 2013.

CONGDON, N. G.; SCHEIN, O. D.; KULAJTA, P.; LUBOMSKI, L. H.; GILBERT, D.; KATZ, J. Corneal complications associated with topical ophthalmic use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, n. 27, v. 4, p. 622–631, 2001.

DEMIR, U.; DEMIR, T.; ILHAN, N. The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie*. **International journal of ophthalmology**, n. 219, n. 1, p. 49–53, 2005.

DIXIT, A.; PANDEY, P.; DHASMANA, D. C. *In vivo* effects of nonselective, partially selective, and selective non-steroidal anti-inflammatory drugs on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in patients with rheumatoid arthritis: **A Clinical Study**. **International journal of applied & basic medical research**, n. 10, v. 3, p. 167–172, 2020.

DOBBERSTEIN, R. E. A.; OBLAK, M. L.; BRISSON, B. A. et al. Primary repair of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated full thickness gastrointestinal ulcers in 11 dogs. **Veterinary Surgery**, n. 51, v. 7, p.1096-1105, 2022.

EL-KERSH, K.; CHADDHA, U.; SINHA, R. S. et al. Predictive role of admission lactate level in critically ill patients with acute upper gastrointestinal bleeding. **Journal of Emergency Medicine**, n. 49, v. 3, p.318-25, 2015.

EOM, Y.; LEE, J. S.; KANG, S. Y.; KIM, H. M.; SONG, J. S. Correlation between quantitative measurements of tear film lipid layer thickness and meibomian gland loss in patients with obstructive meibomian gland dysfunction and normal controls. **American journal of ophthalmology**, n. 155, n. 6, p. 1104–1110, 2013.

EWALD, M.; RANKIN, A.J.; MEEKINS, J.M. et al. Prednisolone and dexamethasone are systemically absorbed after topical application of ophthalmic suspensions in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, n. 83, v. 4, p.339–348, 2022.

EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, n. 232, v. 2, p, 243-248, 1995.

FAGHIHI, H.; RAJAEI, S. M. Tear film breakup time and Schirmer tear test in normal dogs: Effects of age, sex, reproductive status, skull type, and nasolacrimal duct patency. **Veterinary ophthalmology**, 2022.

FALCINELLI, E.; IANNONE, A.; MEZZASOMA, A. M. et al. Inhibition of platelet function after ocular administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Thrombosis Research**, n.175, p.1-5, 2019.

FARGHALI, H. A.; ABDELKADER, N. A.; ABUBAKR, H. O.; RAMADAN, E. S.; KHATTAB, M. S.; SALEM, N. Y.; EMAM, I. A. Corneal ulcer in dogs and cats: novel clinical application of regenerative therapy using subconjunctival injection of autologous platelet-rich plasma. **Frontiers in veterinary science**, 2021.

FRANCO, R. P.; MASSUFARO, C. R., MARTINELLI J. et al. Valores de lactato sérico e sua correlação com parâmetros clínicos de cães saudáveis, mensurados durante atendimento ambulatorial veterinário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 36, v. 6, p. 509-515, 2016.

FUSELLIER, M.; DESFONTIS, J.C.; LE ROUX, A. et al. Effect of short-term treatment with meloxicam and pimobendan on the renal function in healthy beagle dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, p.150-155, 2008.

GALATI, G.; TAFAZOLI, S.; SABZEVARI, O.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P. J. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, n. 142, v. 1-2, p. 25-41, 2002.

GIULIANO, E. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, n. 34, v. 3, p. 707-723, 2004.

GOLDSTEIN, M. H.; SILVA, F. Q.; BLENDER, N.; TRAN, T.; VANTIPALLI, S. Ocular benzalkonium chloride exposure: problems and solutions. **Eye**, n. 36, v. 2, p. 361–368, 2021.

GORNIK, S. Anti-inflamatórios não esteroidais. In: FANTONI, D.T. **Tratamento da dor clínica de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 127-136.

GRIGGS, A. N.; YAW, T. J.; HAYNES, J. S. et al. Bioavailability and biochemical effects of diclofenac sodium 0.1% ophthalmic solution in the domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Veterinary Ophthalmology**, n. 20, v. 2, p.171-176, 2017.

HA, J. Y.; SUNG, M. S.; PARK, S. W. Effects of preservative on the meibomian gland in glaucoma patients treated with prostaglandin analogues. **Chonnam medical journal**, n. 55, v. 3, p. 156–162, 2019.

HILTON, H.G.; MAGDESIAN, K.G.; GROTH, A.D. et al. Distribution of flunixin meglumine and firocoxib into aqueous humor of horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p.1127-1133, 2011.

HISEY, E. A.; GALOR, A.; LEONARD, B. C. A comparative review of evaporative dry eye disease and meibomian gland dysfunction in dogs and humans. **Veterinary ophthalmology**. 2023.

HORI, Y. Secreted Mucins on the Ocular Surface. **Investigative ophthalmology & visual science**, n. 59, n. 14, 2018.

HSU, K. K.; PINARD, C. L.; JOHNSON, R. J. et al. Systemic absorption and adverse ocular and systemic effects after topical ophthalmic administration of 0.1% diclofenac to healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, n. 76, v. 3, p. 253-265, 2015.

HSU, K. K.; PINARD, C. L.; JOHNSON, R. J.; ALLEN, D. G.; KUKANICH, B. K.; NYKAMP, S. G. Systemic absorption and adverse ocular and systemic effects after topical ophthalmic administration of 0.1% diclofenac to healthy cats. **American journal of veterinary research**, n. 76, v. 3, p. 253–265, 2015.

HSUEH, Y. J.; CHEN, Y. N.; TSAO, Y. T.; CHENG, C. M.; WU, W. C.; CHEN, H. C. The pathomechanism, antioxidant biomarkers, and treatment of oxidative stress-related eye diseases. **International journal of molecular sciences**, n. 23, v. 3, p. 1255, 2022.

JEONG, D.; KANG, S.; SHIM, J.; LEE, E.; JEONG, Y.; SEO, K. Evaluation of ocular surface parameters in dogs with and without meibomian gland dysfunction. **The Veterinary record**, n. 191, v. 2, p.1682, 2022.

JUN, J. H.; YOO, Y. S.; LIM, S. A.; JOO, C. K. Effects of topical ketorolac tromethamine 0.45% on intraoperative miosis and prostaglandin E2 release during femtosecond laser-assisted cataract surgery. **Journal of cataract and refractive surgery**, n. 43, v. 4, p. 492–497, 2017.

KAHOOK, M. Y.; NOECKER, R. Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops. **Advances in therapy**, n. 25, v. 8, p.743–751, 2008.

KATO, K.; MIYAKE, K.; KONDO, N.; ASANO, S.; TAKEDA, J.; TAKAHASHI, A.; TAKASHIMA, Y.; KONDO, M. Conjunctival goblet cell density following cataract

surgery with diclofenac versus diclofenac and rebamipide: a randomized trial. **American Journal of Ophthalmology**, n. 181, p. 26–36, 2017.

KAWAHARA, A.; UTSUNOMIYA, T.; KATO, Y.; TAKAYANAGI, Y. Comparison of effect of nepafenac and diclofenac ophthalmic solutions on cornea, tear film, and ocular surface after cataract surgery: the results of a randomized trial. **Clinical Ophthalmology**, n. 10, p. 385–391, 2016.

KIM, J.Y.; AHN, M.H.; SONG, H.O. et al. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. **Korean journal of Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 197-207, 2006.

KIM, Y.; KANG, S.; KIM, S.; SHIM, J.; GO, S.; SEO, K. Reference values for selected dry eye tests in normal Beagle dogs: a pilot study. **Journal of veterinary science**, n. 23, v. 1, 2022.

KO, B.S.; KIM, W.Y.; RYOO, S.M.; AHN, S. et al. Predicting the occurrence of hypotension in stable patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: point-of-care lactate testing. **Critical Care Medicine**, n.43, v. 11, p.2409-2415, 2015.

KOBASHIGAWA, K. K.; LIMA, T. B.; PADUA, I. R. M.; SOBRINHO, A. A. F. B.; MARINHO, F. A.; ORTÊNCIO, K. P.; LAUS, J. L. Ophthalmic parameters in adult Shih Tzu dogs. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 7, 2015.

KOJIMA, T.; DOGRU, M.; IBRAHIM, O. M.; WAKAMATSU, T. H.; ITO, M.; IGARASHI, A.; INABA, T.; SHIMIZU, T.; SHIRASAWA, T.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. Effects of Oxidative Stress on the Conjunctiva in Cu, Zn-Superoxide Dismutase-1 (Sod1)-Knockout Mice. **Investigative ophthalmology & visual science**, n. 56, v. 13, p. 8382–8391, 2015.

KORMANOVSKI, A.; PARRA, F.; JARILLO-LUNA, A.; LARA-PADILLA, E.; PACHECO-YÉPEZ, J.; CAMPOS-RODRIGUEZ, R. Oxidant/antioxidant state in tissue of primary and recurrent pterygium. **BMC Ophthalmology**, n. 27, v. 14. p. 149, 2014.

LANUZA, R.; RANKIN, A. J.; KUKANICH, B.; MEEKINS, J. M. Evaluation of systemic absorption and renal effects of topical ophthalmic flurbiprofen and diclofenac in healthy cats. **Veterinary Ophthalmology**, n. 19, p. 24-29, 2016.

LEE, J. S.; KIM, Y. H.; PARK, Y. M. The toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory eye drops against human corneal epithelial cells in vitro. **Journal of Korean Medical Science**, n. 30, v. 12, p. 1856-64, 2015.

LEONARD, B. C., STEWART, K. A., SHAW, G. C., HOEHN, A. L., STANLEY, A. A., MURPHY, C. J., & THOMASY, S. M. Comprehensive Clinical, Diagnostic, and Advanced Imaging Characterization of the Ocular Surface in Spontaneous Aqueous Deficient Dry Eye Disease in Dogs. **Cornea**, v. 38, n. 12, p. 1568–1575, 2019.

LIESER, J.; SCHWEDES, C.; WALTER, M.; LANGENSTEIN, J.; MORITZ, A.; BAUER, N. Oxidative damage of canine erythrocytes after treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere**, n. 49, v. 6, p. 407-413, 2021.

LIMA, A. M. V.; CHAVES, N. S. T.; AMARAL, A. V. C.; MORAES, J. M.; ALVES, C. E. F. Produção lacrimal e densidade de células caliciformes conjuntivais em cães da raça shih-tzu. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p. 353-358, 2011.

LIU, Y. C.; SETIAWAN, M.; ANG, M.; YAM, G.; MEHTA, J. S. Changes in aqueous oxidative stress, prostaglandins, and cytokines: Comparisons of low-energy femtosecond laser-assisted cataract surgery versus conventional phacoemulsification. **Journal of cataract and refractive surgery**, n. 45, v. 2, p. 196–203, 2019.

LUNA, S. P.; BASÍLIO, A. C., STEAGALL, P. V. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, n. 68, v. 3, p.258-264, 2008.

MADRUGA, G.; RIBEIRO, A. P.; MAGALHÃES, T. B. S.; RONDELLI, L. A. S.; FURLAN, L. F. Effect of 0.15% sodium hyaluronate and 0.5% carboxymethylcellulose on tear film breakup time in healthy dogs and in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 70, p.1388-1396, 2018.

MCCANN, M.E.; RICKES, E.L.; HORA, D.F. et al. In vitro effects and in vivo efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in cats with lipopolysaccharide-induced pyrexia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n .7, p. 1278-1284, 2005.

MOONEY, E.; RAW, C.; HUGHES, D. Plasma lactate concentration as a prognostic biomarker in dogs with gastric dilation and volvulus. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 29, p. 71-76, 2014.

MOORE, C. P.; WILSMAN, N. J.; NORDHEIM, E. V.; MAJORS, L. J.; COLLIER, L. L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, n. 28, v.12, p. 1925–1932, 1987.

NAKAGAWA, K.; YAMAGAMI, T.; TAKEMURA, N. Hepatocellular toxicosis associated with the alternate administration of carprofen and meloxicam in a Siberian Husky. **Journal of Veterinary Medical Science**, n. 67, v. 10, p.1051-1053, 2005.

NARVÁEZ, J.; KRALL, P.; TOOMA, T. S. Prospective, randomized trial of diclofenac and ketorolac after refractive surgery. **Journal of refractive surgery (Thorofare, N.J.: 1995)**, n. 20, v. 1, p. 76–78, 2004.

NAWAS, H.; ALI, A.; REHMAN, T.; ASLAM, A. Chronological effects of non-steroidal anti-inflammatory drug therapy on oxidative stress and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, n. 40, v. 5, p. 1767-1778, 2021.

NEZZAR, H.; MBEKEANI, J. N.; NOBLANC, A.; CHIAMBARETTA, F.; DREVET, J. R.; KOCER, A. Investigation of antioxidant systems in human meibomian gland and conjunctival tissues. **Experimental eye research**, n. 165, p. 99–104, 2017.

PERCÁRIO, S. Prevention of oxidative stress in renal ischemia-reperfusion syndrome in rats with nutritional antioxidant supplementation. **Revista de Nutrição**, n. 23, v. 2, p. 259-267, 2010.

PEREIRA, F. Q.; SANTOS, B.; CARBONI, T. et al. Systemic absorption and adverse effects of topical ocular use of ketorolac tromethamine and sodium diclofenac in New Zealand rabbits for 90 days. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 71, v. 6, p.1865-1872, 2019.

PIECH, T. L.; WYCISLO, K. L. Importance of urinalysis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, n. 49, v. 2, p.233-245, 2019.

PULT, H.; RIEDE-PULT, B. H. Non-contact meibography: keep it simple but effective. **Contact lens & anterior eye: the journal of the British Contact Lens Association**, n. 35, v. 2, p. 77–80, 2012.

RATH, A.; EICHHORN, M.; TRÄGER, K.; PAULSEN, F.; HAMPEL, U. In vitro effects of benzalkonium chloride and prostaglandins on human meibomian gland epithelial cells. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, n. 222, p. 129–138, 2019.

RANKIN, A.J.; SEBBAG, L.; BELLO, N.M. et al. Effects of oral administration of anti-inflammatory medications on inhibition of paracentesis-induced blood-aqueous barrier breakdown in clinically normal cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 2, p. 262-267, 2013.

REYNOLDS, B. D.; WHITTAKER, C.; CARUSO, K. et al. An investigation into the development of qualitative tear film disorders in dogs following cryoepilation for distichiasis. **Veterinary ophthalmology**, 2022. Disponível em:10.1111/vop.13047. Acesso em: 29 abr. 2023.

RIGAS, B.; HUANG, W.; HONKANEN, R. NSAID-induced corneal melt: Clinical importance, pathogenesis, and risk mitigation. **Survey of ophthalmology**, n. 65, v. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.07.001>. Acesso em: 29 abr. 2023.

ROBERTS, J. K.; MEEKINS, J. M.; ROUSH, J. K.; RANKIN, A. J. Effects of topical instillation of 0.1% diclofenac sodium, 0.5% ketorolac tromethamine, and 0.03% flurbiprofen sodium on corneal sensitivity in ophthalmologically normal cats. **American journal of veterinary research**, n. 82, v. 1, p. 81–87, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2460/ajvr.82.1.81>. Acesso e: 29 abr. 2023.

RUBAN, V. V.; ANBUKKARASI, M.; ANAND, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. Oxidative stress in corneal tissue in experimental keratitis due to *Aspergillus flavus*: Effect of topical voriconazole therapy. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 21, 2019.

SANT'ANNA, M. C., MARTINS, G. F., FLAIBAN, K. K. M. C., TRAUTWEIN, L. G. C., MARTINS, M. I. M. Protein-to-creatinine urinary in the early diagnosis of renal injury in canine pyometra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 39, v. 3, p.186-191, 2019.

SCHWARZENBACHER, L.; SCHARTMÜLLER, D.; LEYDOLT, C.; MENAPACE, R. Intraindividual comparison of cytokine and prostaglandin levels with and without low-energy, high-frequency femtosecond laser cataract pretreatment after single-dose topical NSAID application. **Journal of cataract and refractive surgery**, n. 46, v. 8, p. 1086–1091, 2020.

SEBBAG, L.; KIRNER, N. S., WULF, L. W., MOCHEL, J. P. Tear film pharmacokinetics and systemic absorption following topical administration of 1% prednisolone acetate ophthalmic suspension in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, n. 7, 2020.

SEBBAG, L.; SILVA, A. P. S.; SANTOS, A. P. B.; RAPOSO, A. C. S.; ORIÁ, A. P. An eye on the Shih Tzu dog: Ophthalmic examination findings and ocular surface diagnostics. **Veterinary ophthalmology**, v. 26, p. 59-71, 2023.

SEDLAK, L.; ŚWIERCZYŃSKA, M.; BORYMSKA, W.; ZYCH, M.; WYGŁĘDOWSKA-PROMIENSKA, D. Impact of dorzolamide, benzalkonium-preserved dorzolamide and benzalkonium-preserved brinzolamide on selected biomarkers of oxidative stress in the tear film. **BMC ophthalmology**, n. 21, v. 1, p. 319, 2021.

SHAH, A.; CHISOLM-STRAKER, M.; ALEXANDER, A.; et al. Prognostic use of lactate to predict inpatient mortality in acute gastrointestinal hemorrhage. **The American Journal of Emergency Medicine**. n.32, p.752-755, 2014.

SPARKES, A.H.; HEIENE, R.; LASCELLES, B.D.X. et al. Long term use of NSAIDS in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p.521-538, 2010.

STAREK, M. Review of the applications of different analytical techniques for coxibs research. **Talanta**, v. 85, p. 8-27, 2011.

SULEIMAN, Y. M.; KRDOGHLI, N. F.; AHMAD, A. J. Comparison of Ketorolac Tromethamine and Prednisolone Acetate in Preventing Surgically Induced Miosis during Cataract Surgery. **Sultan Qaboos University medical journal**, n. 10, v. 1, p. 57–63, 2010.

SYED, M. F.; REHMANI, A.; YANG, M. Ocular side effects of common systemic medications and systemic side effects of ocular medications. **Medical Clinics of North America**, n. 105, v. 3, p.425-444, 2021.

VERSCHOOF, J.; MORITZ, A.; KRAMER, M.; BAUER, N. Hemostatic variables, plasma lactate concentration, and inflammatory biomarkers in dogs with gastric dilatation-volvulus. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere**, n.43, v. 6, p.389-398, 2015.

VIÑAS, M.; MAGGIO, F.; D'ANNA, N.; RABOZZI, R.; PERUCCIO, C. Meibomian gland dysfunction (MGD), as diagnosed by non-contact infrared Meibography, in dogs with ocular surface disorders (OSD): a retrospective study. **BMC veterinary research**, n. 15, v. 1, p. 443, 2019.

ZWIAUER-WOLFBEISSER, V.; HANDSCHUH, S.; TICHY, A.; NELL, B. Morphology and volume of Meibomian glands ex vivo pre and post partial tarsal plate excision, cryotherapy and laser therapy in the dog using microCT. **Veterinary ophthalmology**, 2023.

WATERBURY, L. D. Alternative drug delivery for patients undergoing cataract surgery as demonstrated in a canine model. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 1-2, 2018.

WOERDT, A. V. D. Management of intraocular inflammatory disease. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 16, n .1, p.58-61, 2001.

ANEXO I. Comprovante de submissão do artigo “Effects of trometamol ketorolac eye drops on blood count, serum biochemistry, and urinalysis in healthy dogs” ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, *quallis* B1

02/05/2023, 16:10

Email – Dabila Sonogo – Outlook

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Manuscript ID ABMVZ-2023-12987

Secretaria ABMVZ <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Qui, 02/02/2023 13:02

Para: alexandre.aleribs@gmail.com <alexandre.aleribs@gmail.com>

Cc: dabila_s@hotmail.com <dabila_s@hotmail.com>; alexandre.aleribs@gmail.com

<alexandre.aleribs@gmail.com>; emelly.raquel.nardes@gmail.com

<emelly.raquel.nardes@gmail.com>; esthefanienunes@hotmail.com

<esthefanienunes@hotmail.com>; dborah.lobes@gmail.com <dborah.lobes@gmail.com>

02-Feb-2023

Dear Prof. Ribeiro:

Your manuscript entitled "Effects of trometamol ketorolac eye drops on blood count, serum biochemistry, and urinalysis in healthy dogs" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Your manuscript ID is ABMVZ-2023-12987.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Sincerely,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Editorial Office

APÊNDICE A – Arquivo submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Effects of trometamol ketorolac eye drops on blood count, serum biochemistry, and urinalysis in healthy dogs

[Efeitos do colírio de cetorolaco de trometamol sobre o hemograma, a bioquímica sérica e a urinálise em cães saudáveis]

ABSTRACT

This study aimed to evaluate whether the instillation of trometamol ketorolac for 30 consecutive days may change the blood count, the serum biochemistry profile, and the urinalysis of healthy dogs. Eleven small breed dogs (4.6-10 kg), with ages ranging from 1 to 9 years were enrolled in the study. Dogs received 40 μ L of 0.4% trometamol ketorolac eye drops, every each 12 h in both eyes for 30 consecutive days. Blood and urinary samples were collected at baseline, and following 15 and 30 days of the beginning of the treatment. Creatinine levels increased significantly at day 15 (1.21 ± 0.1 mg/dL) and 30 (1.22 ± 0.1 mg/dL) when compared with baseline (0.94 ± 0.1 mg/dL) ($P < 0.01$). Significantly increased values of serum potassium were observed only at day 30 (4.66 ± 0.15 mEq/L), when compared with day 15 (4.32 ± 0.12 mEq/L) and baseline (4.36 ± 0.15 mEq/L) ($P < 0.05$). The other hematological and biochemical parameters did not change significantly during the study ($P > 0.05$). From observations of our study, it can be concluded that the instillation of trometamol ketorolac for 30 consecutive days did not cause clinically relevant changes in the blood count, biochemistry profile and in the urinalysis of healthy dogs.

Key words: creatinine, sodium, lactate, topical NSAID, systemic absorption.

RESUMO

Objetivou-se avaliar se a instilação de cetorolaco de trometamol durante 30 dias contínuos alteraria o hemograma, a bioquímica sérica e a urinálise em cães saudáveis. Dez cães de pequeno porte (4,6-10 kg) com idades entre 1 e 9 anos foram recrutados para a pesquisa. Os cães foram tratados a cada 12 h com 40 μ L de cetorolaco de trometamol a 0,4% em ambos os olhos, durante 30 dias consecutivos. Coleta de sangue foi realizada para obtenção de valores basais e aos 15 e 30 dias após o início do tratamento. A creatinina se elevou de forma significativa decorridos 15 ($1,21 \pm 0,1$ mg/dL) e 30 dias ($1,22 \pm 0.1$ mg/dL) da avaliação basal ($0,94 \pm 0,1$ mg/dL) ($P < 0,01$). O potássio se elevou significativamente apenas ao 30º dia ($4,66 \pm 0,15$ mEq/L), comparativamente à avaliação do 15º dia ($4,32 \pm 0,12$ mEq/L) e a basal ($4,36 \pm 0,15$ mEq/L) ($P < 0,05$). Os demais parâmetros hematológicos e bioquímicos não se alteraram de forma significativa durante o estudo ($P > 0.05$). Conclui-se que a instilação de cetorolaco de trometamol por 30 dias não provocou alterações relevantes no hemograma, no perfil bioquímico e na urinálise de cães saudáveis.

Palavras-chave: creatinina, sódio, AINE tópico, absorção sistêmica.

INTRODUCTION

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit the cyclo-oxygenase enzyme in the arachidonic acid pathway, which consequently decreases the production of pro-inflammatory mediators (Gilmour, 2004). Trometamol ketorolac (TK) is an NSAID that is commonly

prescribed as an ophthalmic solution in veterinary ophthalmology. In comparison to topical corticosteroids, topical NSAIDs are a more prudent therapeutic choice when treating patients with uveitis arising from infectious ocular diseases and those with diabetes who present with ulcerative keratouveitis or stromal abscesses (Gilmour, 2004).

In dogs, the reported side effects associated with the use of systemic NSAIDs include gastrointestinal disturbances, blood dyscrasias, hypoproteinemia, bronchoconstriction, hepatotoxicity, and nephrotoxicity (Gilmour, 2004; Lieser et al., 2021). Following topical application of ophthalmic solutions, a portion of the drug is absorbed systemically via conjunctival vessels and nasolacrimal drainage, where it can be absorbed by the nasal mucosa or swallowed (Segabb et al., 2020; Ewald et al., 2022). Occurrence of adverse systemic events secondary to topical administration of NSAIDs, although rare, has been reported in human beings as an *in vitro* inhibition of platelet function and exacerbation of bronchial asthma (Falcinelli et al., 2019; Syed et al., 2021). Systemic absorption following the instillation of ophthalmic NSAIDs has been confirmed in chickens, rabbits, and cats (Hsu et al., 2015; Lanuza et al., 2016; Griggs et al., 2017; Pereira et al., 2019). In chickens, topical administration of diclofenac to one or both eyes decreased total protein levels, but it did not alter plasma uric acid levels (Griggs et al., 2017). Similarly, Pereira et al. demonstrated that rabbits treated for 90 days with a topical TK ophthalmic solution did not develop adverse systemic events based on clinical signs, food consumption, laboratory findings, and histopathology of the kidneys and liver. Two studies on healthy cats showed that the instillation of diclofenac or flurbiprofen as ophthalmic solutions did not induce clinically relevant abnormalities in the total blood count, urinalysis, or serum biochemistry profile (Hsu et al., 2015; Lanuza et al., 2016). However, in one of these studies, Hsu et al. reported that diclofenac-treated cats had a significantly lower glomerular filtration rate (GFR), presumably associated with iatrogenic hypovolemia. No previous reports or studies have evaluated the possible adverse systemic events following the administration of topical NSAIDs as ophthalmic solutions in dogs. Considering that dogs are commonly treated with topical medications, including NSAIDs, for long periods before and after cataract surgery, it is important to evaluate the possible changes in blood parameters in individuals receiving this class of drugs. Therefore, the current study aimed to investigate whether the instillation of TK for 30 consecutive days would affect the values of hematocrit, hemoglobin, platelets, leukogram, albumin, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), urea, creatinine, lactate, sodium, potassium, and urinalysis parameters in healthy dogs.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals of [MASKED FOR REVIEW] (protocol # 23108.043452/2022-05). Four castrated male dogs and seven spayed bitches (n=11) aged 2–7 years and weighing 4.6–10.3 kg were included in this study. The breeds included were as follows: Schnauzer (1), Pincher (3), Dachshund (1), Yorkshire Terrier (2), and mixed breed (4). The exclusion criteria were current or recent (20 days before) treatment with any systemic or topical ophthalmic medications and current or history of ophthalmic or any other known systemic comorbidities.

General physical and ophthalmic examinations were performed on each dog prior to its inclusion in the study. Further, 5 mL of blood was collected from the jugular vein for hematological evaluation (hematocrit, hemoglobin, platelets, leukogram, and total protein) and serum biochemical analysis (albumin, ALT, AP, urea, creatinine, lactate, sodium, and potassium). An automated hematological (pocH-100iv Diff, Sysmex, Brazil) and biochemical

analyzers (CM 250, Wiener lab group, Brazil) were used to perform some of the laboratorial exams described above. Hematocrit and platelet counts were determined manually using light microscopy. Lactate levels were determined with a portable lactimeter (Accutrend Plus®, Roche, Brazil). Sodium and potassium levels were measured using an electrolyte analyzer. (EasyLite, Grupo Kovalent, Brazil).

Fresh urine samples were collected by ultrasound-guided cystocentesis in female dogs and urethral catheterization in male dogs for urinalysis and determination of the urine protein-to-creatinine (UPC) concentration ratio. In the urinalysis, urine specific gravity was measured using refractometry (Atago Refractometer®). Urine pH and other chemical parameters were evaluated using reagent test strips (Combur10 Test UX, Roche, Brazil) and recorded on a specific reader (Urisys 1100, Roche, Brazil). All laboratory procedures were performed on each dog approximately one week before the start of the study to ensure that all individuals were healthy and to collect baseline values.

Once selected, the dogs were administered 40 µL of 0.4% TK ophthalmic solution (Acular® LS, Allergan, Guarulhos, SP, Brazil) in both eyes every 12 h for 30 consecutive days. The general condition of the animals and gastrointestinal tolerance (food intake, vomiting, diarrhea, and melena) to NSAIDs were assessed daily. The general condition of the animals and their gastrointestinal tolerance (food intake, vomiting, diarrhea, and melena) to NSAIDs were assessed daily. Physical examination, body weight, and blood and urinary parameters were assessed one day before, as well as 15 and 30 days after starting treatment with TK. All dogs included in the study were kept in their homes and were treated and examined daily by veterinarians enrolled in the study. For blood and urine sample collection, the dogs were brought to the hospital and managed by the same veterinarians.

The sample size was determined with a 5% alpha error rate and 80% power based on based on standard deviations and equivalence limit values for hematological and biochemical parameters detected in previously published studies that used six dogs/group as an animal model for NSAID tolerance (LUNA *et al.*, 2007; FUSELLIER *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2013). Greater than or equal to 7 dogs was calculated as the appropriate sample size (www.sealedenvelope.com). The Shapiro–Wilk test was used to assess data normality. All variables were compared using a one-way analysis of variance for repeated measures, followed by Bonferroni's multiple comparison test to assess the possible differences in values observed on days 15 and 30 compared to the baseline values. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ (Prism 4.0-GraphPad Software inc, California, USA). The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to evaluate the possible adverse events in dogs treated with the TK ophthalmic solution for 30 consecutive days. Although systemic absorption of TK was not examined in the present study, it might have occurred because prednisolone and dexamethasone were detected in the plasma of healthy dogs 1, 7, and 14 days after both drugs were administered as ophthalmic solutions (Segabb *et al.*, 2020; Ewald *et al.*, 2022). Additionally, systemic absorption following the instillation of ophthalmic NSAIDs has been confirmed in chickens (diclofenac), rabbits (diclofenac and TK), and cats (flurbiprofen and diclofenac) (Griggs *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2015; Lanuza *et al.*, 2016). In the present study, the dogs were not kept in a controlled environment. In the present study, the dogs were not kept in a controlled environment. However, they were all owned by veterinarians

enrolled in the study. All participants lived in the same city [MASKED FOR REVIEW] and were treated during the same period (from July to August of 2022), which made treatments and examinations possible on a daily basis

In the present study, instillation of TK for 30 consecutive days did not result in abnormalities in red blood cells. Similarly, a previous study conducted on dogs showed that oral administration of meloxicam and carprofen for 10 or more days did not result in erythrocyte dyscrasia or oxidative erythrocyte damage ($P > 0.05$) (Table 1). Similarly, a previous study conducted on dogs showed that oral administration of meloxicam and carprofen for 10 or more days did not result in erythrocyte dyscrasia or oxidative erythrocyte damage (Lieser et al., 2021). Coagulation disorders, such as inhibition of platelet cyclo-oxygenase, reduced formation of pro-aggregatory eicosanoid thromboxane A₂, and prevention of platelet aggregation, are adverse effects that may occur after long-term systemic administration of NSAIDs (Gilmour, 2004). The platelet count, prothrombin time, and thromboplastin time did not change significantly in rabbits receiving TK or diclofenac as ophthalmic solutions for 90 consecutive days (Pereira *et al.*, 2019). Nevertheless, no previous studies or reports have evaluated the possible adverse events related to the blood or platelet count of dogs that received NSAIDs as ophthalmic solutions. The results of the present study showed that instillation of TK as an ophthalmic solution did not change the parameters ($P > 0.05$) after 15 and 30 days of treatment (Table 1). An *in vitro* study conducted using blood from humans treated with ophthalmic NSAIDs showed that indomethacin, but not diclofenac, had a significant systemic antiplatelet effect (Falcinelli *et al.*, 2019). However, such an evaluation has not been performed in veterinary medicine. One limitation of the present study is the lack of assessment of clotting time, which is one of the best *in vivo* tests for evaluating primary hemostasis (Luna *et al.*, 2007). A previous study on dogs showed that systemic administration of different NSAIDs for 90 consecutive days did not change the platelet count, but it significantly increased the clotting times (Luna *et al.*, 2007).

Hepatocellular toxicosis associated with alternate administration of oral carprofen and meloxicam has been reported in Siberian Husky (Nakagawa *et al.*, 2005). However, in a study on cats treated with topical ophthalmic diclofenac four times/day for seven consecutive days, no changes were detected in the serum ALT, AP, or γ -glutamyl transpeptidase levels (Hsu *et al.*, 2015). Similarly, the histology of the liver was normal in rabbits treated with topical TK or diclofenac ophthalmic solution for 90 days (Pereira *et al.*, 2019). Normal ALT and AP values have also been reported in dogs that received oral NSAIDs for 90 consecutive days (Luna *et al.*, 2007). In the present study, ALT and AP levels remained within the reference range for dogs and did not change significantly throughout the study period ($P = 0.58$) (Table 1). Despite this finding, one or two traces of bilirubin were found in the urinalysis of 6/11 dogs throughout the experiment. However, none of these dogs showed abnormal ALT or AP levels during the evaluations carried out on days 15 and 30, and the mean values of urinary bilirubin did not change significantly throughout the study ($P = 0.18$) (Table 2). Serum bilirubin levels were not measured in this study. However, bilirubin assessed using a urine dipstick represents conjugated bilirubin, and bilirubinuria often precedes hyperbilirubinemia in most species (Pieche and Wycislo, 2019). One possible explanation for our findings is that trace or a small amount of bilirubinuria may occur in healthy dogs with adequately concentrated urine owing to their low kidney threshold for bilirubin and the ability of their renal tubular epithelial cells to convert heme to unconjugated bilirubin, which is then excreted in the urine (Pieche and Wycislo, 2019). Based on the aforementioned information and other parameters assessed in the urinalysis (Table

2), it is reasonable to assume that the traces of bilirubin found in the urine of these dogs were not associated with the ophthalmic administration of TK.

Although urea and creatinine remained within the reference range for dogs throughout the study, the creatinine levels ($P=0.0006$) increased significantly on day 15 (Table 1). Similarly, the ophthalmic solutions diclofenac and flurbiprofen significantly increased (within the reference range) urea and creatinine values in healthy cats without inducing clinically relevant changes (Lanuza *et al.*, 2016). In rabbits, the same enzymes and the histology of the kidneys were normal after 90 days of treatment with topical diclofenac or TK ophthalmic solution (Pereira *et al.*, 2019). Even in dogs that received different NSAIDs for 7, 10, or 90 consecutive days, serum urea and creatinine levels remained within the reference range (Luna *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2013; Fusellier *et al.*, 2008).

Although urea and creatinine concentrations may be used to evaluate renal function, these markers are not sensitive enough to establish an early diagnosis of renal failure because their levels increase only when renal damage is severe (Luna *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2013; Sant'anna *et al.*, 2019). In contrast, proteinuria may indicate renal damage before the development of azotemia in dogs with kidney disease (Pieche and Wycislo, 2019; Sant'anna *et al.*, 2019). Normal urine contains little to no detectable protein owing to effective reabsorption by proximal renal tubular epithelial cells (Pieche and Wycislo, 2019). One trace of protein was detected in three different dogs (all females): one at baseline, one on day 15, and one on day 30. This single trace may be associated with postrenal proteinuria, which is probably caused by trauma induced by cystocentesis, as blood contamination within the urine sample may also contribute to proteinuria (Pieche and Wycislo, 2019). In fact, one to three traces of blood were also found in the urine samples of four dogs (three males and one female) in the present study. However, protein ($P=0.79$) and blood ($P=0.64$) detection in the urine did not differ between time points and should not be associated with TK use (Table 2). In a previous study on dogs treated with oral NSAIDs for 90 consecutive days, the urine density, pH, and protein levels remained within the reference range (Luna *et al.*, 2007).

The UPC ratio accounts for variations in urine volume throughout the day based on creatinine concentration. The UPC values correlated well with the 24-hour urine protein excretion in dogs (Pieche and Wycislo, 2019; Sant'anna *et al.*, 2019). Therefore, UPC was assessed in the present study, and our results showed that such parameters remained within the normal range for dogs and did not change significantly from baseline to day 30 ($P=0.38$) (Table 2). In another study, the UPC of cats was also normal, and it did not change after seven days of continuous instillation of diclofenac ophthalmic solution (Hsu *et al.*, 2015). GFR is another useful test to evaluate the progress of renal insufficiency and nephropathies, even in the early stages (Hsu *et al.*, 2015; Fusellier *et al.*, 2008). One experimental study conducted in cats suggested that topical application of diclofenac as an ophthalmic solution might be associated with reduced GFR; however, the findings were confusing, as decreased GFR was associated with iatrogenic hypovolemia due to repeated blood collection (Hsu *et al.*, 2015). In contrast, in a study in which dogs received oral meloxicam, GFR remained normal after seven consecutive days of treatment (Fusellier *et al.*, 2008). Considering that the dogs were kept in the hospital for no longer than a day for blood collection, GFR could not be evaluated in the current study.

In the present study, instillation of NSAIDs did not induce changes in serum potassium levels ($P=0.06$). In contrast, the sodium levels increased significantly on days 15 and 30 compared to the baseline ($P<0.01$) (Table 1). However, these values remained within the reference range at all time points, and such fluctuations were probably unrelated to TK use (Table 1). In two studies on dogs treated with different oral NSAIDs for seven consecutive

days, the serum levels of sodium and potassium did not change significantly between the control and treatment groups (Fusellier *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2013).

Throughout the study period, the serum total protein levels remained constant and within the reference range for dogs ($P=0.06$) (Table 1). Albumin levels also remained within the reference range during the study; however, in comparison with baseline, significantly higher albumin levels were observed on day 15 ($P<0.001$) (Table1). The total protein and albumin levels also did not change significantly in cats and chickens treated with the ophthalmic solution diclofenac for over seven days (Hsu *et al.*, 2015. Griggs *et al.*, 2016). However, significantly lower albumin levels were observed in chickens that received topical diclofenac for seven days. In a study by Griggs *et al.* (2016), although the albumin levels remained within the reference range for chickens, the authors could not conclude whether this finding was associated with glomerulonephritis.

Another limitation of the current study is that it did not investigate the occurrence of fecal occult blood, as long-term administration of oral NSAIDs may cause gastric lesions (Luna *et al.*, 2007; Dobberstein *et al.*, 2022). Further, 82% and 63% of dogs with perforated gastrointestinal ulcers had vomiting and anorexia, respectively (Dobberstein *et al.*, 2022). However, vomiting, anorexia, and melena were not observed in any of the dogs throughout the study.

Serum lactate levels have been used to predict the severity of illness and the risk of mortality in many conditions, such as infections, trauma, cancer, organ disease, and sepsis (Mooney *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2016). Studies have demonstrated that serum lactate levels are associated with prognosis in patients with upper gastrointestinal bleeding (Sha *et al.*, 2014; El-Kersh *et al.*, 2015; Ko *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017). One of these studies demonstrated that higher lactate levels within 24 hours after admission were associated with more frequent re-admissions over the next 7 days and a higher 30-day mortality rate (Lee *et al.*, 2017). In veterinary medicine, hyperlactatemia is associated with varying degrees of hypoperfusion and is often used as a prognostic indicator in dogs with gastric dilatation-volvulus (Mooney *et al.*, 2014; Verschoof *et al.*, 2015). Another study showed that neutrophilia with a left shift and hyperlactatemia were the most common hematological (83.3%) and biochemical abnormalities (54.5%) found in dogs with gastroduodenal ulcers associated with oral administration of NSAIDs (Dobberstein *et al.*, 2022). Therefore, the assessment of lactate levels in dogs in the current study may be considered an indirect method to evaluate possible lesions in the gastrointestinal tract. In dogs weighing 1–26 kg, the levels of lactate range from 2.0 to 3.9 mmol/L, as determined by the same portable lactimeter used herein (Franco *et al.*, 2016). The lactate levels were normal and did not change during the study ($P=0.37$) (Table 1).

CONCLUSIONS

Based on our observations, instillation of TK every 12 h for 30 consecutive days does not cause clinically relevant changes in the blood count, biochemical profile, or urinalysis of healthy dogs.

Table 1 - Mean $\pm$ standard deviation values of hematocrit (Htc), hemoglobin (Hgb), platelets, total leukocytes (Leuko), albumin, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), urea, creatinine, lactate, sodium (Na), potassium (K) during baseline, and after the instillation of trometamol ketorolac for 15 and 30 days in healthy dogs.

	Reference	Baseline	Day 15	Day 30	P value
Hgb (g/dl)	12 - 18	16.05 $\pm$ 2.00	16.64 $\pm$ 1.63	16.34 $\pm$ 1.75	0.44
Htc (%)	37 - 55	47.65 $\pm$ 5.68	50.41 $\pm$ 5.52	49.82 $\pm$ 4.87	0.13
Leuko (cells $\times 10^3$ / μ l)	6 - 17	9.54 $\pm$ 2.69	9.51 $\pm$ 2.46	8.84 $\pm$ 2.50	0.36
Platelets (cells $\times 10^3$ / μ l)	175 - 500	344.7 $\pm$ 123.1	335.5 $\pm$ 80.43	291.4 $\pm$ 108.2	0.09
Total protein (g/dL)	5.5 – 8.0	6.81 $\pm$ 0.53	7.16 $\pm$ 0.91	7.23 $\pm$ 0.79	0.06
Albumin (g/dl)	3.2 – 4.1	3.19 $\pm$ 0.21	3.61 $\pm$ 0.24 ^a	3.43 $\pm$ 0.24	<0.001
ALT (U/L)	21 – 102	51.91 $\pm$ 43.83	55.45 $\pm$ 33.73	46.27 $\pm$ 20.11	0.58
AP (U/L)	20 – 156	70.27 $\pm$ 19.19	74.27 $\pm$ 20.69	71.55 $\pm$ 23.10	0.58
Urea (mg/dL)	21 - 59.9	33.55 $\pm$ 8.23	40.82 $\pm$ 12.25	38.91 $\pm$ 10.83	0.20
Creatinine (mg/dL)	0.5 - 1.5	0.95 $\pm$ 0.17	1.17 $\pm$ 0.21 ^a	1.13 $\pm$ 0.21	0.0006
Lactate (mmol/L)	2.0 - 3.9	2.67 $\pm$ 0.51	3.25 $\pm$ 0.48	3.25 $\pm$ 1.15	0.37
Na (mmol/L)	141 – 154	141.3 $\pm$ 3.21	143.9 $\pm$ 3.27 ^a	145.2 $\pm$ 1.42 ^b	<0.01
K (mmol/L)	3.90 - 5.65	4.37 $\pm$ 0.13	4.40 $\pm$ 0.15	4.56 $\pm$ 0.19	0.06

a,b: Differed significantly from baseline. c: Differed significantly from baseline. c,d: Differed significantly between each other. *

Table 2 - Mean $\pm$ standard deviation values of the urinalysis during baseline, and after the instillation of trometamol ketorolac for 15 and 30 days in healthy dogs.

	Reference	Baseline	Day 15	Day 30	P value
Leukocytes	Absent	0.00	0.00	0.00	-
Specific gravity	1.015 - 1.045	1.032 $\pm$ 11.15	1.038 $\pm$ 13.52	1.038 $\pm$ 13.34	0.36
Protein	Absent	0.18 $\pm$ 0.40	0.09 $\pm$ 0.30	0.09 $\pm$ 0.30	0.79
Glucose	Absent	0.00	0.00	0.00	-
Ketonic bodies	Absent	0.00	0.00	0.00	-
Bilirubin	Absent	0.09 $\pm$ 0.30	0.63 $\pm$ 0.80	0.36 $\pm$ 0.80	0.18
pH	5.0 - 7.0	6.81 $\pm$ 1.07	7.40 $\pm$ 0.97	7.00 $\pm$ 1.26	0.47
Erythrocytes	0 – 3	0.63 $\pm$ 0.92	0.54 $\pm$ 0.68	0.36 $\pm$ 0.50	0.64
UPC (mg/dL)	< 0.20 – 0.5	0.12 $\pm$ 0.14	0.08 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.06	0.38

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES for the scholarship provided.

REFERENCES

- BORGES, M.; MARINI FILHO, R.; LAPOSY, C.B., *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: changes on renal function of healthy dogs. *Acta Cir. Bras.*, v.28, p.842-847, 2013.
- BURTON, S. Hypoproteinemia, hyperproteinemia. In: ETTINGER, S.J; FELDMAN, E.C.; ETIENNE C. (Eds.). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat*. 8ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017, p765-770.
- DOBBERSTEIN, R.E.A.; OBLAK, M.L.; BRISSON, B.A. *et al.* Primary repair of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated full thickness gastrointestinal ulcers in 11 dogs. *Vet. Surg.* v.51, p.1096-1105, 2022.
- EL-KERSH, K.; CHADDHA, U.; SINHA, R.S. *et al.* Predictive role of admission lactate level in critically ill patients with acute upper gastrointestinal bleeding. *J. Emerg. Med.*, v.49, p.318-25, 2015.
- EWALD, M.; RANKIN, A.J.; MEEKINS, J.M. *et al.* Prednisolone and dexamethasone are systemically absorbed after topical application of ophthalmic suspensions in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.83, p.339–348, 2022.

- FALCINELLI, E.; IANNONE, A.; MEZZASOMA, A.M. *et al.* Inhibition of platelet function after ocular administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Thromb. Res.*, v.175, p.1-5, 2019.
- FRANCO, R.P.; MASSUFARO, C.R.; MARTINELLI J. *et al.* Valores de lactato sérico e sua correlação com parâmetros clínicos de cães saudáveis, mensurados durante atendimento ambulatorial veterinário. *Pesq. Vet. Bras.*, v.36, p.509-515, 2016.
- FUSELLIER, M.; DESFONTIS, J.C.; LE ROUX, A. *et al.* Effect of short-term treatment with meloxicam and pimobendan on the renal function in healthy beagle dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v.31, p.150-155, 2008.
- GIULIANO, E. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 34, p: 707-723, 2004.
- GRIGGS, A.N.; YAW, T.J.; HAYNES, J.S. *et al.* Bioavailability and biochemical effects of diclofenac sodium 0.1% ophthalmic solution in the domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Vet. Ophthalmol.*, v.20, p.171-176, 2017.
- HSU, K.K.; PINARD, C.L.; JOHNSON, R.J. *et al.* Systemic absorption and adverse ocular and systemic effects after topical ophthalmic administration of 0.1% diclofenac to healthy cats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 76, p. 253-265, 2015.
- KO, B.S.; KIM, W.Y.; RYOO, S.M.; AHN, S. *et al.* Predicting the occurrence of hypotension in stable patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: point-of-care lactate testing. *Crit. Care Med.* v.43, p.2409-2415, 2015.
- LIESER, J.; SCHWEDES, C.; WALTER, M.; LANGENSTEIN, J.; MORITZ, A.; BAUER, N. Oxidative damage of canine erythrocytes after treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere.* v.49, 407-413, 2021.
- LANUZA, R.; RANKIN, A.J.; KUKANICH, B.; MEEKINS, J.M. Evaluation of systemic absorption and renal effects of topical ophthalmic flurbiprofen and diclofenac in healthy cats. *Vet. Ophthalmol.*, v. 19, p. 24-29, 2016.
- LUNA, S.P.; BASÍLIO, A.C.; STEAGALL, P.V. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 68, p.258-264, 2008.
- MOONEY, E.; RAW, C.; HUGHES, D. Plasma lactate concentration as a prognostic biomarker in dogs with gastric dilation and volvulus. *Top. Companion. Anim. Med.*, v.29, p.71-76, 2014.
- NAKAGAWA, K.; YAMAGAMI, T.; TAKEMURA, N. Hepatocellular toxicosis associated with the alternate administration of carprofen and meloxicam in a Siberian Husky. *J. Vet. Med. Sci.*, v.67, p.1051-1053, 2005.
- PEREIRA, F.Q.; SANTOS, B.; CARBONI, T. *et al.* Systemic absorption and adverse effects of topical ocular use of ketorolac tromethamine and sodium diclofenac in New Zealand rabbits for 90 days. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v.71, p.1865-1872, 2019.
- PIECH, T.L.; WYCISLO, K.L. Importance of urinalysis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.49, p.233-245, 2019.
- SANT'ANNA, M. C. *et al.* Protein-to-creatinine urinary in the early diagnosis of renal injury in canine pyometra. *Pesq. Vet. Bras.*, v.39, p.186-191, 2019.
- SEBBAG, L.; KIRNER, N.S.; WULF, L.W.; MOCHEL, J.P. Tear film pharmacokinetics and systemic absorption following topical administration of 1% prednisolone acetate ophthalmic suspension in dogs. *Front. Vet. Sci.*, v.7, 571350, 2020.

SHAH A, CHISOLM-STRAKER M, ALEXANDER A, et al. Prognostic use of lactate to predict inpatient mortality in acute gastrointestinal hemorrhage. *Am. J. Emerg. Med.* v.32, p.752-755, 2014.

SYED, M.F.; REHMANI, A.; YANG, M. Ocular side effects of common systemic medications and systemic side effects of ocular medications. *Med. Clin. North Am.*, v.105, p.425-444, 2021.

VERSCHOOF, J.; MORITZ, A.; KRAMER, M.; BAUER, N. Hemostatic variables, plasma lactate concentration, and inflammatory biomarkers in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Tierarztl Prax. Ausg. K. Kleintiere Heimtiere*, v.43, p.389-398, 2015.

ANEXO II. Comprovante de submissão do artigo “Effects of topical trometamol ketorolac on tears parameters, goblet cell density and the oxidative stress of the conjunctiva of healthy dogs” ao periódico Veterinary Ophtalmology, fator de impacto 1,44

08/05/2023, 18:17

Email – Dabila Sonogo – Outlook

Veterinary Ophthalmology-submission confirmation

Andras Komaromy <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Seg, 08/05/2023 12:03

Para: alexandre.aleribs@gmail.com <alexandre.aleribs@gmail.com>

Cc: alexandre.aleribs@gmail.com <alexandre.aleribs@gmail.com>; nathaliedower@gmail.com <nathaliedower@gmail.com>; dabila_s@hotmail.com <dabila_s@hotmail.com>; fhfurlan@gmail.com <fhfurlan@gmail.com>

08-May-2023

Dear Dr Ribeiro:

Your manuscript entitled "Effects of topical trometamol ketorolac on tears parameters, meibography, goblet cell density and the conjunctival oxidative stress in healthy dogs" by Ribeiro, Alexandre; dower, nathalie; Sonogo, Dábila ; Furlan, Fernando, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Veterinary Ophthalmology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is VOP-23-05-3034.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fvop&data=05%7C01%7C%7C14509e87561345375b3808db4fe632d6%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C638191622329211989%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljojMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLCJBTil6lk1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sdata=gPxpnFNII5%2F5%2FEhxzoUPKuiq2IMpyX8NIVMFzx%2FT09E%3D&reserved=0> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fvop&data=05%7C01%7C%7C14509e87561345375b3808db4fe632d6%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C638191622329211989%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljojMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLCJBTil6lk1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sdata=gPxpnFNII5%2F5%2FEhxzoUPKuiq2IMpyX8NIVMFzx%2FT09E%3D&reserved=0>.

Thank you for submitting your manuscript to the Veterinary Ophthalmology.

Sincerely,

Veterinary Ophthalmology Editorial Office

APÊNDICE B – Submissão ao periódico Veterinary Ophthalmology

Effects of topical trometamol ketorolac on tears parameters, goblet cell density and the oxidative stress of the conjunctiva of healthy dogs

Objectives. To evaluate and compare whether a twice-daily instillation of ketorolac tromethamine (KT), containing or not benzalkonium chloride (BC), for 30 consecutive days may affect tear film parameters and the meibography in healthy dogs. In addition, we assessed whether the same treatments would affect the goblet cell density (GCD) and the levels of oxidative stress biomarkers (OSB) in the conjunctiva of the same dogs.

Methods. Eleven healthy dogs were selected and baseline values of the lipid layer thickness, tear meniscus height, non-invasive tear break-up time (ni TFBT), and the Meibomian gland (MG)-rate loss were assessed by OSAvet[®]. One fragment of conjunctiva was collected for GCD determination and quantitation of OSB. For 30 days, and every each 12 h, one eye received 40 µL of KT ophthalmic solution (BCKT), while the other received 40 µL of same ophthalmic solution free of BC (FKT). Tear parameters and meibography assessed by OSAvet[®] were repeated 15, and 30 days later. At day 30, another conjunctival sample was collected with the same purposes.

Results. At day 15, the MG-loss rate increased only in FKT treated-eyes ($P < 0.001$). At day 30, both treatments elevated the MG-loss rate, and reduced the ni TFBT values, the GCD, and the levels of catalase ($P < 0.05$). At day 30, BCKT treated-eyes showed lower levels superoxide dismutase ($P = 0.006$) and higher levels of malondialdehyde ($P = 0.02$). However, differences between treatments were not observed for any parameter at any time point ($P > 0.05$). The GCD correlated with the ni TFBT and all biomarkers of the oxidative stress in both treated-eyes ($P < 0.05$).

Conclusions. Results of our study showed the twice-daily instillation of KT, containing or not BC, for 30 consecutive days was able to decrease the ni TFBT and to increase the MG-loss rate of healthy dogs. In addition, both formulations reduced the conjunctival GCD. Our results also showed that the lower ni TFBT values found in both treatments are associated with a reduction of the GCD and are not correlated with an increase in the MG-loss rate. The reduced levels of SOD, followed by the higher levels of MAD observed in the eyes that received BCKT suggests that BC stimulates a higher lipid peroxidation, and therefore still plays a detrimental role to the conjunctival tissue, despite the absence of statistical significance between treatments found in the clinical parameters assessed by OSAvet[®] and the GCD assessed by histology.

Introduction

In comparison to topical corticosteroids, topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) represent a more prudent therapeutic choice when treating uveitis arising from infectious ocular diseases, in patients with diabetes mellitus, and in corneas presenting is a NSAID commonly prescribed in humans for the alleviation of ocular inflammation and pain after cataract and refractive surgeries, and prevention of intraoperative miosis during phacoemulsification²⁻⁷ (Narváez et al., 2004²; Bucci & Waterbury, 2011³, Suleiman et al., 2010⁴; Jun et al., 2017⁵; Liu et al., 2019⁶; Schwarzenbacher et al., 2020⁷). In human patients, topical KT achieves a higher aqueous humor concentration and is more efficient to inhibit aqueous humor prostaglandin E₂ levels than nepafenac³ and bromfenac⁸ (Bucci & Waterbury, 2007³; Bucci & Waterbury, 2011⁸).

The most common preservative present in ocular medications is benzalkonium chloride (BC). However, the use of solutions enriched with BC for a long-term are associated with tear film abnormalities, such as hyperosmolarity, instability, and increased oxidative stress^{9,10} (Goldstein et al., 2021⁹; Sedlak et al., 2021¹⁰). Additionally, the chronic use of solutions enriched with BC may cause meibomian gland dysfunction, a decreased density of conjunctival goblet cells, corneal and conjunctival epithelial cell apoptosis, corneal nerves damage as well as inflammation of ocular tissues and fibrotic reaction (Goldstein et al., 2021⁹).

The most common local adverse events of ocular NSAIDs are conjunctival stinging, burning, hyperemia, corneal anesthesia, and more rarely corneal melting¹¹ (Rigas et al., 2020¹¹). In cats, mild conjunctival hyperemia was the only adverse ocular event detected after 7 days of consecutive treatment with topical diclofenac¹² (Hsu et al., 2015¹²). Regarding the possible interference of topical NSAIDs on neuronal nociceptive activity, one study showed that diclofenac, but not KT decreased the corneal sensitivity in dogs¹³ (Cantarella et al., 2017¹³). Similarly, KT had no effect over the corneal sensitivity in cats that received topical KT ophthalmic solution for 5 consecutive days¹⁴ (Roberts et al., 2021¹⁴). *In vitro* studies reported that the cytotoxicity of NSADs ophthalmic solutions was found to be dependent on both the pharmaceutical components of the solution and the preservative used^{15,16} (Ayaki et al., 2010¹⁵, Lee et al., 2015¹⁶).

The Meibomian glands (MGs) are essential for the production of the outer lipid layer of the tear, which play an important role in the stabilization of the tear film after blinking, avoiding its evaporation^{17,18} (Kim et al., 2022¹⁷; Zwiauer & Wolfbeisser, 2023¹⁸). Studies *in vitro* and *in vivo* conducted in humans showed that ophthalmic solutions enriched with BC caused more severe damage to MGs in comparison with preservative-free ophthalmic solutions^{19,20} (Ha et al., 2019¹⁹; Rath et al., 2019²⁰). The goblet cell-derived mucin layer is the base overlying the glycocalyx-microvilli complex that anchors the aqueous layer of the tear film over the ocular surface. Loss of goblet cells density (GCD) leads to decreased mucin secretion, which then leads to instability of the tear film, decreased nutrition to the superficial conjunctival epithelial cells with resulting increased mechanical damage to conjunctival and corneal surface cells²¹⁻²³ (Moore et al., 1987²¹; Madruga et al., 2018²²; Hori 2018²³). In a study conducted in rabbits, the conjunctival GCD reduced significantly after a 30-day treatment with ophthalmic solutions enriched with BC²⁴ (Kahook and Noecker, 2008²⁴). Results of a clinical study showed that the GCD and the tear film break-up time (TFBT) reduced significantly even in humans treated for 30 days with a preservative free-diclofenac ophthalmic solution after phacoemulsification²⁵ (Kato et al., 2017²⁵).

The cornea and the ocular surface epithelium are exposed to the atmosphere and high concentrations of oxygen. Therefore, a strong antioxidation mechanism is required to resist oxidative stress²⁶ (Hsueh et al., 2022²⁶). Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) act together as frontrunners with an antioxidant effort to remove reactive oxygen species (ROS)²⁷ (Nezzar et al., 2017²⁷). Within this context, SOD converts superoxide anions into H₂O₂ and O₂ through a disproportionation reaction, and CAT further catalyze the conversion of H₂O₂ into water and O₂²⁶ (Hsue et al., 2022²⁶). The prime target of ROS is the polyunsaturated fatty acids in membrane lipids, leading to lipid peroxidation with resultant damage to cell structure and function; thus, malondialdehyde (MDA) elevation is a good indicator for lipid peroxidation²⁶ (Hsue et al., 2022²⁶). Several studies reported an abnormal oxidative stress status in different corneoconjunctival diseases of rabbits, mice, humans, cats, and dogs^{10,27-31} (Demir et al., 2005²⁸; Chen et al., 2013²⁹; Kojima et al., 2015³⁰; Nezzar et al., 2017²⁷; Farghali et al., 2021³¹; Sedlak et al., 2021¹⁰). The role of the NSADs over the oxidative status is controversial (Dixit

et al., 2020; Nawas et al., 2020). In addition, there are no published studies showing the effects of ophthalmic NSADs over the oxidative stress status on the ocular surface.

It has been reported that the BC-diclofenac and BC-bromfenac ophthalmic solutions were more cytotoxic to corneconjunctival cells of humans, in comparison with cell cultures exposed to the same components free of preservatives¹⁵ (Ayaki, et al., 2010¹⁵). Considering that dogs are commonly treated for long periods before and after cataract surgery with topical medications, including NSAIDs, it is important to evaluate possible changes caused by this class of drugs over tear parameters, as well as the conjunctival tissue. KT is available in the market as an ophthalmic solution enriched or not with BC. Thus, this study aimed to evaluate and compare whether a twice-daily instillation of KT, containing or not BC, for 30 consecutive days may affect tear film parameters (lipid layer thickness, tear meniscus height, and non-invasive tear film break-up time) and the meibography in healthy dogs. In addition, we assessed whether the same treatments would affect the GCD and the levels of SOD, CAT, and MDA in the conjunctiva of the same dogs.

Material and methods

Dogs

The exclusion criteria were being a brachycephalic breed, current or recent (30 days before) treatment with any systemic or topical ophthalmic medications, Schirmer tear test-1 with values ≤ 15 mm/min., tear film-breakup time less than 10 seconds^{22,32} (Madruga et al., 2018²²; Reynolds et al. 2022³²), current/history of abnormalities in the adnexa (previous surgery), current/history of corneal surface disease, or current/history of intraocular diseases such as uveitis or cataracts detected on full ophthalmic examination. Additionally, only dogs without systemic comorbidities assessed by a general physical examination and blood work were recruited for study participation. Four castrated male and seven spayed bitches (22 eyes of 11 dogs) aged 2–7 years and weighing 4.6–10.3 kg that belonged to veterinary staff members of the [MASKED FOR REVIEW] Veterinary Teaching Hospital (VTH) were selected. The breeds included were as follows: Schnauzer (1), Pincher (3), Dachshund (1), Yorkshire Terrier (2), and non-brachycephalic mixed breed (4). These dogs were kept in their homes and were treated daily by the veterinarians enrolled in the study. For all evaluations and procedures described below, dogs were brought to the VTH and immediately discharged at the end of the procedures. All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee [MASKED FOR REVIEW] (23108.043452/2022-05).

Procedures

Treatments

Once selected, one eye was randomly chosen (<http://www.randomization.com>) and treated with 40 μ L of 0.45% preservative free-tromethamine ketorolac (FKT) ophthalmic solution (Acular[®] CMC, Allergan, Guarulhos, SP, Brazil), while the other eye received 40 μ L of 0.4% benzalkonium chloride preserved-tromethamine ketorolac (BCKT) ophthalmic solution (Acular[®] LS, Allergan, Guarulhos, SP, Brazil), every 12 h for 30 consecutive days. A twice-daily automated message was sent to all the veterinarians participating in the study as a reminder to check if the eye drops were being administered properly. Participants whose did not respond the messages or were unable to administer treatments at a given time point, had their dog excluded from the study.

Tear film evaluations and meibography

A hand-held ocular surface analyzer (OSA-VET[®], SBM Sistemi, Torino, Italy) equipped with white led light was used to perform non-contact interferometry. To execute the interferometry, the dogs underwent gently restraint, and after a complete manual blinking with minimal force the lipid layer thickness (LLT) of the precorneal tear film was determined. The grading scale generated by the instrument manufacturer consists of ranges of 0 – 14, 15 – 30, 31 – 60, 70 – 80, 90 – 100, or >100 nm. Further, the tear film was photographed by interferometry, and the tear meniscus height (TMH) was defined as the distance between the upper and lower limits at the midpoint of the inferior tear meniscus, and it was compared with the diameter of reflected white light by the program equipped within the instrument. Lastly, a grided ring was positioned over the tear film interferometric image and the non-invasive tear film break-up time (nTFBUT) was evaluated by measuring the time from eyelid opening to the time point when at least one line on the grid was distorted.

The infrared light of the same equipment (OSAvet[®], SBM Sistemi, Torino, Italy) was used to perform non-contact infrared meibography of the upper lid. The Meibomian gland area was automatically highlighted with green lines by the software integrated in the equipment and the meibomian gland loss rate (MG-loss rate) was calculated as the percentage of meibomian gland loss in relation to the entire tarsal plate area. All the procedures aforementioned were executed before treatments to obtain baseline values and repeated after 15 and 30 days of the beginning of treatments. To avoid excessive inter-observer differences in the assignment of ranks, all OSAvet[®] readings were done by the same examiner, blinded to treatments, always at 6 p.m.



Figura 1. Procedimento padrão de interferometria que permite selecionar diversas funções (quantidade e qualidade da camada lipídica, menisco lacrimal, topografia corneana e tempo de ruptura não invasiva do filme lacrimal).

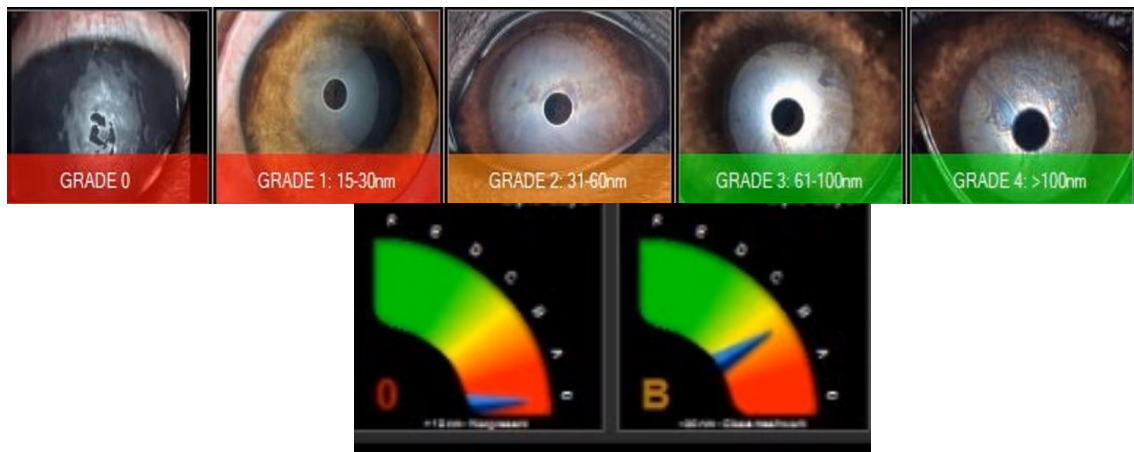


Figura 2. Escala colorimétrica que indica a espessura da camada lipídica da lágrima. De acordo com a concentração de lipídios dispersos na lágrima o ponteiro oscila. Nessa escala, o vermelho varia de grau 0 a 1, sendo grau 0 (ausência de camada lipídica) e 1 (camada lipídica oscilando entre 15-30 nm). Na escala amarela (grau 2), a camada lipídica apresenta de 31-60 nm. Na escala verde, a espessura da camada lipídica varia de 61-100 nm (grau 3) e acima de 100 nm (grau 4).

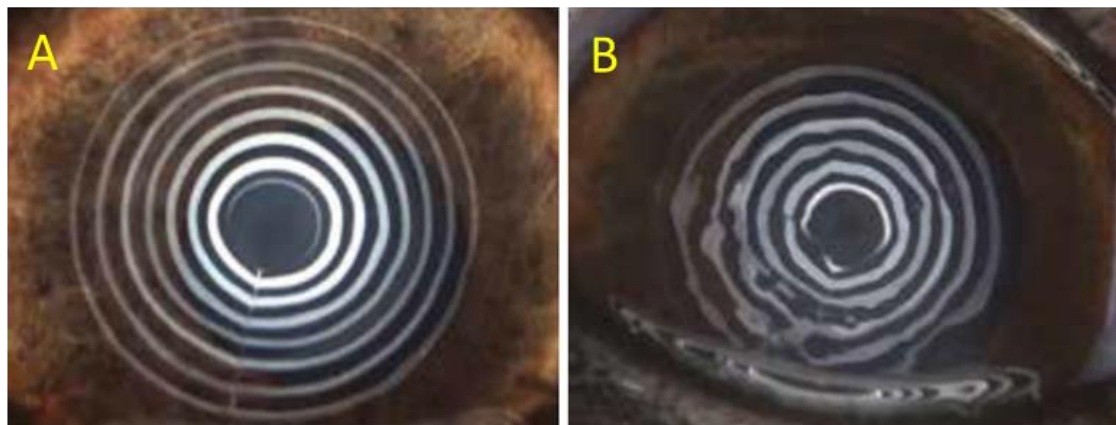


Figura 3. Realização do tempo de ruptura do filme lacrimal não invasivo. Após centralizar o ceratometro (Disco de plácido) no eixo pupilar inicia-se a contagem do cronômetro (A). Redução e distorção do diâmetro das grades do ceratometro, indicam início do tempo de ruptura do filme lacrimal e o crômetro é pausado (B).

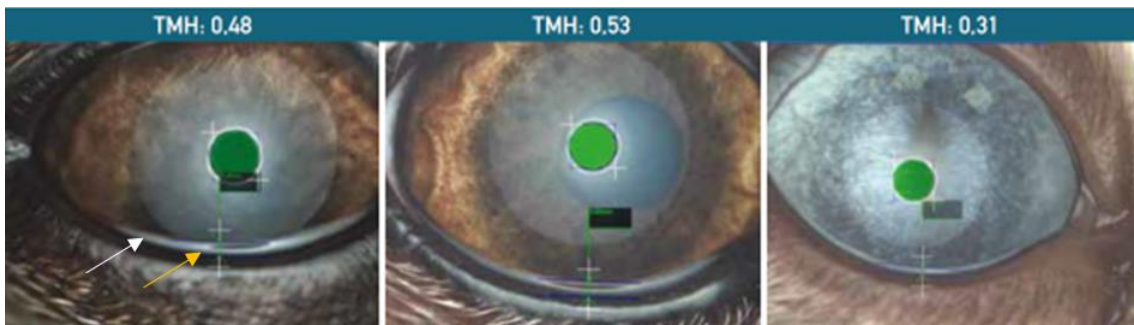


Figura 4. Esquema utilizado para quantificação da espessura do menisco lacrimal. Após centralizar a pupila no ponto central verde, o menisco lacrimal se evidencia na região palpebral ventral (seta branca). Na sequência, ao se posicionar dois cursores (seta laranja), a altura do menisco lacrimal é quantificada.

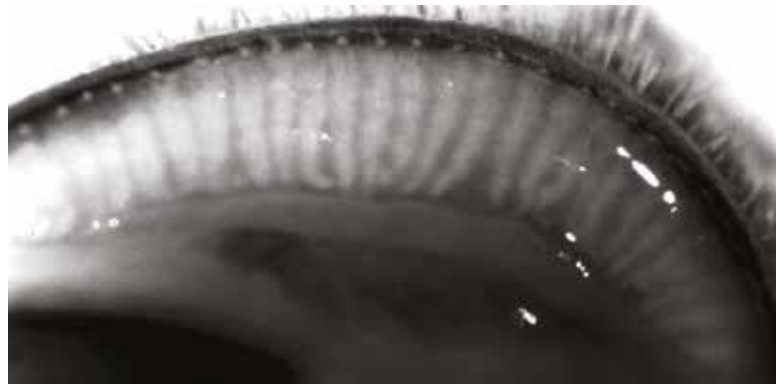


Figura 5. Para realização da Meibomiografia, uma imagem da região da conjuntiva palpebral dorsal, demonstrando as glândulas, deve ser obtida.

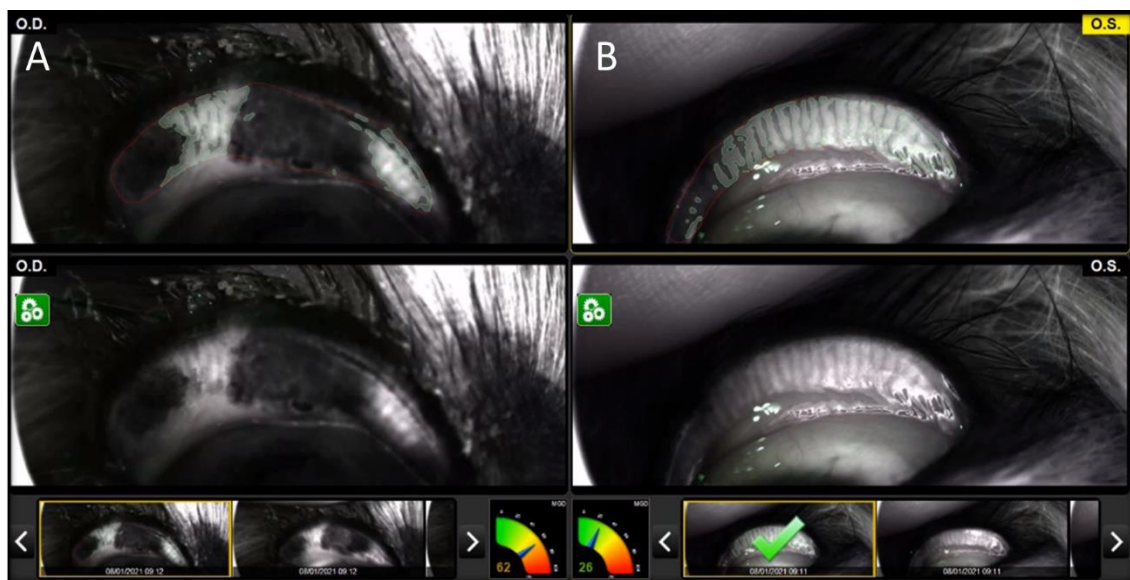


Figura 6. Meibomiografia. Após selecionar as glândulas de Meibômio, o ponteiro da escala colorimétrica determina automaticamente a perda da área que não apresenta glândulas de

meibômio (%). Em A, observa-se glândulas presentes em menor quantidade e o ponteiro oscilando na escala amarela, atribuindo 62% de perda. Em B, observa-se dispersão normal das glândulas de Meibômio e o ponteiro oscilando na escala verde, atribuindo nota 26% de perda.

Conjunctival biopsy and goblet cell density determination

At the end of OSAvet[®] examinations, the ocular surface was rinsed with 0.5% povidone-iodine solution. Afterwards, one drop of 0.5% proxymetacaine (Anestalcon[®] Alcon Laboratorios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) was instilled and following a two-minute interval, a specimen of conjunctiva measuring 3.0mm² was collected from the ventral-nasal fornix. The same procedure was repeated at day 30 away from the area previously biopsied. Samples were routinely prepared and stained Acid Periodic Schiff/Hematoxylin & Eosin. Under 40x of magnification the nuclei of 50 epithelial basal conjunctival cells were counted, and the amount of goblet cells present at those sites were quantified.

Quantitation of oxidative stress biomarkers

Homogenates were prepared by mechanical shredding of the conjunctival tissue and the total protein concentration was determined by Bradford's test³³ (Bradford, 1976³³). The SOD activity was performed as described with some modifications³⁴ (Ewing & Janero, 1995³⁴). The complete reaction system (in 0.25 mL total volume) consisted of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA, 50 µM NBT, 78 µM NADH, 3.3 µM PMS (final concentration), and 500 ng of protein. To evaluate the CAT activity, the sample was diluted 10-fold in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) and the molar extinction coefficient of H₂O₂ was used to determine the catalase activity³⁵ (Aebi, 1984³⁵). The results were expressed in U/mg protein.

For free MDA quantification samples were homogenized in 2.0 mL of 1.15% potassium chloride and then centrifuged at 3350 x g at 4°C for 10 min. The supernatant was transferred to a microtube and stored on ice until analysis. For the measurement, 100 µL of 0.144% thiobarbituric acid solution (solubilized in 75 mM phosphate buffer, pH 2.5) and 0.5 mL of the sample (water was used for the blank) were added. The solution was stirred thoroughly and then placed in a heated water bath at 94°C for 60 min. Furthermore, 200 µL of n-butyl alcohol was added, and the mixture was homogenized. The mixture was then centrifuged at 1884 x g for 10 min at 4°C³⁶ (Percário, 2010³⁶). The supernatant was separated, and the absorbance at 535 nm was determined using a UV-Vis spectrophotometer. The results were expressed in µmol/g of tissue.

Statistical analysis

The sample size was determined with a 5% alpha error rate and 80% power based on standard deviations and equivalence limit values detected in a pilot study with 14 healthy dogs and previously published studies that evaluated OSAvet[®] parameters in dogs with healthy and diseased eyes^{17,32,37,38} (Jeong et al.³⁷, 2021; Kim et al., 2022¹⁷; Reynolds et al., 2022³²; Faghihi and Rajaei, 2022³⁸). Greater than or equal to 10 eyes/treatment was calculated as the appropriate sample size (www.sealedenvelope.com).

The Shapiro-Wilk test was used to assess data normality. All variables assessed by OSAvet[®] within the same treatment-eye were compared using one analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, followed by Bonferroni's multiple comparison test when necessary. Differences between treatments assessed by OSAvet[®] were compared with a regular ANOVA, followed by a Bonferroni's multiple comparison test when necessary. Paired t tests were used to determine if the GCD assessed at baseline was significantly different from that at

30 days after treatment within the same treated-eye. Unpaired t tests were used to examine if the changes in the GCD between two treatment-eyes were significant. The levels of CAT, SOD, and MDA collected at baseline and 30 days after treatments were compared within the same treatment-eye using the Wilcoxon test and by the Mann-Whitney test between treatments. The Person test was used to check possible correlations between parameters assessed by OSAvet[®], as well between GCD vs. ni TFBT. Spearman test was used to check possible correlations between GCD and oxidative stress biomarkers. Differences were considered statistically significant at $P \leq 0.05$ (Prism 4.0-GraphPad Software inc, California, USA). The data are expressed as median (range) for oxidative stress biomarkers. All the rest are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Results

Tear film evaluations and meibography

The LLT and TMH values did no change from baseline up to day 30 in the eyes that received FKT or BCKT ($P > 0.05$) (Table 1, Figure 1). In comparison with baseline, lower ni TFBT values were observed at days 15 and 30 in both treatments. However, statistical significance was reached only in comparisons between day 30 and baseline ($P < 0.05$) (Table 1, Figure 7).

The MG-loss rate also increased at days 15 and 30 in both of treatment-eyes. Nonetheless, only the eyes that received FKT showed a higher MG-loss rate at days 15 ($P < 0.01$) and 30 ($P < 0.001$) (Table 1, Figure 1 and 2). In the eyes treated with BCKT, statistical significance was observed only in comparisons between baseline and day 30 ($P = 0.03$). In all parameters assessed with OSAvet[®], differences between treatments were not seen at any time point ($P > 0.05$) (Table 1, Figure 1). In addition, there were no correlations among parameters assessed with OSAvet[®] (Table 2).

Table 1. Mean $\pm$ SD of lipid layer thickness (LLT), Meibomian gland-loss rate (MG-loss rate), tear meniscus height (TMH), and non-invasive tear film breakup time (ni TFBT) assessed during time points in the eyes that received ketorolac tromethamine containing (BCKT) or not benzalkonium chloride (FKT).

	Baseline	15 days	30 days	p-value
LLT (nm)				
FKT	39.55 $\pm$ 26.78	32.27 $\pm$ 24.63	21.82 $\pm$ 7.83	0.10
BCKT	40.91 $\pm$ 25.77	33.64 $\pm$ 23.99	29.09 $\pm$ 18.41	0.42
p-value 0.37				
TMH (mm)				
FKT	0.32 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.20	0.41 $\pm$ 0.22	0.46
BCKT	0.36 $\pm$ 0.18	0.40 $\pm$ 0.29	0.38 $\pm$ 0.16	0.92
p-value 0.89				
ni TFBT				
(seconds)	16.36 $\pm$ 8.43	9.79 $\pm$ 5.40	7.32 $\pm$ 4.75*	<0.01
FKT	14.78 $\pm$ 7.85	9.97 $\pm$ 6.98	8.52 $\pm$ 4.75*	0.03
BCKT	0.65	0.94	0.55	
p-value				
MG-loss rate (%)				
FKT	13.73 $\pm$ 12.45	34.82 $\pm$ 11.81 ^a	38.91 $\pm$ 17.25*	<0.01^a, <0.001*
BCKT	22.00 $\pm$ 14.35	35.00 $\pm$ 10.61	41.64 $\pm$ 12.89*	<0.01
p-value	0.16	0.97	0.67	

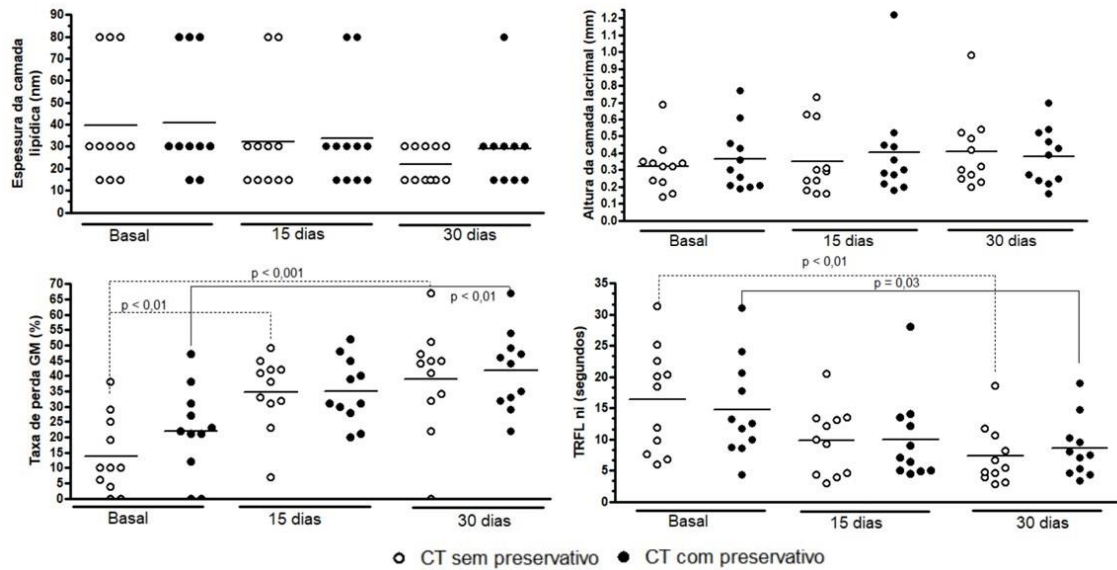


Figure 7. Lipid layer thickness, tear meniscus height, non-invasive tear film breakup time (ni TFBT), and Meibomian gland-loss rate (MG-loss rate) assessed during time points in the eyes that received ketorolac tromethamine (KT) containing or not benzalkonium chloride. The line represents the mean, and the circles refer to the individual values.

Table 2. Correlations among tear parameters assessed by OSAvet[®], in the eyes that received ketorolac tromethamine containing (BCKT) or not benzalkonium chloride (FKT).

	Person r	p-value
ni Tear film break-up time vs. Lipid layer thickness		
FKT	0.01	0.93
BCKT	0.08	0.65
ni Tear break-up time vs. MG-loss rate		
FKT	-0.21	0.23
BCKT	-0.28	0.10
ni Tear break-up time vs. Tear Menisco Heigh		
FKT	-0.26	0.13
BCKT	-0.10	0.56
MG-loss rate vs. Lipid layer thickness		
FKT	-0.19	0.28
BCKT	-0.16	0.35
MG-loss rate vs. Tear Menisco Heigh		
FKT	-0.05	0.76
BCKT	-0.15	0.38
Tear Menisco Heigh vs. Lipid layer thickness		
FKT	-0.25	0.16
BCKT	0.06	0.73

Conjunctival GCD

The GCD decreased significantly at day 30 in both treatments ($P < 0.05$) (Table 3) (Figure 8 and 9). However, differences between treatments were not observed at baseline and at day 30

($P > 0.05$) (Figure 2). Positive correlations between ni TFBT and GCD was observed in the eyes that received KTF ($r = 0.84$, $P < 0.0001$) and KTBK ($r = 0.88$, $P < 0.0001$) (Figure 10).

Table 3. Mean $\pm$ SD of conjunctival goblet cell density assessed during baseline and after 30 days in the eyes that received ketorolac tromethamine containing (BCKT) or not benzalkonium chloride (FKT).

	Baseline	30 days	p-value
FKT	35.91 ± 6.74	20.64 ± 6.90	0.002
BCKT	36.64 ± 10.41	24.73 ± 10.62	0.0002
p-value	0.84	0.29	

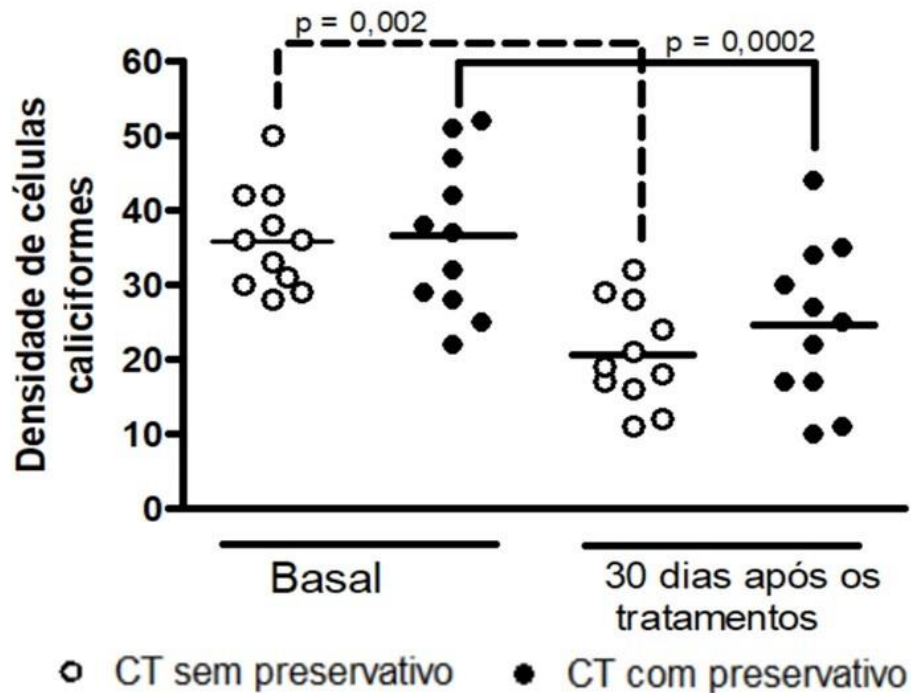


Figure 8. Conjunctival goblet cell density assessed during baseline and after 30 days of treatment with ketorolac tromethamine (CT) containing or not benzalkonium chloride. The line represents the mean, and the circles refer to the individual values.

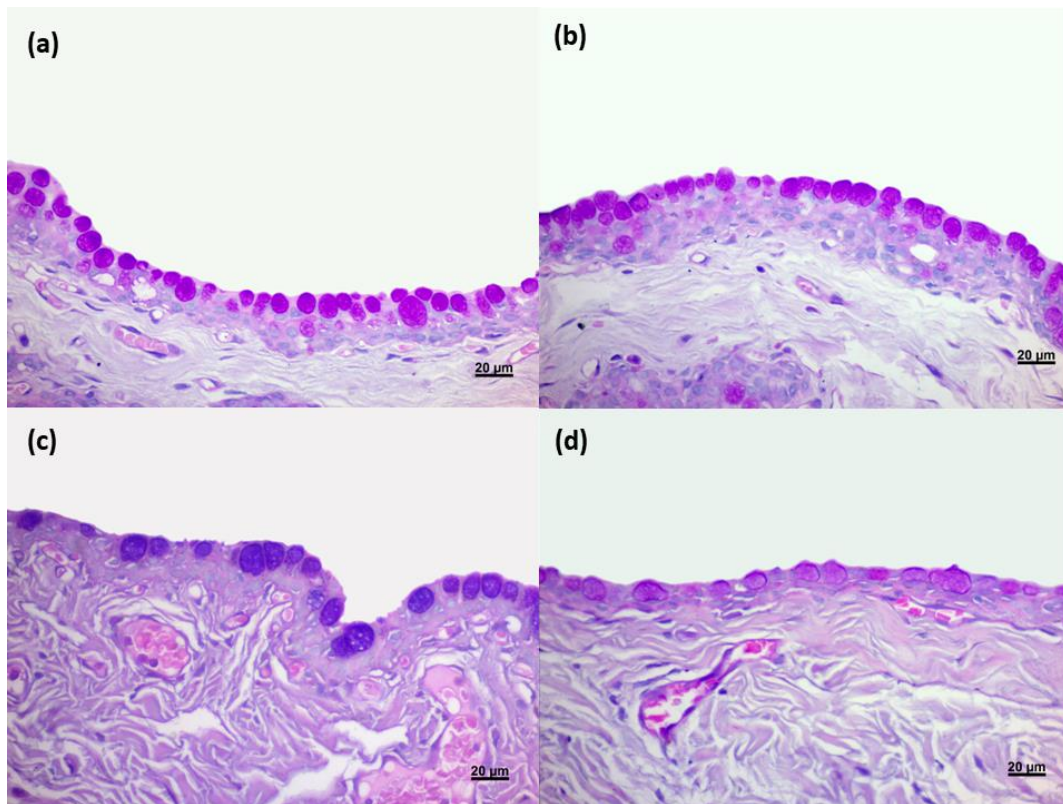


Figure 9. Conjunctival goblet cell density assessed at baseline in the eyes supposed to be treated with ketorolac tromethamine containing (a) or not benzalkonium chloride (b). Conjunctival samples collected from the same eyes, 30 days after being treated with ketorolac tromethamine containing (c) or not benzalkonium chloride (d). Acid Periodic Schiff/Hematoxylin & Eosin (x40 magnification).

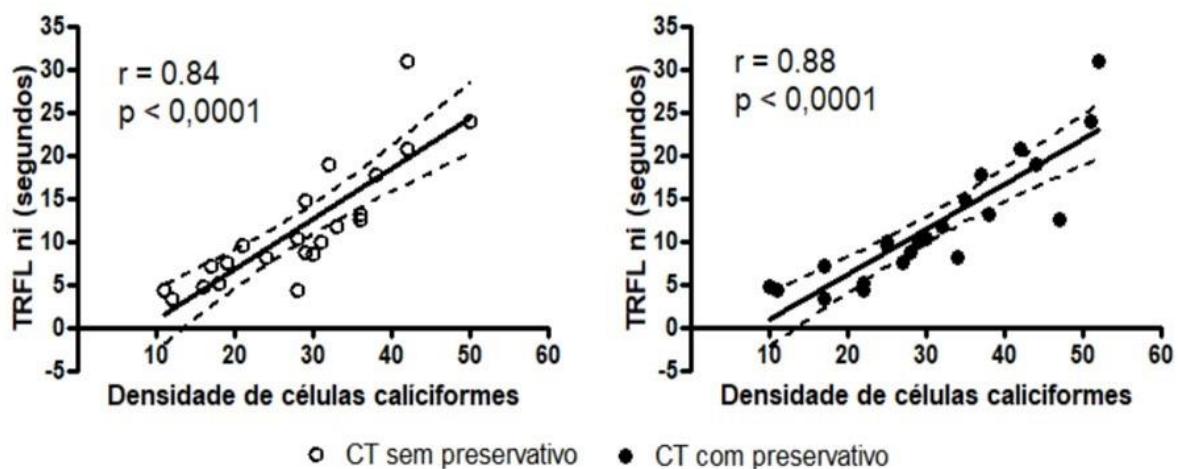


Figure 10. Linear regression curves showing positive correlation between ni-tear film break-up time (ni TFBT) and the goblet cell density in both of treatment-eyes. The dotted line indicates the 95% confidence interval.

Biomarkers of the oxidative stress

When compared with baseline, the enzyme SOD decreased significantly only in the BCKT-treated eyes ($P = 0.006$) (Table 4). The enzyme CAT decreased significantly at day 30 in both treatment-eyes ($P = 0.001$). However, only BCKT treated-eyes showed significantly higher values of MDA at day 30 ($P = 0.002$). Differences between treatments were not observed at any time point for any biomarker evaluated ($P > 0.05$) (Table 3). All biomarkers of the oxidative stress evaluated correlated significantly with the conjunctival GCD ($P < 0.05$) (Table 5).

Table 4. Median and range of conjunctival catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde assessed during baseline and after 30 days in the eyes that received ketorolac tromethamine containing (BCKT) or not benzalkonium chloride (FKT).

	Baseline	30 days	p-value
Superoxide dismutase (U/mg)			
FKT	14.37 (13.10 to 29.90)	14.04 (10.14 to 22.51)	0.46
BCKT	15.01 (12.16 to 21.30)	12.96 (10.21 to 15.04)	0.006
p-value	0.64	0.37	
Catalase (U/mg)			
FKT	4.77 (0.54 to 69.11)	2.38 (0.27 to 34.55)	0.001
BCKT	3.08 (0.52 to 17.36)	1.54 (0.2 to 8.68)	0.001
p-value	0.43	0.43	
Malondialdehyde ($\mu\text{mol/g}$)			
FKT	2.12 (0.66 to 3.87)	3.02 (0.6 to 9.62)	0.19
BCKT	2.12 (0.66 to 3.06)	3.13 (1.05 to 6.52)	0.002
p-value	0.89	0.29	

Table 5. Correlations among the enzymes of the oxidative stress vs. goblet cell density in the eyes that received ketorolac tromethamine containing (BCKT) or not benzalkonium chloride (FKT).

	Sperman r	p-value
Goblet cell density vs. Catalase		
FKT	0.77	<0.0001
BCKT	0.95	<0.0001
Goblet cell density vs. Superoxide dismutase		
FKT	0.77	<0.0001
BCKT	0.97	<0.0001
Goblet cell density vs. Malondialdehyde		
FKT	-0.85	<0.0001
BCKT	-0.69	<0.0003

Discussion

Specific devices able to assess the lipid layer thickness (LLT) of the tear film, the tear meniscus height (TMH), the MG-rate loss, and the TFBT without fluorescein stain have been used in healthy dogs and in those presenting MG dysfunction^{17,32,37-39} (Viñas et al., 2019³⁹; Jeong et al., 2021³⁷; Kim et al., 2022¹⁷; Faghihi and Rajaei³⁸, 2022; Reynolds et al., 2022³²). However, only two of those studies reported the results of ni TFBT in healthy dogs^{17,37} (Jeong et al., 2022³⁷; Kim et al., 2022¹⁷). In one of those studies, values of ni TFBT assessed in 17 dogs of different breeds varied from 7 to 12 seconds³⁷ (Jeong et al., 2022³⁷); while in the other, mean ni TFBT values assessed in 10 beagles ranged from 8.2 to 37 seconds (mean 19.1 ± 9.5 seconds)¹⁷ (Kim et al., 2022¹⁷). In the current study, mean values of ni TFBT between right and left eyes assessed before treatments were 15.57 seconds, which is similar to values previously reported^{17,37} (Jeong et al., 2022³⁷; Kim et al., 2022¹⁷).

To date, there is not a single standardized grading or staging system for the diagnosis of MG-rate loss on infrared meibography⁴⁰ (Hisey et al., 2023⁴⁰). Three previous studies conducted in healthy dogs used an adapted meiboscore established in human ophthalmology to evaluate this parameter^{17,32,37} (Jeong et al., 2022; Kim et al., 2022; Reynolds et al., 2022). In one of those studies, the MG-loss rate was less than 25% in 11/20 eyes, and ranged from 26 to 50% of loss in the other 9 eyes¹⁷ (Kim et al., 2022¹⁷). Jeong et al. (2022)³⁷ reported a MG-rate loss of 0% in 18/25 eyes, while the other 7 eyes showed a MG-rate loss of 33%. Another study reported that only 4/42 eyes showed a MG-rate loss higher than 25%³² (Reynolds et al., 2022³²). In the current study, the MG-rate loss assessed during baseline may be considered normal (less than 25%) in 72.72% of the eyes (16/22). In the other 6 eyes, the MG-rate loss assessed during this time point ranged from 27 to 47%, what is also similar to what have been previously reported in healthy dogs^{17,37} (Jeong et al., 2022³⁷; Kim et al., 2022¹⁷).

The results with regard the LLT in healthy dogs were previously reported in four studies^{17,32,37,38} (Faghihi & Rajaei, 2022; Kim et al., 2022; Jeong et al., 2022; Reynolds et al., 2022). In one of those studies, the grade 3 was the most frequent (11/20 eyes), which corresponds to a LLT of 30 to 80 nm¹⁷ (Kim et al., 2020¹⁷). In another study conducted in 25 eyes, the grade 3 was also the most frequent, being found in 36% of the eyes; followed by grade 2 (LLT of 30 nm) in 24% of the eyes³⁷ (Jeong et al., 2022³⁷). Faghihi & Rajaei (2022)³⁸ evaluated 82 eyes and found that grade 1 (LLT of 15nm) was the most frequent score, being followed by grade 2 (LLT of 15–30 nm). However, 52/82 eyes classified as grade 1 were all from brachycephalic breeds³⁸ (Faghihi & Rajaei, 2022³⁸). Reynolds et al. (2022)³² reported that a reference population of 21 dogs (42 eyes) had a LLT of 59.2 ± 34.9 nm; higher than the values found here and the ones previously reported by others^{17,37,38} (Faghihi & Rajaei, 2022; Kim et al., 2022; Jeong et al., 2022). In the current study, mean LLT assessed during baseline was 40.23 nm, which corresponds to grade 3, similar to those previously reported in dogs from South Korea^{17,37} (Kim et al., 2022; Jeong et al., 2022).

In two studies conducted in dogs from South Korea, TMH was 0.52 ± 0.27 ³⁷ (Jeong et al., 2022), and 0.41 ± 0.21 mm¹⁷ (Kim et al., 2022). During baseline, mean THM was 0.34 ± 0.16 mm, being lower than the values previously reported^{17,37} (Jeong et al., 2022, Kim et al., 2022). After 30 days of treatment, TMH did not change in any treatment-eye. To date, only one study has assessed possible correlations among tear parameters evaluated with an ocular surface analyzer similar with the one used herein¹⁷ (Kim et al., 2022). In this study, however, only the

ni TFBT and the TMH correlated positively¹⁷ (Kim et al., 2022). Differently, in the present study no correlations were found among parameters assessed with OSAvet[®].

In humans, clinical and *in vitro* studies showed that prostaglandin analogues (PGAs) ophthalmic solutions enriched with BC caused more severe damage to MGs in comparison with preservative-free PGAs ophthalmic solutions^{19,20} (Ha et al., 2019¹⁹; Rath et al., 2019²⁰). However, there are no previous studies comparing the effects of NSADs ophthalmic solutions over the MGs. Results of our study showed that the continued instillation of KT for 30 consecutive days, containing or not BC, is detrimental to the MGs, as showed by OSAvet[®] evaluations. Such a result suggests that both the active component and the preservative in KT ophthalmic solutions may contribute to MG disfunction observed herein. In the counterpart, only a slight decrease in the LLT occurred from baseline to the last day of both treatments, which probably resulted in a lack of correlation between MG-loss rate vs. LLT. Our results contrast with the findings reported in humans, that showed the number of MGs is negatively correlated with the LLT^{41,42} (Pult et al., 2012⁴¹; Eom et al., 2013⁴²). Although a significantly higher MG-loss rate had been observed 15 days earlier in the eyes treated with FKT, we believe that this finding was not caused by the formulation itself, instead, it occurred because of the lower number of MGs in the eyes allocated in the FKT group, as observed in the baseline evaluations.

ni TFBT was another parameter that also decreased significantly in both of the treatment-eyes after 30 days; but also, it did not correlate with the LLT and with MG-loss rate. It has been reported that the tear secretion assessed by Schirmer tear test (STT) is increased in patients with MG disfunction to compensate for the increased MG-loss rate⁴³ (Arita et al., 2015⁴³). However, in that same study researchers did not find any correlation between MG-loss rate and TFBT⁴³ (Arita et al., 2015⁴³). We have not assessed the possible effects of KT over the STT in our study, but the TMH did not change during the course of 30 days in both treatment-eyes. Only two previous studies conducted in humans reported the possible side effects of topical NSADs over tear parameters^{25,44} (Kawahara et al., 2016⁴⁴; Kato et al., 2017²⁵). In one of those studies, TFBT, Schirmer tear test, and the tear meniscus area did not change after 30 days of treatment with topical diclofenac or nepafenac in patients submitted to phacoemulsification⁴⁴ (Kawahara et al., 2016⁴⁴). Differently, another study showed that the TFBT reduced significantly, even in individuals treated for 30 consecutive days with a preservative free-diclofenac ophthalmic solution after phacoemulsification²⁵ (Kato et al., 2017²⁵). However, this same study did not consider to include a group treated with BC preserved-diclofenac²⁵ (Kato et al., 2017²⁵).

Two *in vitro* studies have reported that the use of topical NSAIDs can induce side effects on corneoconjunctival cell lines of humans^{15,16} (Ayaki et al., 2010¹⁵; Lee et al., 2015¹⁶). In one of these studies, Lee et al (2015) reported that the amounts of preservatives in the diclofenac sodium ophthalmic solution were higher in comparison with others ophthalmic solutions containing NSAIDs. Additionally, the same authors have reported that the corneal cell migration was significantly slower at 48 h in plates exposed to diclofenac, than the ones treated with bromfenac and pranoprofen¹⁶ (Lee et al., 2015¹⁶). In another study, patients treated with topical diclofenac had significantly higher conjunctival and corneal fluorescein staining scores 4 weeks after phacoemulsification, when compared with the patients treated with topical nepafenac (Kawahara et al., 2016). However, none of those studies compared the effects of diclofenac with KT^{15,16,44} (Ayaki et al., 2010; Lee et al., 2015; Kawahara et al., 2016). Only one clinical study conducted in humans compared the possible side effects of diclofenac, KT, and others NSADs ophthalmic solutions on the ocular surface⁴⁵ (Congdon et al. 2001⁴⁵). The results

of that study showed that the corneal complications associated with topical NSAIDs was confirmed in 81.8% of cases, and involved the use of generic diclofenac in 53.8%⁴⁵ (Congdon et al. 2001⁴⁵). Cases associated with the use of KT (AcularT, Allergan) were more likely to have ocular comorbidity and to have received significantly higher total doses⁴⁵ (Congdon et al. 2001⁴⁵). Although a more detailed evaluation of the corneal surface has not been carried out in the present study (staining with Lissamine green or *in vivo* confocal microscopy) is possible that corneal changes may have occurred and warrants further investigation and comparisons with the effects of others NSAIDs used as ophthalmic solutions in dogs.

It has been reported that the BC-diclofenac and BC-bromfenac ophthalmic solutions were more cytotoxic to corneconjunctival cells of humans, in comparison with cell cultures exposed to the same components free of preservatives¹⁵ (Ayaki, et al., 2010¹⁵). However, another study conducted with human patients showed that even a preservative free-diclofenac ophthalmic solution used for 30 days after phacoemulsification is able to significantly reduce the conjunctival GCD²⁵ (Kato et al., 2017²⁵). Such finding corroborates with our results that showed that both formulations of KT were equally detrimental to conjunctival GCD after 30 days of treatment. One possible explanation with regard the absence of statistical differences between groups in most of parameters assessed in our study may be attributed to the higher bioavailability and the absorption rate of the FKT. In one study that evaluated the effects of the same KT formulations used herein, Attar et al. (2010)⁴⁶ reported that the containing carboxymethyl cellulose KT formulation (pH 6.8), increased KT bioavailability by 2-fold in aqueous humor and by 3-fold in iris-ciliary body of rabbits in comparison to the containing BCKT (pH 7.4), allowing a reduced dosing schedule from 4 times daily to twice daily.

When a balance between ROS production and the ability of an antioxidant to remove them is disrupted, the oxidative process will ensue^{47,48} (Nezzar et al., 2017⁴⁷; Farghahi et al. 2021⁴⁸). The assessment of oxidative stress biomarkers in the conjunctival tissue showed that both of the eyes that received BCKT and FKT had significantly lower expression of CAT, which suggests that this enzyme played a significant role in protecting the conjunctival tissue against the effects of KT. However, a lower expression of SOD followed by a higher expression of MDA was seen only in the eyes that received BCKT. In humans with pterygium of first occurrence, the levels of conjunctival SOD, CAT, and glutathione peroxidases tend to decrease, in comparison with patients with normal eyes, but significant reductions of these enzymes were observed only in patients with recurrent pterygium⁴⁹ (Kormanovski et al., 2014⁴⁹). An abnormal oxidative stress behavior in the form of reduced SOD and CAT and elevated MDA were also observed in the conjunctival and corneal tissues of rabbits injured by ultraviolet light^{28,50} (Demir et al., 2005²⁸, Ruban et al., 2019⁵⁰), and in the tears of dogs and cats with different types of corneal ulcers⁴⁸ (Farghali et al. 2021⁴⁸). In those studies, subjects treated with a supposed antioxidant medication showed higher levels of SOD and CAT and lower levels of MAD^{28,48,50} (Demir et al., 2005; Ruban et al., 2019; Farghali et al. 2021). In fact, another study showed that the amounts of superoxide anions are higher in conjunctival epithelial cell lines of humans treated with PAGs containing BC in comparison with the ones treated with a formulation of PAG without BC⁵¹ (Brasnu et al., 2008⁵¹). Therefore, the reduced levels of SOD, followed by the higher levels of MAD observed in the eyes that received BCKT suggests that BC stimulates a higher lipid peroxidation, and therefore still plays a detrimental role to the conjunctival tissue, despite the absence of statistical significance between treatments found in the clinical parameters assessed by OSAvet[®] and the GCD assessed by histology.

There are no published studies evaluating the effects of ophthalmic NSAIDs over the oxidative stress status on the ocular surface. However, it has been reported that NSAIDs in

association with nicotinamide adenine dinucleotide oxidases, lipoxygenase, nitric oxide synthase, xanthine oxidoreductase, cytochrome P450s, and cyclooxygenases are able to generate ROS in biological systems⁵² (Galati et al., 2002⁵²). In fact, one study showed that the blood levels of MDA increase significantly and linearly in human patients treated for long-term with systemic NSADs⁵³ (Nawas et al., 2020⁵³). However, another study showed the contrary, and reported that diclofenac, meloxicam, and celecoxib carry antioxidant effects to a variable extent being able to decrease the blood levels of MDA and to increase the blood levels of SOD in human patients with rheumatoid arthritis⁵⁴ (Dixit et al., 2020⁵⁴).

This was the first study to show that biomarkers of the oxidative stress are correlated with the conjunctival GCD in dogs. One study reported that during aging, the SOD1-knockout mouse develops a cumulative oxidative stress status which induced a squamous metaplasia of the conjunctival epithelium with consequent reduction of the TFBT³⁰ (Kojima et al., 2015³⁰). Such results are in accordance with our findings that showed that not only the expression of SOD, but also the levels of CAT and MDA are correlated with the GCD of the conjunctival tissue. The main antioxidant enzymes expressed in the conjunctival tissue of humans are the glutathione peroxidases (GPx) and SOD, followed by CAT in lower proportions⁴⁷ (Nezzar et al., 2017⁴⁷). In the conjunctival tissue of humans, these enzymes are distributed in subcellular locations⁴⁷ (Nezzar et al., 2017⁴⁷). We did not quantify the expression of conjunctival GPx in the present study, but a significant reduction in the conjunctival SOD and CAT, suggests that these enzymes played a significant role in protecting the conjunctival tissue against the effects of KT.

Conclusions

Results of our study showed the twice-daily instillation of KT, containing or not BC, for 30 consecutive days was able to decrease the ni TFBT and to increase the MG-loss rate of healthy dogs. In addition, both formulations reduced the conjunctival GCD. Our results also showed that the lower ni TFBT values found in both treatments are associated with a reduction of the GCD and are not correlated with an increase in the MG-loss rate. The reduced levels of SOD, followed by the higher levels of MAD observed in the eyes that received BCKT suggests that BC stimulates a higher lipid peroxidation, and therefore still plays a detrimental role to the conjunctival tissue, despite the absence of statistical significance between treatments found in the clinical parameters assessed by OSaVet[®] and the GCD assessed by histology.

References

1. Giuliano EA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(3):707-723. doi:10.1016/j.cvsm.2003.12.003
2. Narváez, J., Krall, P., & Tooma, T. S. (2004). Prospective, randomized trial of diclofenac and ketorolac after refractive surgery. *Journal of refractive surgery (Thorofare, N.J. : 1995),* 20(1), 76–78. <https://doi.org/10.3928/1081-597X-20040101-13>
3. Bucci, F. A., Jr, & Waterbury, L. D. (2011). Prostaglandin E2 inhibition of ketorolac 0.45%, bromfenac 0.09%, and nepafenac 0.1% in patients undergoing phacoemulsification. *Advances in therapy,* 28(12), 1089–1095. <https://doi.org/10.1007/s12325-011-0080-7>

4. Suleiman, Y. M., Krdoghli, N. F., & Ahmad, A. J. (2010). Comparison of Ketorolac Tromethamine and Prednisolone Acetate in Preventing Surgically Induced Miosis during Cataract Surgery. *Sultan Qaboos University medical journal*, 10(1), 57–63.
5. Jun, J. H., Yoo, Y. S., Lim, S. A., & Joo, C. K. (2017). Effects of topical ketorolac tromethamine 0.45% on intraoperative miosis and prostaglandin E2 release during femtosecond laser-assisted cataract surgery. *Journal of cataract and refractive surgery*, 43(4), 492–497.
6. Liu, Y. C., Setiawan, M., Ang, M., Yam, G., & Mehta, J. S. (2019). Changes in aqueous oxidative stress, prostaglandins, and cytokines: Comparisons of low-energy femtosecond laser-assisted cataract surgery versus conventional phacoemulsification. *Journal of cataract and refractive surgery*, 45(2), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2018.09.022>
7. Schwarzenbacher, L., Schartmüller, D., Leydolt, C., & Menapace, R. (2020). Intraindividual comparison of cytokine and prostaglandin levels with and without low-energy, high-frequency femtosecond laser cataract pretreatment after single-dose topical NSAID application. *Journal of cataract and refractive surgery*, 46(8), 1086–1091. <https://doi.org/10.1097/j.jcrs.0000000000000221>
8. Bucci, F. A., Jr, Waterbury, L. D., & Amico, L. M. (2007). Prostaglandin E2 inhibition and aqueous concentration of ketorolac 0.4% (acular LS) and nepafenac 0.1% (nevanac) in patients undergoing phacoemulsification. *American journal of ophthalmology*, 144(1), 146–147. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2007.02.034>
9. Goldstein, M. H., Silva, F. Q., Blender, N., Tran, T., & Vantipalli, S. (2021). Ocular benzalkonium chloride exposure: problems and solutions. *Eye (London, England)*, 36(2), 361–368. <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01668-x>
10. Sedlak, L., Świerczyńska, M., Borymska, W., Zych, M., & Wyględowska-Promieńska, D. (2021). Impact of dorzolamide, benzalkonium-preserved dorzolamide and benzalkonium-preserved brinzolamide on selected biomarkers of oxidative stress in the tear film. *BMC ophthalmology*, 21(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12886-021-02079-y>
11. Rigas, B., Huang, W., & Honkanen, R. (2020). NSAID-induced corneal melt: Clinical importance, pathogenesis, and risk mitigation. *Survey of ophthalmology*, 65(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.07.001>
12. Hsu, K. K., Pinard, C. L., Johnson, R. J., Allen, D. G., KuKanich, B. K., & Nykamp, S. G. (2015). Systemic absorption and adverse ocular and systemic effects after topical ophthalmic administration of 0.1% diclofenac to healthy cats. *American journal of veterinary research*, 76(3), 253–265. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.3.253>
13. Cantarella, R. A., de Oliveira, J. K., Dorbandt, D. M., & Montiani-Ferreira, F. (2017). Effects of topical flurbiprofen sodium, diclofenac sodium, ketorolac tromethamine and benzalkonium chloride on corneal sensitivity in normal dogs. *Open veterinary journal*, 7(3), 254–260. <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i3.9>

14. Roberts, J. K., Meekins, J. M., Roush, J. K., & Rankin, A. J. (2021). Effects of topical instillation of 0.1% diclofenac sodium, 0.5% ketorolac tromethamine, and 0.03% flurbiprofen sodium on corneal sensitivity in ophthalmologically normal cats. *American journal of veterinary research*, 82(1), 81–87. <https://doi.org/10.2460/ajvr.82.1.81>
15. Ayaki M, Iwasawa A, Soda M, Yaguchi S, Koide R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneoconjunctival cell lines. *Clin Ophthalmol*. 2010; 20(4):1019-1024. doi: 10.2147/opth.s12452.
16. Lee JS, Kim YH, Park YM. The toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory eye drops against human corneal epithelial cells in vitro. *J Korean Med Sci*. 2015;30(12):1856-64. doi: 10.3346/jkms.2015.30.12.1856.
17. Kim, Y., Kang, S., Kim, S., Shim, J., Go, S., & Seo, K. (2022). Reference values for selected dry eye tests in normal Beagle dogs: a pilot study. *Journal of veterinary science*, 23(1), e10. <https://doi.org/10.4142/jvs.21169>
18. Zwiauer-Wolfbeisser, V., Handschuh, S., Tichy, A., & Nell, B. (2023). Morphology and volume of Meibomian glands ex vivo pre and post partial tarsal plate excision, cryotherapy and laser therapy in the dog using microCT. *Veterinary ophthalmology*, 10.1111/vop.13057. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/vop.13057>
19. Ha, J. Y., Sung, M. S., & Park, S. W. (2019). Effects of preservative on the meibomian gland in glaucoma patients treated with prostaglandin analogues. *Chonnam medical journal*, 55(3), 156–162. <https://doi.org/10.4068/cmj.2019.55.3.156>
20. Rath, A., Eichhorn, M., Träger, K., Paulsen, F., & Hampel, U. (2019). In vitro effects of benzalkonium chloride and prostaglandins on human meibomian gland epithelial cells. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 222, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.12.003>
21. Moore, C. P., Wilsman, N. J., Nordheim, E. V., Majors, L. J., & Collier, L. L. (1987). Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 28(12), 1925–1932.
22. Madruga G, Ribeiro AP, Magalhães TBS, Rondelli LAS, Furlan LF. Effect of 0.15% sodium hyaluronate and 0.5% carboxymethylcellulose on tear film breakup time in healthy dogs and in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2018;70:1388- 1396
23. Hori Y. (2018). Secreted Mucins on the Ocular Surface. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(14), DES151–DES156. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23623>
24. Kahook, M. Y., & Noecker, R. (2008). Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops. *Advances in therapy*, 25(8), 743–751. <https://doi.org/10.1007/s12325-008-0078-y>

25. Kato, K., Miyake, K., Kondo, N., Asano, S., Takeda, J., Takahashi, A., Takashima, Y., & Kondo, M. (2017). Conjunctival goblet cell density following cataract surgery with diclofenac versus diclofenac and rebamipide: a randomized trial. *American Journal of Ophthalmology*, 181, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2017.06.016>
26. Hsueh, Y. J., Chen, Y. N., Tsao, Y. T., Cheng, C. M., Wu, W. C., & Chen, H. C. (2022). The pathomechanism, antioxidant biomarkers, and treatment of oxidative stress-related eye diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1255. <https://doi.org/10.3390/ijms23031255>
27. Nezzar, H., Mbekeani, J. N., Noblanc, A., Chiambaretta, F., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2017). Investigation of antioxidant systems in human meibomian gland and conjunctival tissues. *Experimental eye research*, 165, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.09.005>
28. Demir, U., Demir, T., & Ilhan, N. (2005). The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde*, 219(1), 49–53. <https://doi.org/10.1159/000081783>
29. Chen, B. Y., Lin, D. P., Chang, L. S., Huang, T. P., Liu, H. J., Luk, C. P., Lo, Y. L., & Chang, H. H. (2013). Dietary α -lipoic acid prevents UVB-induced corneal and conjunctival degeneration through multiple effects. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(10), 6757–6766. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10891>
30. Kojima, T., Dogru, M., Ibrahim, O. M., Wakamatsu, T. H., Ito, M., Igarashi, A., Inaba, T., Shimizu, T., Shirasawa, T., Shimazaki, J., & Tsubota, K. (2015). Effects of Oxidative Stress on the Conjunctiva in Cu, Zn-Superoxide Dismutase-1 (Sod1)-Knockout Mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(13), 8382–8391. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18295>
31. Farghali, H. A., AbdElKader, N. A., AbuBakr, H. O., Ramadan, E. S., Khattab, M. S., Salem, N. Y., & Emam, I. A. (2021). Corneal ulcer in dogs and cats: novel clinical application of regenerative therapy using subconjunctival injection of autologous platelet-rich plasma. *Frontiers in veterinary science*, 8, 641265. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.641265>
32. Reynolds BD, Whittaker C, Caruso K, et al. An investigation into the development of qualitative tear film disorders in dogs following cryoepilation for distichiasis. *Vet Ophthalmol*. 2022;00:1-5. doi:10.1111/vop.13047
33. Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for a Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein – Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
34. Ewing, J. F.; Janero, D. R. (1995) Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem*, 232 (2): 243-248. DOI: 10.1006/abio.1995.0014

35. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 105: 121-126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
36. Percário S, Prevention of oxidative stress in renal ischemia-reperfusion syndrome in rats with nutritional antioxidant supplementation. *Rev Nutr*, 23(2):259-267, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000200009>
37. Jeong, D., Kang, S., Shim, J., Lee, E., Jeong, Y., & Seo, K. (2022). Evaluation of ocular surface parameters in dogs with and without meibomian gland dysfunction. *The Veterinary record*, 191(2), e1682. <https://doi.org/10.1002/vetr.1682>
38. Faghihi, H., & Rajaei, S. M. (2022). Tear film breakup time and Schirmer tear test in normal dogs: Effects of age, sex, reproductive status, skull type, and nasolacrimal duct patency. *Veterinary ophthalmology*, 10.1111/vop.13021. Advance online publication.
39. Viñas, M., Maggio, F., D'Anna, N., Rabozzi, R., & Peruccio, C. (2019). Meibomian gland dysfunction (MGD), as diagnosed by non-contact infrared Meibography, in dogs with ocular surface disorders (OSD): a retrospective study. *BMC veterinary research*, 15(1), 443. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2203-3>
40. Hisey EA, Galor A, Leonard BC. A comparative review of evaporative dry eye disease and meibomian gland dysfunction in dogs and humans. *Vet Ophthalmol*. 2023;00:1-15. doi:10.1111/vop.13066
41. Pult, H., & Riede-Pult, B. H. (2012). Non-contact meibography: keep it simple but effective. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association*, 35(2), 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2011.08.003>
42. Eom, Y., Lee, J. S., Kang, S. Y., Kim, H. M., & Song, J. S. (2013). Correlation between quantitative measurements of tear film lipid layer thickness and meibomian gland loss in patients with obstructive meibomian gland dysfunction and normal controls. *American journal of ophthalmology*, 155(6), 1104–1110.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.01.008>
43. Arita, R., Morishige, N., Koh, S., Shirakawa, R., Kawashima, M., Sakimoto, T., & Suzuki, T. (2015) Increased Tear Fluid Production as a Compensatory Response to Meibomian Gland Loss. *Ophthalmology*, 122(5):925-933. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.12.018>
44. Kawahara A, Utsunomiya T, Kato Y, Takayanagi Y. Comparison of effect of nepafenac and diclofenac ophthalmic solutions on cornea, tear film, and ocular surface after cataract surgery: the results of a randomized trial. *Clin Ophthalmol* 2016;10:385–391.
45. Congdon NG, Schein OD, Kulajta P, Lubomski LH, Gilbert D, Katz J. Corneal complications associated with topical ophthalmic use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(4):622–631.

46. Attar, M., Schiffman, R., Borbridge, L., Farnes, Q., & Welty, D. (2010). Ocular pharmacokinetics of 0.45% ketorolac tromethamine. *Clinical ophthalmology* (Auckland, N.Z.), 4, 1403–1408. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S15146>
47. Nezzar H, Mbekeani JN, Noblanc A, Chiambaretta F, Drevet JR, Kocer A. Investigation of antioxidant systems in human meibomian gland and conjunctival tissues. *Exp Eye Res.* 2017;165:99-104. doi:10.1016/j.exer.2017.09.005
48. Farghali HA, AbdElKader NA, AbuBakr HO, et al. Corneal ulcer in dogs and cats: novel clinical application of regenerative therapy using subconjunctival injection of autologous platelet-rich plasma. *Front Vet Sci.* 2021;8:641265. doi: 10.3389/fvets.2021.641265
49. Kormanovski A, Parra F, Jarillo-Luna A, Lara-Padilla E, Pacheco-Yépez J, Campos-Rodriguez R. Oxidant/antioxidant state in tissue of primary and recurrent pterygium. *BMC Ophthalmol.* 2014 Nov 27;14:149. doi: 10.1186/1471-2415-14-149.
50. Ruban VV, Anbukkarasi M, Anand T, Thomas PA, Geraldine P. Oxidative stress in corneal tissue in experimental keratitis due to *Aspergillus flavus*: Effect of topical voriconazole therapy. *Biocatal Agric Biotechnol*, 21: 101323, 2019.
51. Brasnu, E., Brignole-Baudouin, F., Riancho, L., Guenoun, J. M., Warnet, J. M., & Baudouin, C. (2008). In vitro effects of preservative-free tafluprost and preserved latanoprost, travoprost, and bimatoprost in a conjunctival epithelial cell line. *Current eye research*, 33(4), 303–312. <https://doi.org/10.1080/02713680801971857>
52. Galati G, Tafazoli S, Sabzevari O, Chan TS, O'Brien PJ. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 2002;142(1-2):25-41. doi:10.1016/s0009-2797(02)00052-2
53. Nawaz H, Ali A, Rehman T, Aslam A. Chronological effects of non-steroidal anti-inflammatory drug therapy on oxidative stress and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2021;40(5):1767-1778. doi:10.1007/s10067-020-05438-0
54. Dixit, A., Pandey, P., & Dhasmana, D. C. (2020). *In vivo* effects of nonselective, partially selective, and selective non-steroidal anti-inflammatory drugs on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in patients with rheumatoid arthritis: A Clinical Study. *International journal of applied & basic medical research*, 10(3), 167–172. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_344_19



Episcleroceratite nodular granulomatosa em cães

Nodular Episclerokeratitis in Dogs

Dábila Araújo Sonego, Alexandre Pinto Ribeiro, Alexandre Lima de Andrade & Lais Tiemi Tuboni



ABSTRACT

Background: Episcleral inflammation may be assumed to be primary immune-mediated, secondary to intra- or extraocular diseases, or systemic abnormalities. We aimed to report a confirmed and another suspect case of nodular episclerokeratitis (NEK) due to its rarity in the clinical setting and the paucity of case reports in Brazilian literature.

Cases: *Case 1.* Refers to a 7-year-old castrated male, Collie-mixed breed, presenting with epiphora and an irregular ocular surface shape in the left eye (LE). Ophthalmic evaluation of this eye revealed mucoid discharge, conjunctival hyperemia, episcleral injection, and a gelatinous mass in the temporal limbic region. Biomicroscopic evaluation of the anterior chamber, lens, and vitreous was impaired in the LE because of corneal vessels and a mild flare in the aqueous humor. Histopathology of a scleral biopsy revealed the presence of lymphocytes, histiocytes, and some plasma cells. Positive CD3-lymphocytes were observed by immunohistochemistry, confirming the diagnosis of NEK. *Case 2.* Refers to a 8-year-old, spayed female Border Collie with a history of exophthalmos, conjunctival hyperemia, and inability to close the eyelid of the LE. During ophthalmic examination, an irregular episcleral nodule of approximately 9 mm was also found in the temporal limbic region, along with enlargement of episcleral vessels and scleral thinning at the equatorial region. The cornea showed mild and diffuse edema, and white crystal-like deposits were distributed in a band-like fashion at the dorsal aspect. Ultrasonography revealed scleral thinning without evidence of a mass effect arising from the iris, ciliary body, or retrobulbar space. Based on these findings, NEK was suspected. In both cases, the clinical signs reduced significantly after seven days of topical treatment with corticosteroids and cyclosporine.

Discussion: It is assumed that scleral disorders are primarily immune mediated. However, such conditions may develop secondary to ocular trauma (surgery and foreign bodies), *Ehrlichia canis*, and *Onchocerca* spp. Infections and situations were ruled out in both cases. In case 1, additional histological and immunohistochemical findings supported a primary and immune-mediated scleral disease. Although the definitive diagnosis was not confirmed by histology in case 2, one can assume that the episcleral inflammation may have arisen due to an immune-mediated disorder once the eye responded positively to corticosteroid therapy. Additionally, secondary glaucoma was excluded as a possible diagnosis in case 2, because the intraocular pressure of the affected eye was below the reference range for dogs, coupled with the irregular appearance of the episclera, which is not characteristic of canine glaucoma. Moreover, in case 2, because remission of the masses of neoplastic origin after corticotherapy was not expected, the tumor was discarded. NEK has a characteristic proliferative behavior and resistance to topical immunosuppression; clinical recurrence was not observed in the LE of either patient.

who remained on treatment after 60 days of follow-up. Regarding prognosis, one study showed a correlation between cellular contingent and therapeutic responses. The percentage of positive CD79a cells (B-lymphocytes) was significantly higher in cases of episcleritis and NEK, in which a poor response was achieved after topical immunosuppressive treatment. As shown by the veterinary literature and the cases described here, the complete remission of NEK is more common in unilateral cases, as confirmed after a 12-month follow-up. The 2 reported cases are useful for clarifying the common findings, diagnosis, and long-term management of NEK. Scleral abnormalities, such as NEK, must be included in the list of differential diagnoses of glaucoma, neoplasia, and endophthalmitis during ophthalmic examination.

Keywords: keratitis, uveitis, neoplasia, immunosuppression, dog.

Descritores: ceratite, uveíte, neoplasia, imunossupressão, cão.

DOI: 10.22456/1679-9216.124920

Received: 10 June 2022

Accepted: 8 October 2022

Published: 5

November 2022

Setor de Clínica Cirúrgica em Animais de Companhia - Hospital Veterinário (HOVET) & Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil. CORRESPONDENCE: A.P. Ribeiro [alexandre.aleribs@gmail.com]. HOVET - FAVET - UFMT. Av. Fernando Corrêa da Costa n. 2367. CEP 78060-900 Cuiabá, MT, Brazil.

INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias da esclera podem ser de origem primária (idiopática) ou secundária às doenças intra ou extra-oculares, ou ainda devido a alterações sistêmicas [3,4,8,11,13,14]. Em cães, se destacam a episclerite nodular ou difusa, a episclerite nodular granulomatosa (ENG), a fasciite nodular, o histiocitoma fibroso, a conjuntivite proliferativa, a ceratoconjuntivite proliferativa, o pseudotumor e o granuloma do Collie [7,14].

Clinicamente, tanto a episclerite, quanto a ENG se manifestam de forma única ou múltipla, como massas de coloração rósea, cruentas ou elevadas, que crescem a partir do limbo, infiltrando-se no estroma corneal adjacente e na membrana nictitante. Usualmente, as lesões são indolores, mas se houver acometimento uveal, a fotofobia, o blefaroespasma e aoftalmorréia poderão ser notados [7,14]. Demonstrou-

-se que a ENG se manifesta com maior frequência nos Collies com idade média de 3,8 anos [7,14]. Pela histologia, há predominância de histiócitos e linfócitos, acompanhados por vasculite, colagenólise e inflamação granulomatosa [1-5]. Descreveu-se que a ENG canina envolve mecanismos de hipersensibilidade do tipo IV, com o provável envolvimento subjacente de hipersensibilidade do tipo III [4]. Relativamente ao prognóstico, reportou-se que quanto maior for quantitativo de linfócitos B, menores são as chances de cura [2].

O trabalho descreve 2 casos confirmados e um suspeito de ENG, por sua raridade, porquanto reconhecem-se que casos dessa natureza não se encontram disponíveis na literatura brasileira.

CASOS

Caso 1. Um Collie Mestiço, macho, castrado, com idade de 7 anos, foi examinado por queixa de epífora e alteração de contorno da superfície ocular do olho direito. A alimentação compreendia ração comercial balanceada para espécie e o paciente não possuía contato com canino. O tutor negou histórico prévio de ixodidiose. Vacinação e vermifugação estavam atualizadas. O exame físico não revelou alterações dignas de nota, a não ser a formação de cálculos dentários.

Ao exame oftálmico, constatou-se no olho esquerdo (OE) secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, injeção episcleral, além de massa única de aspecto nodular e gelatinoso na região do limbo temporal, medindo aproximadamente 5 mm (Figura 1). O teste da lágrima de Schirmer (TLS) ¹ [Teste de Schirmer] revelou valores normais no olho direito e esquerdo. O paciente apresentou reflexos positivos ao teste de amênia, ofuscamento à luz e reflexos pupilares direto e consensual normais. Pela biomicroscopia com lâmpada de fenda ² [SL-14[®]] o exame da câmara anterior, lente, vítreo do OE foi dificultado devido à formação de vasos corneais e “flare” moderado do humor aquoso (Figura 1A). A pressão intraocular (PIO) ³ [Tonopen[®]] aferida no OE foi de 11 mmHg e de 17 mmHg no olho adelfo sem alteração. O teste de tingimento pela fluoresceína ¹ [fluoresceína strips[®]] foi negativo em ambos os olhos. Aventurei-se, em face dos achados, a possibi-

lidade de se tratar de neoplasia ou ENG. Agendou-se biópsia incisional para o dia seguinte. Após tranquilização com acepromazina ⁴ [Acepran 0,2%[®] - 0,05 mg/kg, IM], procedeu-se a tricotomia da região periocular. Realizou-se a

biópsia escleral incisional, após indução anestésica com propofol⁵ [Propovan® - 5 mg/kg, IV]. Dois fragmentos de aproximadamente 3 mm de diâmetro foram colhidos, mantido em formol tamponado à 10% e submetido à avaliação histológica de rotina pela coloração de Hematoxilina e Eosina [HE]⁶. Não foi necessário realizar sutura dos locais lesionados. Os fragmentos esclerais foram submetidos à técnica de imunoistoquímica para detecção de linfócitos T dotipo CD3⁶ [Anti-human T cell CD3 peptide (n.C7930)], pela técnica biotina-streptavidina-peroxidase. Lâminas de linfonodo poplíteo de cadáveres frescos foram submetidas aos mesmos procedimentos e serviram como controle positivo. Lâminas contendo os fragmentos esclerais de ambos os casos foram submetidas aos mesmos procedimentos, omitindo-se o uso do anticorpo anti-CD3 plasmócitos (Figura 2A). Pela imunoistoquímica foi possível observar inúmeros linfócitos positivos para o anticorpo CD3 (Figura 2B). Com base no padrão anatomopatológico, imunoistoquímico e pela remissão significativa dos sinais clínicos após o uso de corticosteróides e ciclosporina diagnosticou-se quadro compatível com ENG. Dessa forma, manteve-se a terapia instituída previamente por mais 30 dias. Decorridos, aproximadamente, 2 meses do diagnóstico, observou-

-se reorganização da esclera (Figura 1C). Não obstante depósitos de aspecto branco-metálico compatíveis com distrofia corneal, foram notificados na região axial da córnea acometida, leve vascularização da região nasal da córnea e melanose corneal no canto temporo-ventral (Figura 1C). Recomendou-se manter terapia local contínua a base de ciclosporina 0,2%⁸ [Optimmune®], a intervalos regulares de 12 h. Em contato telefônico com os tutores, após 12 meses do diagnóstico, não foi reportado recidiva do quadro.

Caso 2. Examinou-se uma cadela mestiça dара Border Collie, castrada, com 8 anos de idade, com histórico de exoftalmia, hiperemia conjuntival e dificuldade em serrar as pálpebras do olho esquerdo (OE). Segundo o tutor, a paciente alimentava-se normalmente e não havia queixa sobre os demais sistemas.

Ao exame oftálmico, a paciente apresentou reflexo de ofuscamento positivo em ambos os olhos e reflexo pupilar direto (OD) e consensual apenas no olho direito. O TLS¹ [Teste de Schirmer] revelou valores de 21 e 25 mm para os OD e OE, respectivamente. Pela inspeção do OE, notificou-se um nódulo irregular de aproximadamente 9 mm, localizado na região límbica temporal, injeção de vasos episclerais, afinamento escleral na região equatorial (Figura 3A). Ao exame do mesmo olho por biomicroscópio com lâmpada em fenda² [SL-14®], constatou-se edema de córnea leve a difuso em algumas áreas, depósitos levemente esbranquiçados distribuídos em

foram utilizadas como controle negativo. Os cortes foram avaliados à microscopia de luz, sob magnificação de 100x.

Logo após as biópsias, prescreveu-se colírio a base de prednisolona 1%⁷ [Predfort®], a intervalos diários e regulares de 4 h, aliado a unguento a base de ciclosporina 0,2%⁸ [Optimmune®], a intervalos regulares de 12 h. Decorridos 7 dias do tratamento, o paciente foi novamente reexaminado e observou-se regressão significativa da massa límbica. Porém, os sinais compatíveis com uveíte anterior e ceratite não ulcerativa reduziram apenas de forma leve (Figura 1B). Pela coloração de HE, observou-se na biópsia elevado contingente inflamatório caracterizado pela presença de linfócitos e histiócitos, com ocasionais

forma de faixa na região superior da córnea, câmara anterior rasa, leve turbidez do humor aquoso, hifema aderido à margem pupilar inferior e discoria (Figura 3B). À tonometria de applanção, encontraram-se valores de PIO de 10 e 16 mmHg nos OE e OD, respectivamente. O hemograma e dosagem sérica de alanina aminotransferase e da creatinina encontravam-se dentro dos valores de referência. A ultrasonografia ocular⁹ [Ultra Scan A e B®], com transdutor setorial de 20 MHz em modo B, revelou espessamento da região episcleral do olho esquerdo, sem evidência de indentação da coróide ou a presença de neoformações em corpo ciliar ou íris. Segmento posterior e espaço retrobulbar apresentavam-se inalterados. O olho acometido não respondeu à dilatação pupilar após instilação de tropicamida¹⁰ [Mydriacyl®] e fenilefrina⁷ [Fenilefrina 10%®], devido à sinequia parcial, impedindo a fundoscopia. O olho adelfo apresentava esclerose lenticular e distrofia corneal axial. Em face dos achados, suspeitou-se da possibilidade de se tratar de ENG difusa.

O tutor negou permissão para a realização de uma biópsia e, então, foi prescrito um colírio a base de dexametasona 0,1%, polimixina B e neomicina¹⁰ [Maxitrol®] a intervalos diários e regulares de 4 h. No retorno, que ocorreu após 7 dias, observou-se involução do espessamento escleral, ausência de hiperemia conjuntival e episcleral. Ademais, observou-se intensificação dos depósitos estromais, distribuídos em forma de banda na região axial e superior da córnea do olho direito, seclusão pupilar e discoria e formação de catarata difusa. Ao exame clínico, mesmo após o tratamento, o OE não respondia à ameaça devido às desinequias posteriores e a formação de catarata. Todavia, o reflexo pupilar consensual do OE provocou resposta positiva no OD, sugerindo a funcionalidade da retina no olho acometido. Frente à resposta favorável à corticoterapia local foi comunicado ao tutor o diagnóstico de episcleroceratite granulomatosa difusa. Todavia, alertou-se que o diagnóstico definitivo

poderia apenas ser firmado por avaliação histológica de fragmento escleral e que o quadro de correção cirúrgica da catarata não seria indicado devido a possíveis complicações no pós-operatório. O tratamento continuou com o mesmo medicamento, a intervalos regulares de 12 h explicou-se que a doença poderia ser apenas controlada e não tratada. Contato telefônico foi feito decorridos 12 meses e foi informado que o olho estava com aspecto similar ao normal e não apresentava secreção.

DISCUSSÃO

Admite-se que a maioria das condições inflamatórias da esclera e da episclera sejam de origem primária e de origem imunomediada [2,4,7]. No *caso 1*, o diagnóstico definitivo foi firmado com base nos achados clínicos, histológicos e imunoistoquímicos (positividade para linfócitos CD3) [1,2,4]. Embora os 2 cães do presente relato não sejam Collies puros, é reconhecida a predisposição dessa raça para o desenvolvimento de episclerites [7,14].



Figura 1. Imagens fotográficas ilustrando a progressão de um caso de episcleroceratite granulomatosa nodular relativo ao caso 1. A- Notar a escleromalácia na região temporal (seta preta) e a injeção ciliar (seta branca). B- Observar a redução da inflamação do tecido esclero-corneal e redução da massa escleral 7 dias após o uso de unguento a base de ciclosporina a 0,2% e prednisolona 1% colírio. C- A despeito dos depósitos corneais (seta) e do acúmulo de melanócitos corneais logo abaixo, observar a recuperação da transparência, redução no contingente vascular do tecido corneal e recuperação da arquitetura do tecido escleral, 2 meses após o início da terapia.

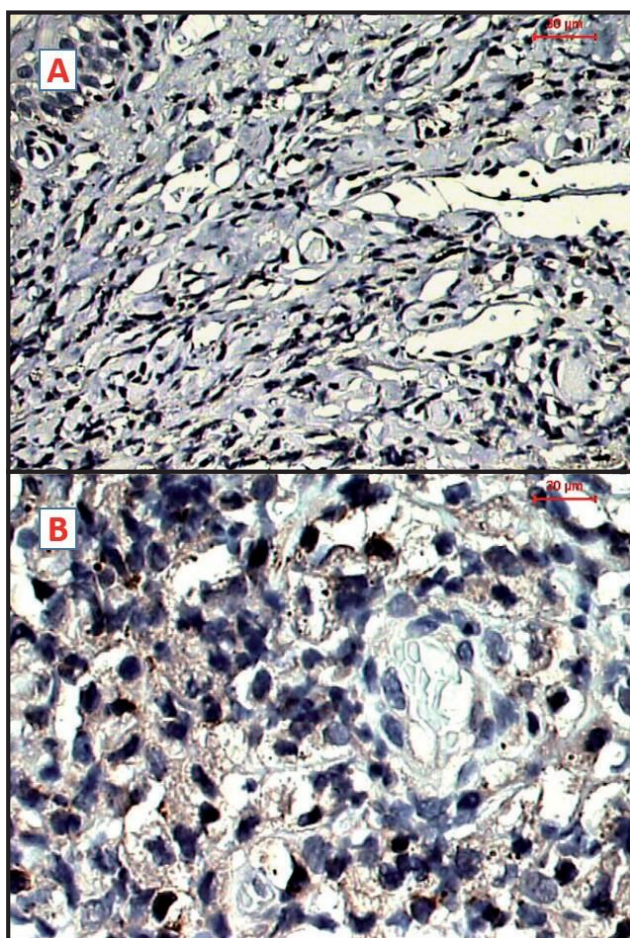


Figura 2. Imagem fotográfica de corte histológico da lesão escleral submetida à imunomarcagem de CD3 do caso 1. A- Reação inflamatória com predomínio de linfócitos e histiócitos com presença ocasional de células plasmáticas. B- É possível observar numerosos linfócitos marcados pelo CD3 (B).

As infecções por *Ehrlichia canis* e *Onchocerca* spp., traumas, cirurgias intraoculares e corpos estranhos podem eventualmente desencadear o quadro [7,8,13,14]. Considerando-se que, no caso 1, o paciente não foi submetido à cirurgia ocular prévia, e que se descartou a presença de infecção local e sistêmica com

base nos achados da biópsia e hematológicos, admitiu-

-se que a ENG fosse de origem idiopática. Embora o diagnóstico definitivo não tenha sido confirmado no caso 2 descrito à luz de exame anatomopatológico, é possível que a inflamação episcleral tenha se originado de reação imunomediada idiopática pela resposta positiva à terapia com corticosteróides. Embora exames parasitológicos não tenham sido realizados a fim de descartar a infecção por *Onchocerca* spp., descartou-se tal causa, pois a melhora clínica dessa parasitose só é observada quando a terapia oral com melarsomina em associação com a ivermectina, aliada a remoção cirúrgica são realizadas [13]. Um estudo demonstrou não haver alterações sistêmicas em cães com episclerite de origem idiopática [2].

Apesar do aspecto exoftálmico, descartou-

-se quadro de glaucoma secundário no caso 2 haja vista que a pressão intraocular do olho acometido se encontrava dentro dos valores normais. Ademais, a deformidade episcleral não é um sinal característico dos glaucomas [9]. Outrossim, não se observa remissão dos sinais clínicos apenas com corticoterapia ou com imunomoduladores [9]. Entretanto, em seres humanos, glaucoma secundário à esclerite anterior, pode se desenvolver devido à inflamação da malha trabecular e elevação da pressão venosa episcleral [12].

Neoplasias primárias como o melanoma límbico devem ser considerados no diagnóstico diferencial das episclerites [7,10,14]. Embora, macroscopicamente, a forma amelanótica dos melanomas possa ser confundida com outras neoplasias, os achados histológicos permitem diagnosticá-lo [6,10]. Melanócitos neoplásicos exibem marcante pleomorfismo, além de nucléolos proeminentes, citoplasma escasso e núcleo grande [6,10].



Figura 3. Imagens fotográficas ilustrando a progressão de um caso de episcleroceratite granulomatosa difusa em um Mestiço de Border Collie relativa ao relato de caso 2. Observar: A- Deformação difusa do tecido episcleral do olho esquerdo, em comparação ao olho direito que apresenta dilatação pupilar farmacológica por tropicamida. B- A injeção episcleral, o edema de córnea leve, a câmara anterior rasa, a miose e o hifema coagulado na margem pupilar ventral. C & D - A redução do tecido episcleral e do processo inflamatório, além de depósitos estromais na região axial da córnea, discoria e catarata.

Neoplasias uveais secundárias também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial, porquanto o tumor intraocular secundário de maior frequência em cães epode apresentar aparência clínica similar às episclerites [6,10]. Linfomas cursam na maior parte dos casos, com hipópio, hifema e linfadenopatia periférica [10]. Em cães, o sarcoma histiocítico é uma neoplasia rara que acomete os olhos e seus anexos, podendo se manifestar de forma isolada como edema episcleral, exoftalmia, sendo confundida com quadros de episclerite [11]. Entretanto, a neoplasia apresenta rápida disseminação sistêmica, prognóstico reservado e é pouco ou não responsiva à terapia imunossupressora [11]. Ademais, histologicamente observa-se elevado pleomorfismo, cariomegalia e anisocariose, que não foi visto no caso 1 [11].

Nos 2 casos apresentados não foi observada recidiva dos quadros clínicos apresentados após acompanhar os pacientes por 60 dias. Relativamente

ao prognóstico, um estudo demonstrou haver relação entre o contingente celular e o resultado terapêutico [2]. A porcentagem de células B (positivas para o anticorpo CD79a) foi significativamente maior em casos de episclerite e de episcleroceratite granulomatosa nodular, em que o tratamento com corticosteróides foi continuado, comparativamente àqueles em que houve resolução e a medicação foi descontinuada [2]. Conforme a literatura, a maioria dos casos que apresentaram resolução e remissão do tratamento se manifestam de forma unilateral, à semelhança dos 2 casos aqui descritos [2].

Com base nos achados dos casos aqui apresentados, conclui-se que a episcleroceratite nodular granulomatosa é afecção de interesse clínico na prática oftalmológica de animais de companhia e merece ser listada como diagnóstico diferencial de outras afecções oculares, de cães, como os glaucomas, as neoplasias e a endoftalmite.

MANUFACTURERS

- ¹Ophthalmo Indústria Farmacêutica. São Paulo, SP, Brazil.
²Kowa Company Ltd. Aichi, Nagoya, Japan.
³Reicht Technologies. San Jose, CA, USA.
⁴Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.
⁵Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. São Carlos, SP, Brazil.
⁶Sigma-Aldrich. Darmstadt, Germany.
⁷Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda. Guarulhos, SP, Brazil.
⁸MDS. Rahway, NJ, USA.
⁹Alcon. Forth Collins, CO, USA.
¹⁰Alcon do Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

Funding. The present work was carried out with support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel-Brazil (CAPES).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 Barnes L.D., Pearce J.W., Berent L.M., Fox D.B. & Giuliano E.A. 2010. Surgical management of orbital nodular granulomatous episcleritis in a dog. *Veterinary Ophthalmology*. 13(4): 251-258.
- 2 Breaux C.B., Sandmeyer L.S. & Grahn B.H. 2007. Immunohistochemical investigation of canine episcleritis. *Veterinary Ophthalmology*. 10(3): 168-172.
- 3 Cazalot G. & Lavergne S.N. 2015. Investigation of anti-myeloperoxidase antibodies in a dog with bilateral necrotizing scleritis. *Veterinary Science*. 2(3): 259-269.
- 4 Day M.J., Mould J.R.B. & Carter W.J. 2008. An immunohistochemical investigation of canine idiopathic granulomatous scleritis. *Veterinary Ophthalmology*. 11(1): 11-17.
- 5 Denk N., Sandmeyer L.S., Lim C.C., Bauer B.S. & Grahn B.H. 2012. A retrospective study of the clinical, histological, and immunohistochemical manifestations of 5 dogs originally diagnosed histologically as necrotizing scleritis. *Veterinary Ophthalmology*. 15(2): 102-109.
- 6 Esson D., Fahrner C.S., Zarfoss M.K. & Dubielzig R.R. 2007. Suspected uveal metastasis of a nail bed melanoma in a dog. *Veterinary Ophthalmology*. 10(4): 262-266.
- 7 Grahn B.H. & Sandmeyer L.S. 2008. Canine episcleritis, nodular episclerokeratitis, scleritis and necrotic scleritis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 38(2): 291-308.
- 8 Komnenou A.A., Mylonakis M.E., Kouti V., Tendoma L., Leontides L., Skountzou E., Dessiris A., Koutinas A.F. & Ofri R. 2007. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*. 10(3): 137-142.
- 9 Martins B.C., Ribeiro A.P., Laus J.L. & Ortiz J.P.D. 2009. Glaucoma. In: Laus J.L. (Ed). *Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e em Gatos*. São Paulo: Roca, pp.151-167.
- 10 Miller P.E. & Dubielzig R. 2005. Ocular tumors. In: Withrow S.A. & Vail D.M. (Eds). *Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn. St. Louis: Saunders, pp.686-697.
- 11 Naranjo C., Dubielzig R.R. & Friedrichs K.R. 2007. Canine ocular histiocytic sarcoma. *Veterinary Ophthalmology*. 10(3): 179-185.
- 12 Urbano A.P., Urbano A.P., Urbano I. & Kara-José N. 2002. Episclerite e esclerite. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 65(5): 591-598.
- 13 Zarfoss M.K., Dubielzig R.R., Eberhard M.L. & Schmidt K.S. 2005. Canine ocular onchocerciasis in the United States: two new cases and a review of the literature. *Veterinary Ophthalmology*. 8(1): 51-57.
- 14 Whitley D. & Hamor R.E. 2021. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Gellat K. (Ed).

Veterinary Ophthalmology. 6th edn. Hobboken: Wiley Blackwell, pp.1080-1172.

<http://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae>

