UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

Laís Fernanda Sargi
Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

Discente: Laís Fernanda Sargi
Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Coorientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

2024

S245a

Sargi, Laís Fernanda
Ação antibacteriana in vitro de lanterna ultravioleta e riboflavina contra microrganismos patogênicos da córnea canina / Laís Fernanda Sargi. -- Jaboticabal, 2024
39 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Oftalmologia Veterinária. 2. Cirurgia de córnea. 3. Riboflavina. 4. Anti-infecciosos. 5. Fototerapia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

AUTORA: LAÍS FERNANDA SARGI
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Data: 03/12/2024 11:18:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

gov.br Documento assinado digitalmente
RENATA MARIA MONCAO DA SILVA
Data: 04/12/2024 04:34:22-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. RENATA MARIA MONÇÃO DA SILVA (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Centro Universitário de Excelência (UNEX) - Feira de Santana/BA

gov.br Documento assinado digitalmente
LILIAN CRISTINA MAKINO
Data: 03/12/2024 13:22:42-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO (Participaçao Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / FCAVR UNESP Registro

gov.br Documento assinado digitalmente
CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI
Data: 05/12/2024 06:49:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI (Participaçao Virtual)
Departamento de Microbiologia e Saúde Animal / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Matão/SP

gov.br Documento assinado digitalmente
ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Data: 06/12/2024 18:35:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de dezembro de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Laís Fernanda Sargi, nascida no Município de Jaboticabal, São Paulo, no dia vinte e seis do mês de novembro de 1993. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná em 2012. Realizou estágios na área de clínica cirúrgica de pequenos animais durante a graduação na instituição de origem, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" no Câmpus de Jaboticabal, SP e Botucatu, SP. Obteve o título de Médica Veterinária em 2016. Entre os anos de 2017 e 2018, em nível de especialização *lato sensu*, participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária da Universidade de Franca (UNIFRAN), São Paulo, especializando-se na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FCAV - Câmpus de Jaboticabal, em 2021. Atualmente é aluna regular do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia Veterinária, nível doutorado, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FCAV - Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes com ênfase em oftalmologia de pequenos animais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro à vida, que me presenteou por ter chegado até aqui, por ter me dado os pais, Edna Maria Curci e Jairo Sargi e meu padrasto Luís Beraldo; os três sempre estão dispostos a me apoiar em todos os meus passos. Agradeço ao meu noivo Victor Mattos, por estar presente, me ouvindo e me apoiando, obrigado pelo carinho e companheirismo. Em lembrança a minha avó que mesmo não estando aqui hoje, a carrego sempre comigo.

Agradeço à professora Paola Castro Moraes, minha orientadora que esteve sempre presente agindo e buscando a melhor forma de resolver tudo, obrigado pela ajuda.

Agradeço à professora Marita Vedovelli Cardozo, pela coorientação e por me acolher nessa jornada e não medir esforços para que as coisas dessem certo.

Agradeço ao Romário, por me acolher no Laboratório de Microbiologia Veterinária e me ensinar pacientemente os caminhos a seguir e ser meu braço direito na execução do presente trabalho.

Agradeço à equipe de atendimento de oftalmologia veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HV) - Unesp - Câmpus de Jaboticabal especialmente ao professor Ivan, a Cinthya, a Pamella e a Larissa que sempre estiveram presentes em todos os momentos, e além de colegas de trabalho se tornaram meus amigos, obrigada pela amizade. E por último, e não menos importante, a Gabriela Madruga que esteve comigo em todos os momentos de angustia e de aflição, sempre me encorajando a explorar o assunto da minha tese de doutorado.

Agradeço à CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil. Código de financiamento 01.

EPÍGRAFE

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar. ”

Chico Xavier

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da eficácia antibacteriana de uma lanterna UV associada a riboflavina em microrganismos patogênicos da córnea canina"**, protocolo nº 2275/2024, sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª PAOLA CASTRO MORAES, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de abril de 2024.

Vigência do Projeto	01/05/2024 a 13/12/2024
Espécie / Linhagem	Não se aplica
Nº de animais	Não se aplica
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

Jaboticabal, 17 de abril de 2024.

Helena C D Brito

Dr.ª Helena Cristina Delgado Brito
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

RESUMO – Este estudo propôs avaliar a atividade antimicrobiana em isolados bacterianos clínicos provenientes de cães com ceratites ulcerativas, empregando a lanterna ultravioleta a 365nm, valor comparável ao utilizado no PACK-CXL. Amostras de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus canis* foram coletadas de casos de ceratite ulcerativa canina. Soluções de riboflavina nas concentrações de 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8% em Mueller-Hinton Broth (MHB) foram preparadas, inoculadas e expostas à luz ultravioleta (365 nm) a uma distância de 3 cm por 15 e 30 minutos. O efeito antimicrobiano foi avaliado pelo método de curva de morte microbiana (time-kill curve). Os dados foram transformados em logaritmo, e a normalidade e homogeneidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A análise estatística incluiu o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn corrigido pelo método de Bonferroni. Os resultados mostraram que *S. pseudintermedius* não apresentou crescimento nas concentrações de 0,4% e 0,2% em 32 horas e nas concentrações de 0,05% e 0,4% em 64 horas com exposição à luz UVA. Reduções significativas foram observadas nas concentrações de 0,4%, 0,2% e 0,1%, começando 8 horas após a exposição. Para *S. canis*, reduções significativas foram observadas na concentração de 0,4% após 32 horas (15UVA) e 16 horas (30UVA), mas essas reduções foram insuficientes para inibir o crescimento bacteriano. *K. pneumoniae* apresentou crescimento reduzido na concentração de riboflavina de 0,2%. *P. aeruginosa* não apresentou resposta às concentrações testadas. A análise comparativa entre 15UVA e 30UVA não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as quatro cepas bacterianas testadas ($p > 0,05$). Conclui-se que a combinação de riboflavina com radiação UVA apresenta um efeito antimicrobiano significativo contra *S. pseudintermedius*, variando conforme a concentração e o tempo de exposição. Em contrapartida, *P. aeruginosa* demonstrou resistência ao tratamento em todas as condições testadas. Já os efeitos sobre *K. pneumoniae* e *S. canis* mostraram-se variáveis, indicando uma resposta limitada, dependente da concentração e do tempo de exposição.

Palavras-chave: cão, ceratite ulcerativa, ceratomalácia, "crosslinking"

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTION OF ULTRAVIOLET LANTERN AND RIBOFLAVIN AGAINST PATHOGENIC MICROORGANISMS OF CANINE CORNEA

ABSTRACT – This study aimed to evaluate the antimicrobial activity in clinical bacterial isolates from dogs with ulcerative keratitis, using ultraviolet light at 365 nm, a value comparable to that used in PACK-CXL. Samples of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus canis* were collected from cases of canine ulcerative keratitis. Riboflavin solutions at concentrations of 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, and 0.8% in Mueller-Hinton Broth (MHB) were prepared, inoculated, and exposed to ultraviolet light (365 nm) at a distance of 3 cm for 15 and 30 minutes. The antimicrobial effect was evaluated using the time-kill curve method. The data were log-transformed, and normality and homogeneity were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Statistical analysis included the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test corrected using the Bonferroni method. The results showed that *S. pseudintermedius* exhibited no growth at concentrations of 0.4% and 0.2% after 32 hours, and at 0.05% and 0.4% after 64 hours of UVA exposure. Significant reductions were observed at concentrations of 0.4%, 0.2%, and 0.1%, starting 8 hours after exposure. For S. canis, significant reductions were observed at a concentration of 0.4% after 32 hours (15UVA) and 16 hours (30UVA), but these reductions were insufficient to inhibit bacterial growth. *K. pneumoniae* exhibited reduced growth at the riboflavin concentration of 0.2%. *P. aeruginosa* showed no response to the tested concentrations. Comparative analysis between 15UVA and 30UVA did not show any statistically significant differences across the four bacterial strains tested ($p > 0.05$). It is concluded that the combination of riboflavin with UVA radiation presents a significant antimicrobial effect against *S. pseudintermedius*, varying with concentration and exposure time. In contrast, *P. aeruginosa* demonstrated resistance to treatment under all tested conditions. The effects on *K. pneumoniae* and *S. canis* were variable, indicating a limited response dependent on concentration and exposure time.

Keywords: dog, ulcerative keratitis, keratomalacia, cross-linking

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Ocorrências oculares são capazes de ocasionar injúria reversível ou irreversível do sistema visual. Entre elas, evidencia-se a ceratite ulcerativa, quadro emergencial que causa dor e perda da acuidade visual dos cães. A úlcera de córnea caracteriza-se pela perda de continuidade do epitélio da córnea que resulta na exposição do estroma subjacente (WHITLEY; HAMOR, 2021). A ceratomalácia (“melting corneano”) ocorre quando há desequilíbrio entre a atividade da colagenase e da anticolagenase, processo que leva à liquefação do tecido estromal da córnea, o que resulta na destruição do tecido lamelar da córnea, normalmente associado à infecção bacteriana. Cães braquicefálicos apresentam elevada predisposição ao desenvolvimento de ceratite ulcerativa, devido a características anatômicas específicas dessas raças, como macroblefaro, lagoftalmia, alterações palpebrais (entrópio e ectrópio), anormalidades ciliares e deficiência quantitativa ou qualitativa do filme lacrimal. Essas condições aumentam a exposição e a vulnerabilidade da córnea, elevando o risco de lesões oculares (WHITLEY; HAMOR, 2021).

A investigação da microbiota bacteriana associada a úlceras de córnea em cães desempenha um papel crucial na compreensão e no tratamento eficaz dessa condição clínica. Entre as bactérias frequentemente identificadas nestes casos, destacam-se o *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. (HEWITT et al., 2020; VERDENIUS et al., 2023). A distinção entre as características das bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus* spp., e as gram-negativas, como *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp., é essencial para direcionar abordagens terapêuticas específicas, tendo em vista as diferenças na estrutura de suas paredes celulares e nas respostas aos tratamentos.

Em pacientes em que o tratamento clínico não é responsivo ou há perda significativa do estroma da córnea, a intervenção cirúrgica é necessária, entretanto pode resultar em cicatrizes significativas da córnea (SOONTORNVIPART et al., 2003).

Atualmente, a terapia fotodinâmica não cirúrgica pode ser empregada como coadjuvante no tratamento de ceratomalácia em cães. Este procedimento envolve a

exposição à luz ultravioleta (UVA) por meio de um sistema chamado "cross-linking", combinado com a aplicação tópica de riboflavina na córnea, promovendo a formação de ligações covalentes entre as fibras de colágeno e a inativação de patógenos por meio da fotossensibilização da riboflavina (POT et al., 2015; SUTER et al., 2022). O “cross-linking” de colágeno na córnea, utilizado para fortalecer sua estrutura, resulta na morte bacteriana através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a exposição à luz ultravioleta. A riboflavina atua como fotossensibilizador, gerando ROS que induzem estresse oxidativo nas bactérias, causando danos irreversíveis às células, comprometendo a integridade da membrana celular, peroxidação lipídica, lesões no DNA e, por fim, levando à morte bacteriana (SHARMA et al., 2019). No entanto, devido ao elevado custo do equipamento, sua aplicação na oftalmologia veterinária ainda não é uma realidade disseminada.

Recentemente, foi publicado estudo utilizando lanterna ultravioleta e riboflavina para realizar “cross-linking”, como método alternativo e econômico ao aparelho. O estudo demonstrou ótimo resultado no qual a cicatrização da córnea foi alcançada em 17 de um total de 21 olhos (LEMBO et al., 2018). Até o momento não há dados publicados sobre a eficiência da lanterna UVA (Nitecore Chameleon CU6®, Guangdong, China) para as principais cepas bacterianas envolvidas nas ceratites ulcerativas de cães. A hipótese deste estudo é sugerir um método alternativo, econômico e efetivo para ser utilizado no tratamento do ”melting” corneano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia da córnea

A túnica mais externa do bulbo ocular é constituída pela córnea, esclera e a região de transição entre elas que é denominada limbo (MILLER, 2017, WHITLEY; HAMOR, 2021). A córnea é um tecido transparente e avascular, sua principal função é de barreira mecânica, proteção para as estruturas intraoculares e refração da luz até a retina para formação da imagem (MILLER, 2017, WHITLEY; HAMOR, 2021). A espessura da córnea central no cão é de 0,558 ± 0,076 mm e a periférica dorsal é

0,617 ± 0,073 mm, dessa forma, é mais delgada na porção axial e mais espessa na periferia (MEEKINS et al., 2021).

Segundo Maggs (2018) a córnea é constituída por quatro camadas: epitélio, estroma, lâmina limitante posterior (membrana de Descemet) e endotélio. O filme lacrimal (FL) pré-corneal, também pode ser considerado uma camada fisiológica mais externa da córnea. O FL é responsável pela manutenção da superfície corneana opticamente uniforme, necessária à adequada refração (OFRI; EKESTEN, 2021). O FL também é responsável pela lubrificação, oxigenação e nutrição da córnea e pela remoção de corpos estranhos (HAMRAH; SAHIN, 2015; MEEKINS et al., 2021). É constituído por três camadas distintas: mucosa, aquosa e lipídica. Atualmente surgiram evidências de que as camadas do FL são interdependentes e se organizam em duas fases, a lipídica e a aquosa-mucosa (RIBEIRO et al., 2008). A camada mucosa é mais superficial, composta por fosfolipídeos produzidas pelas glândulas meibomianas. Esta camada, fornece importante barreira contra a evaporação do FL, uma vez que o óleo é menos denso que a água (WHITLEY; HAMOR, 2021). A camada intermediária ou aquosa é secretada pelas glândulas lacrimais principais, acessória e glândula da terceira pálpebra. Além da água, esta camada contém eletrólitos, glicose, ureia, glicoproteínas e proteínas, incluindo complexos imunológicos (imunoglobulina A e G), albumina, beta-lisina, lisozima e lactoferrina (WHITLEY; HAMOR, 2021). Por último, a camada mais interna é a de mucina, formada principalmente por células da conjuntiva cuja função é facilitar a adesão do filme lacrimal à córnea (WHITLEY; HAMOR, 2021).

O epitélio da córnea, histologicamente, é uma camada estratificada, escamosa e não queratinizada. O epitélio tem aproximadamente 25 a 40µm de espessura (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No cão, o epitélio consiste em única camada de células basais que se encontram sobre uma delgada membrana basal; duas ou três camadas de células poliédricas (alares) e duas ou três camadas de células escamosas não queratinizadas. As células basais estão ligadas à membrana basal pelos hemidesmossomos, que são estruturas de adesão que possuem projeções de microvilosidades que ancoram a camada de mucina profunda do filme lacrimal pré-corneano (MAGGS, 2018; MEEKINS et al., 2021). O epitélio é altamente inervado por nervos sensoriais, sendo um dos tecidos de maiores concentrações de terminações

nervosas. A inervação sensorial da córnea é feita pela divisão oftálmica do nervo trigêmeo que se ramificam em nervos ciliares longos e curtos dentro do estroma anterior e do epitélio (SRIDHAR, 2018).

O estroma constitui 90% da espessura da córnea, é composto por ceratócitos e matriz extracelular (MEC), e juntamente com a esclera é responsável pela rigidez do globo ocular (Junqueira; Carneiro, 2004). O estroma é caracteristicamente transparente devido à organização precisa das fibras estromais e MEC. A MEC é composta por colágenos (Tipo I, III, V, VI e XII) e glicosaminoglicanos (sulfato de queratana, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana), a interrupção deste arranjo regular durante o reparo de feridas forma tecido cicatricial é responsável pela perda de transparência da córnea (MAGGS, 2018; MEEKINS et al., 2021).

A lâmina limitante posterior (membrana de Descemet) é a membrana basal do endotélio, situado entre o estroma posterior e o endotélio, é produzida ao longo da vida pelo endotélio, tornando-se, assim, mais espessa à medida que os indivíduos envelhecem (HERRERA, 2008).

O endotélio da córnea é uma única camada de células que reveste a câmara anterior. As células endoteliais são metabolicamente ativas, há um sistema de bombas de NA/K ATPase que regula o teor de água presente (DAWSON et al., 2011). Suas células com formato hexagonal aumentam de tamanho e diminuem em quantidade com a idade. Cães jovens apresentam 2500 a 2800 células endoteliais por mm^2, e injúrias endoteliais resultam em diminuição desta densidade e conforme a idade, a densidade endotelial pode diminuir gradualmente para 50% ou menos desse valor (MAGGS, 2018; MEEKINS et al., 2021).

2.2 Cicatrização da córnea

A manutenção da integridade da superfície corneana é importante para a sua transparência e funcionalidade óptica (HASSELL; BIRK 2010). A córnea é um tecido avascular e a cicatrização ocorre pela ação combinada de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento gerados posteriormente à injúria. O fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador beta (TGFβ), fator de crescimento de ceratinócitos (KGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas

(PDGF) regulam a cicatrização da córnea, apresentando funções como estimular a síntese de proteína e mitose epitelial e estromal, estimular a síntese de matriz extracelular e quimiotaxia de células inflamatórias, e estimular a síntese de fibronectina, ácido hialurônico e colagenase, respectivamente (WHITLEY; HAMOR, 2021).

Muitas semelhanças são observadas nos processos de cicatrização das células epiteliais, estromais e endoteliais da córnea, bem como diferenças específicas entre elas. As células epiteliais da córnea são constantemente renovadas a cada sete a dez dias pela migração centrípeta de células-tronco límbicas. Lesões no epitélio são reparadas por meio do deslizamento e mitose de células epiteliais (WHITLEY; HAMOR, 2021). Pequenas lesões podem ser reparadas rapidamente nas primeiras 24 horas pela simples migração celular. Uma vez que as células reparam o defeito, elas restabelecem mecanismos de adesão e ocorre intensa atividade mitótica com reconstrução epitelial em múltiplas camadas. (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; WHITLEY; HAMOR, 2021).

Na cicatrização estromal ocorre a síntese e reticulação de colágeno pelos ceratócitos, síntese de proteoglicanos e remodelação gradual da ferida. (EGHRARI et al., 2015.). Durante o reparo da matriz extracelular do estroma corneal, é necessário balanço coordenado entre síntese, degradação e remodelamento, no qual enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) apresentam função importante. As MMPS são produzidas por células inflamatórias, células epiteliais corneais, fibroblastos e microrganismos. As enzimas proteolíticas têm papel importante na degradação e remodelação da matriz extracelular estromal, e sua ação excessiva é controlada por inibidores de proteinases naturais existentes na córnea e no filme lacrimal pré-corneano, como os inibidores de metaloproteinases (OLLIVIER et al., 2007). Em cães, a MMP-2 e a MMP-9 apresentam maior importância em termos de remodelação e degradação do colágeno do estroma da córnea. Na córnea normal e em alguns casos de ceratite ulcerativa, as antiproteinases servem para prevenir a degeneração tecidual excessiva. Nas úlceras de córnea complicadas, no entanto, a combinação de superexpressão de certas proteinases destrutivas e a redução de antiprotease, leva ao este desbalanço entre as MMPs e os inibidores de proteinases,

o que pode levar à rápida degradação do colágeno e de outros componentes da matriz extracelular (WHITLEY; HAMOR, 2021).

Neste contexto, úlceras de córnea superficiais ou não complicadas em cães cicatrizam sem incidentes, uma vez que a ferida da córnea é bem regulada pelo equilíbrio harmônico entre os mecanismos de reparação e degradação da córnea (WHITLEY; HAMOR, 2021). Em contrapartida, úlceras complicadas e/ou infectadas com envolvimento estromal extenso podem, no entanto, podem progredir à perfuração da córnea em menos de 24 horas ou ser sujeita à liquefação, descrita clinicamente como ceratomalácia ou derretimento da córnea (ION; IONASCU; BIRTOIU, 2015, WHITLEY; HAMOR, 2021).

2.3 Ceratites ulcerativas e “melting” corneano

Úlcera de córnea é a enfermidade ocular mais comumente observada em cães na rotina da oftalmologia veterinária, em que há a perda de tecido epitelial com exposição do estroma adjacente, resultando em desconforto ocular intenso, perda visual temporária ou permanente do paciente (LEDBETTER; GILGER, 2013). As úlceras de córnea são classificadas pela profundidade (úlceras de córnea superficiais, estromais, descemetoceles e perfurações); e por sua causa subjacente, dentre elas anormalidades palpebrais, lagoftalmia, triquíases, distiquíases, cílios ectópicos, ceratoconjuntivite seca, corpos estranhos e traumas (JAMES et al., 2023). Os sinais clínicos, de modo geral, variam de acordo com a profundidade, etiologia e cronicidade da lesão. O cão pode apresentar blefarospasmo e dor ocular, secreção ocular (que poderá ser mucosa ou mucopurulenta), hiperemia conjuntival e uveíte reflexa (WHITLEY; HAMOR, 2021).

A ceratite ulcerativa superficial ocorre quando há perda do epitélio da córnea. Trata-se de lesão simples que geralmente cicatriza em até sete dias. As ceratites estromais cursam com a perda do epitélio e de acordo com a porcentagem de perda estromal, podem ser classificadas como intermediárias ou profundas, sendo que usualmente a ocorrência delas advém da progressão da ceratite ulcerativa superficial comumente acompanhadas por infecção bacteriana (TSVETANOVA et al., 2021; SUTER et al., 2018). A descemetocele, por sua vez, caracteriza-se pela lesão

profunda da córnea, em que há perda total de epitélio e do estroma da córnea. Desta maneira, expõe a lâmina limitante posterior (membrana de Descemet), que apesar de ser resistente e elástica pode se romper (HEIDI et al., 2013). A ocorrência da perfuração ocular pode evoluir para endoftalmite e perda permanente da visão do paciente (AMORIM et al., 2018).

Úlceras de córnea em “melting”, também denominada ceratomalácia, necrose liquefativa da córnea e/ou colagenólise estromal aguda são geralmente decorrentes da complicação da ceratite ulcerativa, condição grave que apresenta riscos de cegueira permanente (BREJCHOVA et al., 2010; LEDBETTER et al., 2013). No “melting” corneano o dano estromal é iniciado, principalmente, pela infecção bacteriana secundária, que promove o desequilíbrio entre as metaloproteinases da matriz e do filme lacrimal, pela ativação das proteases bacterianas, resultando na destruição colágenolítica da córnea (OLLIVIER et al., 2007, BREJCHOVA et al., 2010). A cicatrização normal da córnea envolve equilíbrio entre as atividades de proteinases e inibidores de proteinase (WHITLEY; HAMOR, 2021) e, quando as enzimas proteolíticas estão em maior número que os inibidores de proteinase, o estroma da córnea torna-se gelatinoso e liquefeito e a úlcera pode progredir para perfuração da córnea dentro de horas e, portanto, deve ser considerado como emergência oftálmica (FINI; GIRARD et al., 1990; WONG et al., 2003). Esse quadro é facilitado por doenças primárias da superfície ocular, principalmente em raças braquicefálicas, como a deficiência qualitativa e quantitativa do filme lacrimal, ceratite de exposição e anormalidades palpebrais (TSVETANOVA et al., 2021).

As úlceras de córnea em cães frequentemente envolvem a presença de bactérias, com destaque para as Gram-positivas, como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., e as Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* (VERDENIUS et al., 2023; HEWITT et al., 2020) e *Klebsiella pneumoniae* (PRADO et al., 2005). Estudos de Prado et al. (2005), Hindley et al. (2016), e Verdenius et al. (2022), evidenciam a prevalência dessas bactérias, com *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* destacando-se como as espécies mais comuns. A literatura concorda sobre a predominância de bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus* sp., em relação às Gram-negativas (SUTER et al., 2018).

Tsvetanova et al. (2021) identificaram *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* β-hemolítico como microrganismos bacterianos associados à ceratomalácia canina. A *Pseudomonas aeruginosa* é reconhecida por secretar diversas proteases, como a protease alcalina (AP), elastase A (LasA), elastase B (LasB), *Pseudomonas* protease IV (PIV), e *P. aeruginosa* small protease (PASP). Estas proteases são consideradas fatores de virulência, com a PIV degradando proteínas essenciais para a defesa do hospedeiro e o PASP capaz de degradar fibras de colágeno, causando perda do epitélio e erosão da córnea (HOBDEN et al., 2002; O'CALLAGHAN et al., 2019). É importante destacar que a ceratomalácia não infecciosa também pode ocorrer devido à inflamação estéril, embora esse aspecto não esteja completamente descrito na literatura veterinária (TSVETANOVA et al., 2021).

De acordo com a profundidade e a gravidade do defeito estromal, o tratamento do “melting” corneano pode ser clínico ou cirúrgico (ION et al., 2015). O manejo clínico é intensivo e busca interromper a colagenólise por meio agentes anti-colagenase (EDTA, N-acetilcisteína, tetraciclina) em combinação com antimicrobianos e analgesia (BROOKS E OLLIVIER, 2004; GUYONNET et al., 2020). O uso de antimicrobiano deve ser prescrito com base na cultura e testes de suscetibilidade antimicrobiana e frequência efetiva (SHARMA et al., 2019). O uso indiscriminado de antibióticos inadequados ou ineficazes podem evoluir de forma insatisfatória para casos complexos e de difícil manejo, além de contribuir para quadros de resistência bacteriana (PAPICH, 2013). Os enxertos conjuntivais, transplante de membrana amniótica e sintéticas fornecem suporte tectônico para a córnea liquefeita ou perfurada. No entanto, essas técnicas cirúrgicas podem levar a graus variáveis de opacidade da córnea, de acordo com o tamanho, localização e profundidade da lesão (SOONTORNVIPART et al., 2003). Nesse contexto, novas terapias estão sendo exploradas para o tratamento da necrose liquefativa da córnea. Entre essas, destaca-se o cross-linking de colágeno corneano, uma abordagem terapêutica fotodinâmica não cirúrgica que utiliza riboflavina associada à irradiação UVA. Essa técnica aumenta a estabilidade biomecânica do tecido corneano, inativa patógenos e reduz o avanço da colagenólise, mostrando-se promissora tanto em humanos quanto em animais (POT et al., 2014; SPIESS et al., 2014).

2.4 “Crosslinking”

O “crosslinking” (CXL) é a terapia fotodinâmica não cirúrgica que pode ser usada como adjuvante ao tratamento clínico em úlceras da córnea e “melting” corneano. Consiste no foco de irradiação luz ultravioleta A (UVA) emitida pelo sistema CXL focado na córnea após a aplicação tópica com riboflavina (vitamina B2) (POT et al., 2015; SUTER et al., 2022). É usado desde 1999 para o tratamento de ceratocone em humanos (WOLLENSAK *et al*., 2003). Tem sido utilizado na medicina veterinária, principalmente para casos de ceratomalácia (FAMOSE, 2014; SPIESS et al., 2014; FAMOSE, 2015; POT et al., 2014; ZIBURA et al., 2020; SUTER et al., 2022).

As ligações covalentes entre as cadeias de aminoácidos das fibras de colágeno são um dos princípios fisiológicos que asseguram a estabilidade biomecânica da córnea. O CXL leva à reticulação fotoquímica e a formação de pontes químicas entre as fibras de colágeno, aumentando a biomecânica e estabilidade bioquímica da córnea, melhorando sua resistência às enzimas proteolíticas na córnea (WOLLENSAK et al., 2003; SPOERL et al., 2004). A riboflavina (vitamina B2) age como fotoindutor quando exposta à luz UVA (comprimento de onda em 365nm), que resulta na geração de radicais livres, esta reação induz ligações covalentes entre as próprias moléculas de colágeno da córnea e proteoglicanos (KUMAR et al., 2004), processo que conduz à maior rigidez biomecânica (Zhang et al., 2011). O CXL também é capaz de eliminar microrganismos pela ação de radicais livres, induzindo danos genômicos (MARTINS et al., 2008; ALIO et al., 2013). Para essas indicações, a segurança e a eficácia deste procedimento foram amplamente estabelecidas (SEILER et al., 2006; ZIBURA et al., 2020).

Devido ao alto custo do equipamento tradicional, o cross-linking ainda não é amplamente adotado como rotina na oftalmologia veterinária no Brasil. No entanto, estudos têm explorado alternativas viáveis e acessíveis. LEMBO et al. (2018) relataram o uso de uma lanterna ultravioleta de 365 nm como método alternativo e mais econômico para o tratamento de ceratomalácia em cães. O estudo apresentou resultados promissores, com cicatrização da córnea em 17 dos 21 olhos tratados, indicando potencial para aplicação clínica em condições de menor custo.

3. OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar a ação antibacteriana *in vitro* da lanterna UVA (Nitecore Chameleon CU6®, Guangdong, China) em isolados bacterianos de ceratites ulcerativas caninas. O estudo analisou o uso da lanterna em combinação com riboflavina, com ênfase em quatro isolados bacterianos específicos associados a essas ceratites em cães.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus canis* e *Staphylococcus pseudintermedius*. Além disso, foram testadas diferentes concentrações de riboflavina (0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025%) e dois tempos de exposição à lanterna UVA (15 minutos e 30 minutos). A análise incluiu a avaliação da curva de morte bacteriana (time-kill curve) em intervalos de 2, 8, 16, 32 e 64 horas, permitindo determinar a dinâmica da eficácia antimicrobiana ao longo do tempo.

4. REFERÊNCIAS

Alio JL, Abbouda A, Valle DD, Del Castillo JM, Fernandez JA. (2013) Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection** 3:47.

Amorim TM, Ribeiro AP, Ruiz T, Dower NMB, Madruga G, Schroder DC, Rodrigues BE (2018). Impacto do grau de uveíte em diferentes tipos de úlceras de córneas em cães submetidos ao enxerto pediculado de conjuntiva bulbar - 34 casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 70:1233-1239.

Brejchova K, Liskova P, Cejkova J, Jirsova K (2010). Role of matrix metalloproteinases in recurrent corneal melting**. Experimental Eye Research** 90(5):583-590.

Brooks DE, Ollivier FJ (2004). Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **The Veterinary Clinics of North America. Small animal Practice** 34(3):611–622.

Dawson DG, Ubels JL, Edelhauser HF (2011). Cornea and Sclera. In: Levin LA. **Adler's Physiology of the Eye** (11th ed.), Elsevier: Amsterdam, pp. 71-130.

Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD (2015). Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development**. Progress in Molecular Biology and Translational Science** 134:7–23.

Famose F (2014). Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in eight dogs. **Veterinary Ophthalmology** 17(5):358–367.

Famose F (2015). Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in ten cats. **Veterinary Ophthalmology** 18(2):95-104.

Fini ME, Girard MT (1990). Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea**. Investigative Ophthalmology & Visual Science** 31(9):1779–1788.

Galera PD, Laus JL, Oriá AP (2009). Afecções da túnica fibrosa. In**: Oftalmologia Clínica e Cirurgia em Cães e em Gatos**. São Paulo: Roca, pp. 69-96.

Guyonnet A, Desquilbet L, Faure J, Bourguet A, Donzel E, Chahory S (2020). Outcome of medical therapy for keratomalacia in dogs. **The Journal of Small Animal Practice** 61(4):253–258.

Hamrah P, Sahin A (2015). Epitélio do limbo e da córnea. In: Holland EJ, Mannis MJ, Lee WB. **Doenças da superfície ocular: córnea, conjuntiva e filme lacrimal.** Cap. 5, 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Hassell JR, Birk DE (2010). The molecular basis of corneal transparency. **Experimental Eye Research**, 91(3): 326–335. doi: 10.1016/j.exer.2010.06.021

Herrera D (2008). Oftalmologia clínica e cirúrgica em animais de companhia. São Paulo: MedVet.

Hewitt JS, Allbaugh RA, Kenne DE, Sebbag L (2020). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates From Dogs With Ulcerative Keratitis in Midwestern United States. **Frontiers veterinary science** 7:583965.

Hobden JA (2002). *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. **DNA and cell biology** 21(5-6):391–396.

Ion L, Ionascu I, Birtoiu A (2015). Melting keratitis in dogs and cats. **Agriculture and Agricultural Science Procedia** 6:342-349.

James-Jenks EM, Pinard CL, Charlebois PR, Monteith G (2023). Evaluation of corneal ulcer type, skull conformation, and other risk factors in dogs: A retrospective study of 347 cases. **The Canadian veterinary jornal = La revue veterinaire canadienne** 64(3):225–234.

Junqueira LC, Carneiro J (2004). Histologia básica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, Ravanat JL, Cadet J, Goodrich RP (2004). Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. **Photochemistry and Photobiology** 80:15–21.

Ledbetter EC, Gilger BC (2013) Diseases and Surgery of the canine cornea and Sclera. In.: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ (5Eds). **Veterinary Ophthalmology**, John Wiley & Sons: Iowa, v.2, p.976-1049.

Lembo JA, Sapienza J, Wolfer J, Allgoewer I (2018). A rapid and cost-effective method for corneal cross-linking for treatment of canine keratomalacia**. Annual Scientific Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists**, Minneapolis, Minnesota, September.

Maggs DJ. Cornea and sclera. (2018). In: Slatter DN. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology** (6ed.). Elsevier: Missouri, p.184-219.

Martins SA, Combs JC, Noguera G, Camacho W, Wittmann P, Walther R, Cano M, Dick J, Behrens A (2008). Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) *in vitro* for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 49(8):3402–3408.

Meekins JM Rankin AJ, Samuelson DA (2021). Ophthalmic Anatomy. In.: Gellat KN, Gilger BC, Kern TJ (6Eds). **Veterinary Ophthalmology**, John Wiley & Sons: Iowa, v.1, p 41-123.

Miller PE (2017). The Eye and Vision. In Maggs D.J., Miller P.E. e Ofri R. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology** E-Book. Elsevier Health Sciences,

Ofri R, Ekesten B (2021). Optics and Physiology of Vision. In: Gelatt, K. N.; Ben-Shlomo, G.; Gilger, B. C.; Hendrix, D. V. H.; Kern, T. J.; Plummer, C. E. **Veterinary Ophthalmology**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell,. vol. 1, cap. 4, p, 168-224

Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, Kallberg ME, Plummer CE, O'Reilly S, Gelatt, KN, Brooks DE (2007). Proteinases of the cornea and preocular tear film. **Veterinary Ophthalmology** 10(4):199–206.

O'Callaghan R, Caballero A, Tang A, Bierdeman M (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Protease IV and PASP as Corneal Virulence Mediators. **Microorganisms** 7(9): 281.

Papich MG (2013). Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice** 43(5):1091–1107.

Prado MR, Rocha MF, Brito EH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MF, Sidrim JJ (2005). Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Veterinary Ophthalmology** 8(1):33–37.

Pot SA, Gallhöfer NS, Matheis FL, Voelter-Ratson K, Hafezi F, Spiess BM (2014). Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. **Veterinary Ophthalmology** 17(4):250–260.

Pot SA, Gallhöfer NS, Walser-Reinhardt L, Hafezi F, Spiess BM (2015). Treatment of

bullous keratopathy with corneal collagen cross-linking in two dogs. **Veterinary Ophthalmology**. 18(2):168–173.

Ribeiro AP, Brito FLDC, Martins BDC, Mamede F, Laus JL (2008). Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciência Rural** 38:568-575.

Seiler T, Hafezi F (2006). Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. **Cornea** 25(9):1057-9.

Sharma A, Gupta AK, Singh M, Dwivedi DK (2019). Bacterial investigation and antibiogram in corneal ulcers in dogs. **Journal of Animal Research** 9(1):195-199.

Soontornvipart K, Tuntivanich N, Kecova H, Raušer P (2003). Conjunctival pedicle graft in dogs and cats: a retrospective study of 88 cases. **Acta Veterinaria Brno** 72(1):63-69

Spiess BM, Pot SA, Florin M, Hafezi F (2014). Corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of melting keratitis in cats and dogs: a pilot study. **Veterinary Ophthalmology** 17:1–11.

Spoerl E, Wollensak G, Seiler T (2004). Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. **Current eye research** 29(1):35–40.

Sridhar MS (2018). Anatomy of cornea and ocular surface**. Indian Journal of Ophthalmology** 66(2):190–194.

Suter A, Schmitt S, Hübschke E, Kowalska M, Hartnack S, Pot S (2022). The bactericidal effect of two photoactivated chromophore for keratitis-corneal crosslinking protocols (standard vs. accelerated) on bacterial isolates associated with infectious keratitis in companion animals**. BMC Veterinary Research** 18(1):317.

Suter A, Voelter K, Hartnack S, Spiess BM, Pot SA (2018) Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: Associated bacteria and antibiotic susceptibility. **Veterinary ophthalmology** 21(1):66-75.

Tsvetanova A, Powell RM, Tsvetanov KA, Smith KM, Gould DJ (2021). Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5-year clinical and microbiological study (2014-2018). **Veterinary ophthalmology** 21(1):66-75.

Verdenius CY, Broens EM, Slenter IJM, Djajadiningrat-Laanen SC (2023). Corneal stromal ulcerations in a referral population of dogs and cats in the Netherlands (2012-2019): Bacterial isolates and antibiotic resistance. **Veterinary Ophthalmology** 27(1): 7-16.

Whitley RD, Hamor RE (2021). Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Gelatt KN, Ben-Shlomo G, Gilger BC, Hendrix DVH, Kern TJ, Plummer CE, eds. **Veterinary Ophthalmology**. 6th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, pp. 1082-1172.

Wollensak G, Spoerl E, Seiler T (2003). Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen

crosslinking for the treatment of keratoconus. **American Journal of Ophthalmology** 135(5):620–627.

Wollensak G, Spoerl E, Seiler T (2003). Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. **Journal of cataract and refractive surgery** *29*(9):1780–1785.

Wong T, Ormonde S, Gamble G, McGhee CN (2003). Severe infective keratitis leading to hospital admission in New Zealand. **The British journal of ophthalmology** 87(9):1103–1108.

Zhang Y, Conrad AH, Conrad GW (2011). Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. **The Journal of biological chemistry** 286(15):13011–13022.

Zibura AE, Cullen MA, Rutledge H, Lassalle L, Salmon JH, Gilger BC, Westermeyer HD (2020). Optimizing corneal riboflavin administration in ex vivo horse, dog, rabbit, and pig samples for use in corneal collagen cross-linking. **Veterinary Ophthalmology** 23(5): 840–848.

CAPÍTULO 2. Efficacy of the combination of ultraviolet-A light and riboflavin in reducing microorganisms isolated from canine corneas: An *in vitro* study

Laís Fernanda Sargi[1*], Romário Alves Rodrigues2, Pamella Almeida Freire Casemiro[1], Lucas José Luduverio Pizauro[3], Ivan Ricardo Martinez Padua[1], Gabriela Moraes Madruga[4], Cinthya de Andrade Gujanwski[1], Marita Vedovelli Cardozo[2], Paola Castro Moraes[1]

1Department of Veterinary Clinic and Surgery, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brazil.
2Department of Pathology, Reproduction, and Unique Health, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brazil.
3Agricultural and Environmental Sciences, State University of Santa Cruz, UESC, Ilhéus, Brazil
4 Self-employed Veterinarian, Madruga Veterinary Ophthalmology, Uberaba, Brazil.
*Corresponding author. Email address: laissargi@hotmail.com

Abstract

Objectives: To evaluate the antimicrobial action of 365nm ultraviolet light associated with riboflavin on microorganisms isolated from canine ulcerative keratitis in an *in vitro* experimental model.
Methods: Samples of *S. pseudintermedius*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *S. canis* were collected from canine ulcerative keratitis. Riboflavin solutions at concentrations of 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8% in MHB were prepared, inoculated and exposed to ultraviolet light (365nm) at a distance of 3 cm for 15 and 30 minutes. The antimicrobial effect was evaluated using the time-kill curve method. Data were log-transformed, and normality and homogeneity were assessed with Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Statistical analysis included Kruskall-Wallis test followed by Dunn test corrected by Bonferroni method. **Results**: *S. pseudintermedius* exhibited no growth at 0.4 and 0.2% concentrations over 32 hours and at 0.05 and 0.4% over 64 hours with UVA exposure. Significant reductions were observed at concentrations of 0.4, 0.2, and 0.1% starting 8 hours post-exposure. For *S. canis*, significant reductions were noted at 0.4% concentration after 32 hours (15UVA) and 16 hours (30UVA), but these reductions were insufficient to inhibit bacterial growth. *K. pneumoniae* showed reduced growth at the 0.2% riboflavin concentration. *P. aeruginosa* did not exhibit any response to the tested concentrations. Comparative analysis between 15UVA and 30UVA no statistically significant difference across the four tested bacterial strains ($p > 0.05$). **Conclusion:** Riboflavin combined with UVA radiation effectively reduces *S. pseudintermedius* at certain concentrations and exposure times, while *P. aeruginosa* resists treatment. Effects on *K. pneumoniae* and *S. canis* are variable.

Keywords: cross-linking, riboflavin, bacterial pathogens, keratomalacia, UVA

1. INTRODUCTION

Infectious ulcerative keratitis is a commonly observed clinical occurrence in the veterinary ophthalmology practice.[1] Corneal ulcers, known as melting ulcers or by terms such as keratomalacia, liquefactive necrosis of the cornea, or acute stromal collagenolysis, typically develop as complications arising from ulcerative keratitis. Risk factors for infectious keratitis include ocular trauma, lagophthalmos—especially prevalent in brachycephalic breeds—reduced corneal sensitivity, and ocular surface conditions such as keratoconjunctivitis sicca and eyelid abnormalities.[8]

Several bacteria have been implicated in infectious keratitis in dogs and cats, with *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., and *Streptococcu*s spp. being the primary culprits.[2,3,4] Additionally, other microorganisms such as *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus* spp. have also been associated with this condition, with their prevalence varying based on geographic location.[5,6] *P. aeruginosa* and β-hemolytic *Streptococcus* have been identified as predominant bacterial species in canine keratomalacia, representing the most commonly reported isolates in England.[7]

Bacteria of the Gram-positive variety, such as *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., are commonly found in canine keratitis and are frequently associated with less aggressive infection cases. Conversely, Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa* and *Klebsiella* spp., tend to be implicated in more rapid infections, presenting a greater challenge in terms of treatment.[10]

Clinical management typically involves the aggressive administration of antibiotics, lubricants, and protease inhibitors; however, antimicrobial resistance has emerged as an escalating challenge in the field of veterinary ophthalmology.[10]

In cases of severe keratomalacia or corneal perforation, surgical techniques such as conjunctival flaps, amniotic membrane transplantation, or synthetic membrane transplantation are utilized to provide tectonic support.[11,12] However, these procedures may result in varying degrees of corneal opacity, depending on the size, location, and depth of the lesion.13 In this context, exploring novel antimicrobial strategies becomes crucial for maintaining the effectiveness of infectious keratitis treatment.

A non-surgical photodynamic therapy known as Photoactivated Chromophore for Corneal Collagen Crosslinking (PACK-CXL) represents an innovative approach in the treatment of ophthalmological conditions in both humans and animals. This technique combines ultraviolet-A (UV-A) light and vitamin B2 (riboflavin) to enhance the stability of collagen fibers in the cornea and promote the inactivation of corneal pathogens.[14,15] Recently, this technique has found application in veterinary medicine to address cases of keratomalacia.[17,15,18;14;19;20] In crosslinking (CXL), riboflavin, when exposed to ultraviolet-A light (UVA) with a wavelength of approximately 365 nanometers, acts as a photosensitizer. This process results in the formation of covalent bonds between collagen fibers in the cornea, imparting increased biomechanical strength and biochemical stability.[21,22]

The interaction of riboflavin with ultraviolet light induces damage to the genetic material and cell membranes of microorganisms, potentially leading to the demise of bacteria, viruses, parasites, and fungi.[23,24] Following exposure to UVA (λ = 365nm), riboflavin by-products irreversibly penetrate cell membranes, interacting with the nucleic acids of bacteria, causing harm through the action of reactive oxygen species.[25,26,27]

A study conducted by Lembo et al. [28] investigated the use of an ultraviolet flashlight (365 nm) as a cost-effective alternative for treating keratomalacia in dogs, yielding noteworthy results. To date, there are no *in vitro* published data addressing the efficacy of the UVA flashlight (Nitecore Chameleon CU6®, Guangdong, China) as an alternative to the PACK-CXL device in canine ulcerative keratitis. Therefore, the aim of this study was to assess the *in vitro* antibacterial efficacy of the UVA flashlight (365 nm) on bacterial isolates obtained from ulcerative keratitis in dogs.

2. 2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Pathogen Selection

Four distinct bacterial strains were selected from canine ocular samples obtained from ulcerative keratitis. These strains included *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus canis*, and *Staphylococcus pseudintermedius*. They were

previously identified through microbiological and biochemical techniques and confirmed by Matrix Assisted laser desorption ionization-Time of flight (MALDI-TOF).

2.2 Riboflavin Preparation and Dilution

Riboflavin (R9504-25G, Sigma-Aldrich) was diluted in Mueller-Hinton Broth (MHB) at concentrations of 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, and 0.025%. Initially, 0.8 grams of riboflavin were weighed and dissolved in 100 mL of MHB, resulting in an initial solution at a concentration of 0.8%. Subsequently, a 2 mL aliquot was withdrawn. Next, 1 mL of the initial solution was transferred to a Falcon tube containing 1 mL of diluent, and thereafter, serial double dilutions were performed up to 0.025%, ensuring that all dilutions maintained a volume of 1 mL (Figure 1A).

Two tubes with MHB were prepared, one for positive control and one for negative control. Finally, 10 µL was removed from all samples, that is, from the concentrations and controls. Throughout the procedure, riboflavin was protected from exposure to external light.

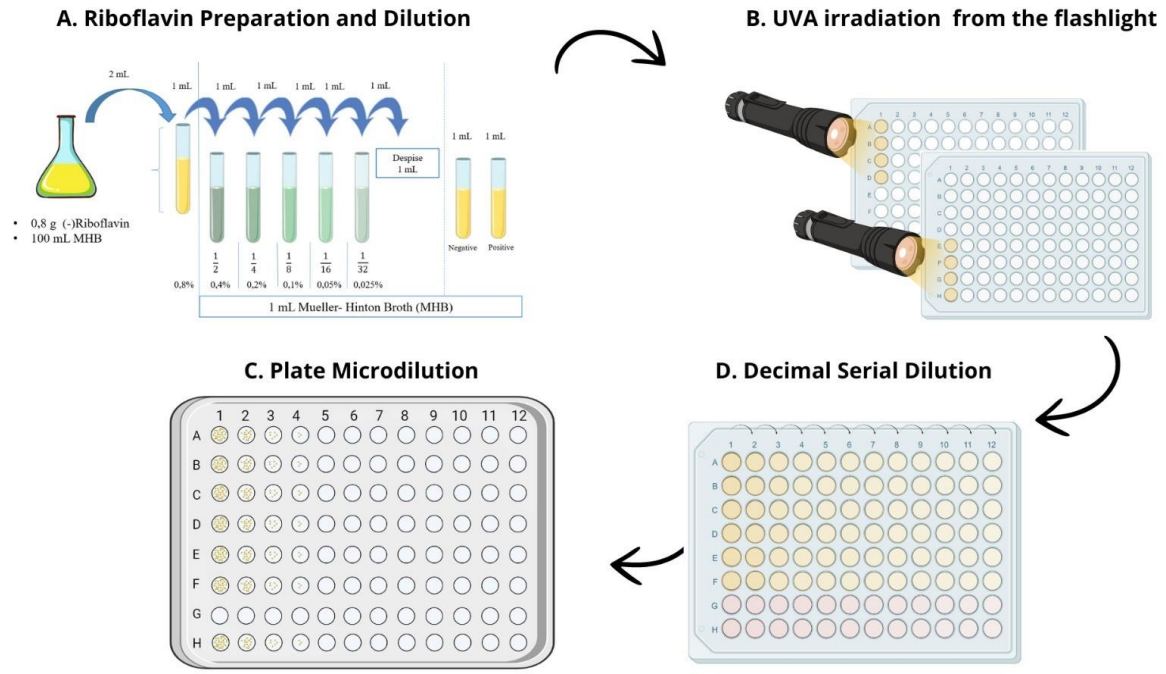

Figure 1. Schematic drawing of the methodology of this study. A) Preparation of riboflavin concentration and dilution, positive and negative control B) Time-kill curve: Elisa plates were evaluated at pre-exposure (T0), exposed to UVA flashlight irradiation

four wells at a time for designated periods (15 and 30-minute) and incubated for post-exposure analysis in hours at times 2 (T2), 8 (T8), 16 (T16), 32 (T32) and 64 (T64). UVA light with a wavelength of 365 nm in the wells of the Elisa plate containing Mueller-Hinton Broth, bacterial sample and riboflavin at concentrations of 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1% and 0.5% and 0.025%, negative and positive controls. C and D) Plate microdilution, decimal serial dilution: at each evaluation time, the tested concentrations were diluted for bacterial counting (CFU)/mL.

2.3 Bacterial Suspension in Riboflavin Solution

Each cryopreserved bacterial isolate was inoculated into Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) and incubated under aerobic conditions at 37°C for 18 hours, followed by incubation on BHI Agar under the same conditions. The bacterial suspension was standardized to 0.1–0.2 absorbance by spectrophotometry (Eppendorf BioPhotometer Plus, OD 600) in a 0.9% sodium chloride solution at pH 7.3. This absorbance is equivalent to 0.5 on the MacFarland scale. After preparation, 10 µL of the bacterial suspension was dispensed into the different concentrations of riboflavin and the positive control.

2.4 UVA Irradiation and Exposure Time

For the UVA irradiation assessment, a CU6 Nitecore® flashlight (Guangdong, China) with a 365 nm wavelength was utilized. The light intensity was measured at 19.1 mW/cm² using a photometer. The flashlight was shone on the ELISA plate from a distance of 3 cm for two durations: 15 and 30 minutes. The administered energy dose was calculated to be 5.763 mW/cm², based on the formula (intensity x exposure time), considering the distance of 3 cm.

Thus, 300 µL of each concentrantion was transferred to an Elisa plate (86 x 128mm) to the UVA light exposure. The flashlight used was designed to illuminate only 4 wells at a time. To achieve this precision, we divided the sample into two separate ELISA plates: the first plate contained higher concentrations (0.8%, 0.4%, 0.2%, and 0.1%), while the second plate contained lower concentrations (0.05%, 0.025%, positive

control, and negative control. This approach allowed the flashlight to directly target the four wells of interest in each plate, preventing light from overlapping onto adjacent wells. This ensured precise and controlled light exposure. The light was directed from a distance of 3 cm from the surface, mimicking light emission on the cornea of dogs with infectious ulcerative keratitis. The entire process was carried out under aseptic conditions and protected from interference by other light sources (Figure 1 B).

2.5 Time-Kill Curve

The time-kill curve was conducted following the protocol published by Blondeau et al.[29] with minor modifications. Microbial growth was assessed through plate microdilution at the following time points (hours): pre-exposure (T0) and post-exposure to UVA light 2 (T2), 8 (T8), 16 (T16), 32 (T32), and 64 (T64), all incubated at 36 ± 1°C (Figure 1B). For each analyzed period, 20 µL from the initial column subjected to light (riboflavin and bacteria concentrations, positive and negative controls) was transferred to another Elisa plate filled with 180 µL of 0.9% saline, conducting decimal serial dilution, followed by total bacterial counting. An aliquot of 5 µL was taken from each well and transferred, in triplicate, to a plate containing Mueller-Hinton Agar (MHA) (Figure 1C and 1D). This process was performed for the 15- and 30-minute exposure periods and for each bacterial species.

The incubation time for each bacterium for plate microdilution and, consequently, total bacterial counting was determined through a pilot study. *P. aeruginosa* was incubated for 9 hours, *S. pseudointermedius* and *K. pneumoniae* for 16 hours, and *Streptococcus canis* for 24 hours, the latter under anaerobic conditions. The counting considered microbial growth between 5 and 30 colonies and was used a colony counter with magnifying glass, with the value multiplied by the respective dilution and the correction factor (200, i.e., 1000 µL/5 µL). The counting result was expressed in Colony Forming Units (CFU)/mL.

2.6 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the R 4.1.2 program (R Core Team, 2017).[30] Means were log-transformed, and normality and homogeneity patterns were assessed using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Based on the obtained data, the Kruskall-Wallis test was conducted, followed by the Dunn test corrected by the Bonferroni test. Values of p less than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS

The *Staphylococcus pseudintermedius* exhibited no growth at concentrations of 0.4% and 0.2% over a 32-hour period and at concentrations of 0.05% and 0.4% over 64 hours when exposed to ultraviolet A (UVA) radiation doses for 15-minute (15UVA) and 30-minute (30UVA), respectively. The positive control also showed statistically significant differences ($p < 0.05$) with higher bacterial growth curves, especially at riboflavin concentrations of 0.025%, 0.05%, 0.2%, and 0.4% at the T2/15UVA and T64/30UVA time points, respectively.

Therefore, it was observed that after treatment, there was a reduction in the population of microorganisms, with a more pronounced decrease at concentrations of 0.4%, 0.2%, and 0.1%, starting 8 hours after exposure. This resulted in a decrease of up to three logs in the count (Figure 2 and Appendix B - Figure B1).

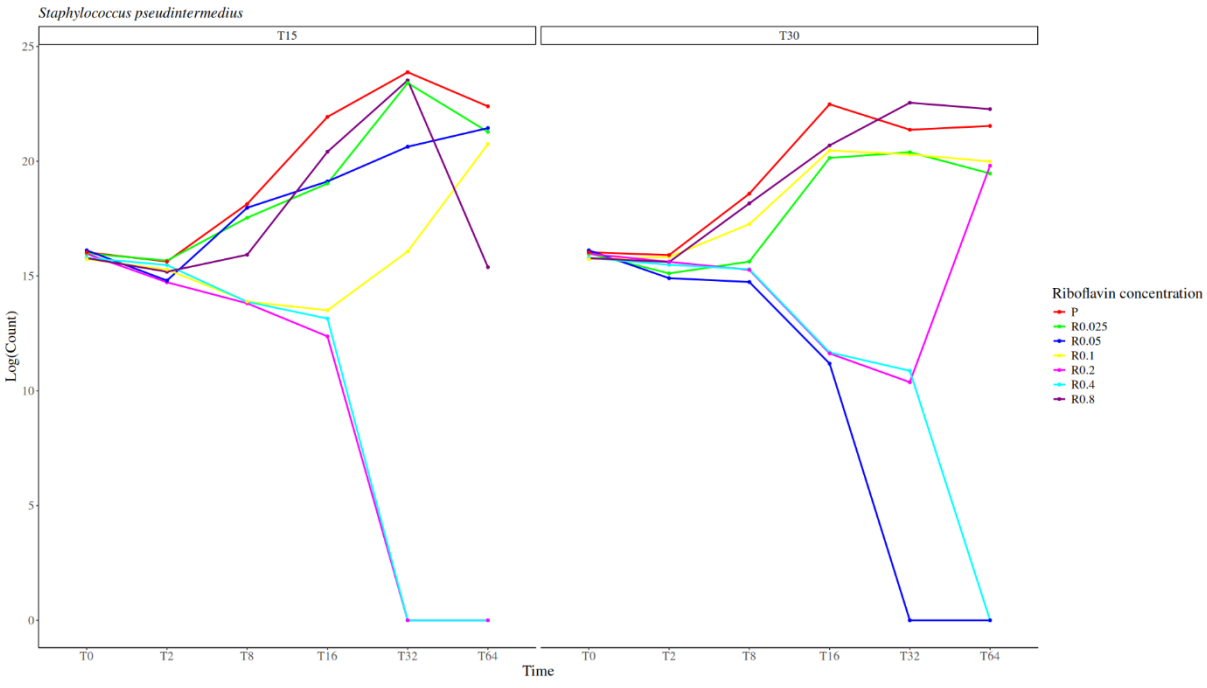

Figure 2. Antibacterial effect of Riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15 (T15) and 30 (T30) minutes in *Staphylococcus pseudintermedius*, exposed to light at T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

In the analysis of *Streptococcus canis*, no discernible growth pattern was observed during the 15 and 30-minute exposure periods. Remarkably, at 15UVA, the most pronounced growth curve occurred in the positive control over the 2 to 64-hour interval, compared to other concentrations (0.025%, 0.2%, and 0.4%), which showed a significant difference ($p < 0.05$) compared to the positive control. However, at 30UVA, concentrations of 0.8% and 0.1% exhibited significantly higher growth ($p < 0.05$) at 8 hours compared to the positive control. The concentration of 0.4% showed a decrease in bacterial count at 32 hours (for 15UVA) and at 16 hours (for 30UVA), both observations significantly differing from the positive control group ($p < 0.05$). Therefore, the results for *S. canis* demonstrated lower bacterial count values at 32 hours for 0.4% (15UVA) and at 16 hours for 0.4% (30UVA), but these were not sufficient to inhibit bacterial growth (Figure 3 and Appendix B - Figure B2).

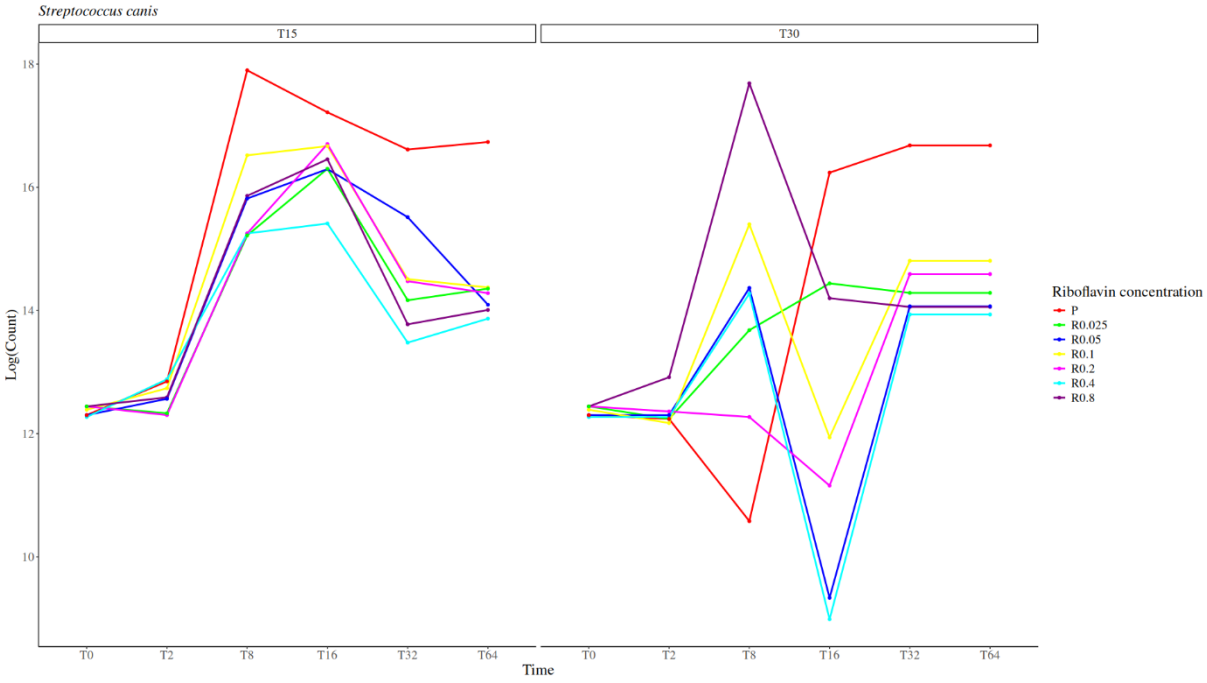

Figure 3. Antibacterial effect of Riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15

(T15) and 30 (T30) minutes in *Streptococcus canis*, exposed to light at T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

In the analyses conducted with *Pseudomonas aeruginosa*, bacterial counts at different concentrations remained high over the 64 hours, with a slight reduction observed at concentrations of 0.025% between 2 to 16 hours (15UVA) and 0.5% at 32 hours (15UVA), which were not statistically significant. In treatments with concentrations of 0.8% and 0.4%, higher counts than the positive control were observed at the early time points of 2 and 8 hours (Appendix A - Figure A1 and Appendix B - Figure B3).

Regarding *K. pneumoniae*, there was no significant variation in its overall growth. However, the growth curve analysis revealed a reduction in bacterial counts at all tested concentrations, particularly at concentrations of 0.025% and 0.2% at the 16-hour time point (30UVA). It is worth noting that only the concentration of 0.2% showed a statistically significant difference compared to the positive control ($p < 0.05$). On the other hand, at concentrations of 0.8% and 0.4%, there was an increase in bacterial growth after 2 and 16 hours (15UVA), although this increase did not reach statistical significance compared to the positive control ($p < 0.05$) (Appendix A - Figure A2 and Appendix B - Figure B4).

Comparative Analysis of 15UVA and 30UVA

Concerning the exposure periods, the results indicated no statistically significant difference between the 15UVA and 30UVA exposure periods for the four tested bacterial strains ($p > 0.05$).

4. DISCUSSION

The results demonstrated variations in the sensitivity of microorganisms isolated from ulcerative keratitis in dogs. Among the tested bacteria, *S. pseudintermedius* and *S. canis* exhibited greater sensitivity to the light emission effect of the UVA flashlight (Nitecore Chameleon CU6®, Guangdong, China) combined with riboflavin, while *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* showed reduced sensitivity under the same conditions.

In vitro studies have unveiled the favorable impacts of crosslinking on ulcerative keratitis in dogs. Three crosslinking protocols (UVA 3 mW/cm² for 60 minutes, UVA 3 mW/cm² for 30 minutes, and UVA 30 mW/cm² for 3 minutes) demonstrated growth inhibition for *Streptococcus spp*., *Staphylococcus spp*., *E. coli*, and *S. canis*. However, in the case of *P. aeruginosa* and *S. pseudintermedius,* a response was observed only after prolonged exposure to 3 mW/cm² for 60 minutes. [31]In human studies, this approach exhibited significant efficacy against S. aureus and *S. epidermidis* but showed reduced effectiveness against *P. aeruginosa*, suggesting a higher efficiency against Gram-positive microorganisms.[21] Consequently, these findings align with the outcomes presented in the current study, indicating that the action of the UVA lantern yields similar effects to those observed with PACK-CXL light.

However, other studies in dogs and humans have noted that no differences in susceptibility to PACK-CXL were found among bacterial genera such as *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *P. aeruginosa*, and *Pasteurella*, as well as *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *S. epidermidis*. In these cases, all these bacterial agents exhibited equivalent sensitivity to their reactions to the treatments tested in their respective studies.[32,20]

In this investigation, strains of *S. canis* and *S. pseudintermedius* were selected to represent Gram-positive bacteria. Significantly, *S. canis* displayed a notable reduction in bacterial count after 16 hours of exposure for 15 minutes, while *S. pseudintermedius* exhibited enhanced efficiency after 30 minutes of exposure. These bacteria, along with other Gram-positive strains (such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, β-hemolytic *Streptococcus*, among others), are commonly found in cases of ulcerative keratitis or keratomalacia. [5,33]

However, the literature is still limited regarding the effects of UVA radiation on this specific group of bacteria. Notably, in human cases of infection following corneal crosslinking procedures, the *S. epidermidis* strain has displayed lower virulence compared to *P. aeruginosa*.[34] This suggests that the increased sensitivity of Gram-positive bacteria to adjuvant therapy may be attributed to their distinct virulence factors.

It is noteworthy that *Pseudomonas spp*. stands out as the primary infectious agent identified in corneal melting samples.[7] *P. aeruginosa* secretes a spectrum of proteases, including alkaline protease, elastase A and B, protease IV, and *P.*

aeruginosa small protease, among others, which are recognized as significant virulence factors contributing to the pathogenesis of ulcerative keratitis. These proteases play a crucial role in degrading essential host defense proteins and collagen fibers, leading to epithelial loss, corneal erosion, and keratomalacia.[35,36] In this study, *P. aeruginosa* demonstrated resistance to the proposed adjuvant therapy. Consequently, the combined action of riboflavin (0.025 – 0.8%) and lantern exposure (15 and 30 minutes) proved inefficacious.

Gram-negative bacteria commonly found in corneal ulcers include *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*, recognized as highly virulent agents with the potential to induce endophthalmitis.[37]

In our investigation of *K. pneumoniae*, minimal reduction in bacterial counts was observed across the tested concentrations compared to the positive control, suggesting that riboflavin had an insignificant impact on bacterial growth.

Importantly, there is a lack of crosslinking studies addressing the behavior of *K. pneumoniae* in response to photodynamic therapy in veterinary ophthalmology. Human studies have indicated that *Klebsiella oxytoca* demonstrates significantly lower sensitivity to PACK-CXL compared to other investigated strains, such as S. aureus, P. aeruginosa e Bacillus subtilis.[38] Additionally, the virulence of *K. pneumoniae* has been associated with the production of cell wall-associated factors and capsules.[41] This underscores the need for further research specific to veterinary ophthalmology to better understand the effectiveness of photodynamic therapy in addressing infections caused by *K. pneumoniae* and similar pathogens.

Several factors can play a crucial role in the varied response of different bacterial species to UVA light and riboflavin.[32] Among these factors, diversity in metabolism, sensitivity to oxidative stress, duration of the cell cycle, cell wall structure, and others stand out.39 In Gram-negative bacteria, the membrane structures are more complex compared to the peptidoglycan layer found in Gram-positive bacteria. This complexity may impede the penetration of riboflavin by-products into the bacterial cell.[25]

In a study involving Gram-positive bacteria, *S. epidermidis*, and *S. aureus*, it was observed that the survival rate of *S. epidermidis* was significantly lower than that of *S. aureus* when subjected to the same UVA light parameters. This difference may

be associated with the formation of a bacterial biofilm, acting as a barrier preventing the penetration of the photosensitizer and, consequently, the activation of riboflavin.[40]

Understanding these nuanced responses among bacterial species is important for tailoring photodynamic therapy approaches, especially in veterinary ophthalmology, where the effectiveness of the treatment can be influenced by the specific characteristics of the infecting pathogens. Further research exploring the intricate interactions between UVA light, riboflavin, and diverse bacterial species is needed to refine and optimize photodynamic therapy protocols for ocular infections in veterinary practice.

The effect of riboflavin was evaluated at different concentrations (0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, and 0.8%). It was observed that the sensitivity of bacterial strains to UVA radiation varied considerably depending on the concentration of the photosensitizer. *P. aeruginosa* showed a slight reduction in bacterial count at concentrations of 0.025% between 2 and 16 hours and at 0.5% in 32 hours (15UVA). However, at concentrations of 0.8% and 0.4%, higher counts than the positive control were observed in the early phases of 2 and 8 hours. The *K. pneumoniae* strain also exhibited a variable response to riboflavin concentrations, with a statistically significant reduction observed only at 0.2%. *S. pseudintermedius* showed a decline in its population, more pronounced at concentrations of 0.4%, 0.2%, and 0.1%. For *S. canis*, lower bacterial counts were recorded at 32 hours with 0.4% (15UVA) and at 16 hours with 0.4% (30UVA). It is noted that solutions of 0.8% were not affected by photodynamic therapy. It is suggested that higher concentrations of riboflavin may inhibit the penetration of UVA light into the solution, compromising its activation and, consequently, its action against all microorganisms, as observed in another study.[42]

It is noteworthy that sensitivity to oxidative stress induced by riboflavin and UV light remains unaffected by antibiotic resistance.[39,21] In this context, Riboflavin/UVA therapy emerges as a viable alternative for treating ulcerative keratitis caused by antibiotic-resistant microorganisms. The results of the current study showcased greater efficacy against Gram-positive microorganisms tested *in vitro*. However, it has not been evaluated *in vivo* and in combination with other commonly employed therapies that contribute positively to the clinical response, such as antibiotics, lubricants, and metalloproteinase inhibitors.

In *in vivo* studies using PACK-CXL for the treatment of ulcerative keratitis in dogs and cats, several protocols have been documented. These include UVA irradiance of 3 mW/cm² for 30 minutes[14,15] and an accelerated protocol with UVA irradiance of 30 mW/cm² administered for 3 minutes.[17,18] It is important to note that the flashlights used in the study do not allow for power adjustment, which limits their application.

Increasing the exposure time to UVA light from 15 to 30 minutes, with the same power setting (light intensity), did not provide a statistically significant difference in the results of this study. A similar finding was reported in the study by Large et al. (2021), where there was no significant difference in the areas of bacterial growth inhibition between the 3-minute and 30-minute UVA/riboflavin protocols. This result diverges from findings in the literature regarding the use of PACK-CXL, which suggests that longer exposure periods to UVA light are more effective in eradicating bacteria.[32,42] Further studies are needed to investigate protocols and exposure times regarding treatment effectiveness. Exploring a wider range of experimental conditions can provide additional insights into the influence of different UVA/riboflavin exposure times on bacterial growth inhibition.

The *in vitro* experimental model, simulating the application of the flashlight and riboflavin in a fluid column, reveals a significant limitation by deviating substantially from the clinical scenario found in corneas with edema and inflammatory infiltrate, characterized by increased thickness. Additionally, aspects related to the rigidity of the collagen tissue were not considered, representing another notable limitation.

5. CONCLUSION

The results indicate that the combination of riboflavin and UVA radiation can effectively reduce the count of *S. pseudintermedius*, especially at concentrations of 0.4% and 0.2% during 32 hours with 15-minute exposure, and at concentrations of 0.05% and 0.4% during 64 hours with 30-minute exposure. However, *P. aeruginosa* was resistant to the treatment, and the effects on *K. pneumoniae* and *S. canis* were variable, with some concentrations showing significant reductions but insufficient to

completely inhibit bacterial growth. Further studies on the efficacy of using the flashlight for stromal collagen effects are warranted.

6. REFERENCES

1. O'Neill DG, Lee MM, Brodbelt DC, Church DB, Sanchez RF. Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. Canine Genet Epidemiol. 2007;4:1–12. doi: 10.1186/s40575-017-00455

2. Ekapopphan D, Srisutthakarn A, Moonarmart W, Buddhirongawatr R, Bangphoomi N. Identification and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from severe corneal ulcers of dogs in Thailand. J Vet Med Sci. 2018;80(8):1259-1265. doi: 10.1292/jvms.18-0062

3. Verdenius CY, Broens EM, Slenter IJM, Djajadiningrat-Laanen SC. Corneal stromal ulcerations in a referral population of dogs and cats in the Netherlands (2012-2019): Bacterial isolates and antibiotic resistance. Vet Ophthalmol. doi:10.1111/vop.13080. 2023

4. Hewitt JS, Allbaugh RA, Kenne DE, Sebbag L. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates From Dogs With Ulcerative Keratitis in Midwestern United States. Front Vet Sci. 2020; 7:583965. doi:10.3389/fvets.2020.583965

5. Tolar EL, Hendrix DVH, Rohrbach BW, Plummer CE, Brooks DE, Gelatt KN. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993–2003). J Am Vet Med Assoc. 2006; 228(1):80-85. doi: 10.2460/javma.228.1.80

6. Prado MR, Rocha MF, Brito EH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MF, Sidrim JJ. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. Vet Ophthalmol. 2005; 8(1):33–37. doi: 10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x

7. Tsvetanova A, Powell RM, Tsvetanov KA, Smith KM, Gould DJ. Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5-year clinical and microbiological study (2014-2018). Vet Ophthalmol. 2021; 24(3):265-278. https://doi.org/10.1111/vop.12885

8. Martin de Bustamante M.G., Good K.L., Leonard B.C., Hollingsworth S.R., Edwards S.G., Knickelbein K.E., Cooper A.E., Thomasy S.M., Maggs D.J. Medical management of deep ulcerative keratitis in cats: 13 cases. J Feline Med Surg. 2019;21(4):387–393. doi:10.1177/1098612X18770

9. Whitley RD, Hamor RE. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Veterinary Ophthalmology. 6th ed. Gelatt KN, Ben-Shlomo G, Gilger BC, Hendrix DVH, Kern TJ, Plummer CE, editors. Wiley-Blackwell; Hoboken; 2021. p. 1082-1172.

10. Papich MG. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2013; 43(5):1091-1107. doi:10.1016/j.cvsm.2013.04.006

11. Dorbandt DM, Moore PA, Myrna KE. Outcome of conjunctival flap repair for corneal defects with and without an acellular submucosa implant in 73 canine eyes. Vet Ophthalmol. 2015; 18(2):116-122. doi:10.1111/vop.12193

12. Costa D, Leiva M, Sanz F, Espejo V, Esteban J, Vergara J, Díaz C, Huguet E, Cairó M, Ríos J, Peña MT. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. Vet Ophthalmol. 2019; 22(5):695-702. doi:10.1111/vop.12643

13. Soontornvipart K, Tuntivanich N, Kecova H, Raušer P. Conjunctival pedicle graft in dogs and cats: a retrospective study of 88 cases. Acta Vet Brno. 2003; 72(1):63-69. doi:10.2754/avb200372010063

14. Pot SA, Gallhöfer NS, Matheis FL, Voelter-Ratson K, Hafezi F, Spiess BM. Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. Vet Ophthalmol. 2014; 17(4):250-260. doi:10.1111/vop.12090

15. Spiess BM, Pot SA, Florin M, Hafezi F. Corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of melting keratitis in cats and dogs: a pilot study. Vet Ophthalmol. 2014; 17(1):1-11. doi:10.1111/vop.12027

16. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. Am J Ophthalmol. 2003;135(5):620-627. doi:10.1016/s0002-9394(02)02220-1

17. Famose F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in eight dogs. Vet Ophthalmol. 2014; 17(5):358-367. doi:10.1111/vop.12085

18. Famose F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in ten cats. Vet Ophthalmol. 2015; 18(2):95-104. doi:10.1111/vop.12112

19. Zibura AE, Cullen MA, Rutledge H, Lassalle L, Salmon JH, Gilger BC, Westermeyer HD. Optimizing corneal riboflavin administration in ex vivo horse, dog, rabbit, and pig samples for use in corneal collagen cross-linking. Vet Ophthalmol. 2020; 23(5):840-848. doi: 10.1111/vop.1280

20. Suter A, Schmitt S, Hübschke E, Kowalska M, Hartnack S, Pot S. The bactericidal effect of two photoactivated chromophore for keratitis-corneal crosslinking protocols (standard vs. accelerated) on bacterial isolates associated with infectious keratitis in companion animals. BMC Vet Res. 2022; 18(1):317. doi:10.1186/s12917-022-03397-z.

21. Martins S.A., Combs J.C., Noguera G., Camacho W., Wittmann P., Walther R., Cano M., Dick J., Behrens A. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) *in vitro* for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci.2008; 49(8):3402–3408. doi:0.1167/iovs.07-1592.

22. Alio JL, Abbouda A, Valle DD, Del Castillo JM, Fernandez JA. Corneal cross-linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. J Ophthalmic Inflamm Infect. 2013; 3(1):47. doi:10.1186/1869-5760-3-47

23. Sharma A, Sharma R, Chander J, Nirankari VS. *In vitro* antimicrobial efficacy of riboflavin, ultraviolet-A radiation, and combined riboflavin/ultraviolet-A radiation on ocular pathogens. Taiwan J Ophthalmol. 2023; 13(1):21-27. doi: 10.4103/tjo.tjo_28_21

24. Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, Goodrich RP. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies. Photochem Photobiol. 2014; 90:957-964. doi: 10.1111/php.12311

25. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004; 3:43, 650. doi: 10.1039/B311900A

26. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, Ravanat JL, Cadet J, Goodrich RP. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. Photochem Photobiol. 2004; 80:15-21. doi:10.1562/2003-12-23-RA-

27. Tabibian D, Richoz O, Hafezi F. PACK-CXL: Corneal Cross-linking for Treatment of Infectious Keratitis. J Ophthalmic Vis Res. 2015; 10(1):77–80. doi:10.4103/2008-322X.156122

28. Lembo JA, Sapienza J, Wolfer J, Allgoewer I. A rapid and cost-effective method for corneal cross-linking for treatment of canine keratomalacia. In: Annual Scientific

Meeting Of The American College Of Veterinary Ophthalmologists; September 2018; Minneapolis, Minnesota.

29. Blondeau JM, Borsos S, Blondeau LD, Blondeau BJ. *In vitro* killing of *Escherichia co*li, *Staphylococcus pseudintermedius*, and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. Vet Microbiol. 2012;155(2-4):284-290. doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.015

30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2020. Available from: https://www.R-project.org/.

31. Large TP, Mack S, Villiers E, Oliver J. *In vitro* susceptibility of canine corneal bacterial pathogens to three cross-linking protocols. Vet Ophthalmol. 2023;26:134-142. doi: 10.1111/vop.13425

32. Makdoumi K, Mortensen J, Crafoord S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. Cornea. 2010;29(12):1353-1358. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181d36e01

33. Wang Z, et al. Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. Front Vet Sci. 2022;9:903633. doi: 10.3389/fvets.2022.903633

34. Abbouda A, Abicca I, Alio JL. Infectious Keratitis Following Corneal Crosslinking: A Systematic Review of Reported Cases: Management, Visual Outcome, and Treatment Proposed. Semin Ophthalmol. 2014;1-7. doi: 10.3109/08820538.2014.96217

35. Hobden JA. *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. DNA Cell Biol. 2002;21(5-6):391-396. doi:10.1089/10445490260099674

36. O'Callaghan R, Caballero A, Tang A, Bierdeman M. *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Protease IV and PASP as Corneal Virulence Mediators. Microorganisms. 2019;7(9):281. doi:10.3390/microorganisms7090281

37. C Chee SP, Jap A. Endogenous endophthalmitis. Curr Opin Ophthalmol. 2001;12(6):464–470. doi:10.1097/00055735-200112000-00012

38. Kling S, Hufschmid FS, Torres-Netto EA, Randleman JB, Willcox M, Zbinden R, Hafezi F. High Fluence Increases the Antibacterial Efficacy of PACK Cross-Linking. Cornea. 2020;39(8):1020-1026. doi:10.1097/ICO.0000000000002335

39. Makdoumi K, Bäckman A. Photodynamic UVA-riboflavin bacterial elimination in antibiotic-resistant bacteria. Clin Exp Ophthalmol. 2016;44(7):582-586. doi: 10.1111/ceo.12737

40. Shen J, Liang Q, Su G, Zhang Y, Wang Z, Liang H, Baudouin C, Labbé A. Effect of Ultraviolet Light Irradiation Combined with Riboflavin on Different Bacterial Pathogens from Ocular Surface Infection. J Biophys. 2017;2017:3057329. doi:10.1155/2017/3057329

41. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Keynan Y, Russo TA. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumonia*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(6):981–989. doi:10.1007/s10096-011-1396-6

42. Bäckman A, Makdoumi K, Mortensen J, Crafoord S. The efficiency of cross-linking methods in eradication of bacteria is influenced by the riboflavin concentration and the irradiation time of ultraviolet light. Acta Ophthalmol. 2014;92(7):656–661. doi:10.1111/aos.12301

APÊNDICE

APPENDIX A – Curves of Antibacterial Effect of Riboflavin Photoactivated by UVA Light on Microorganisms of Canine Ulcerative Keratitis

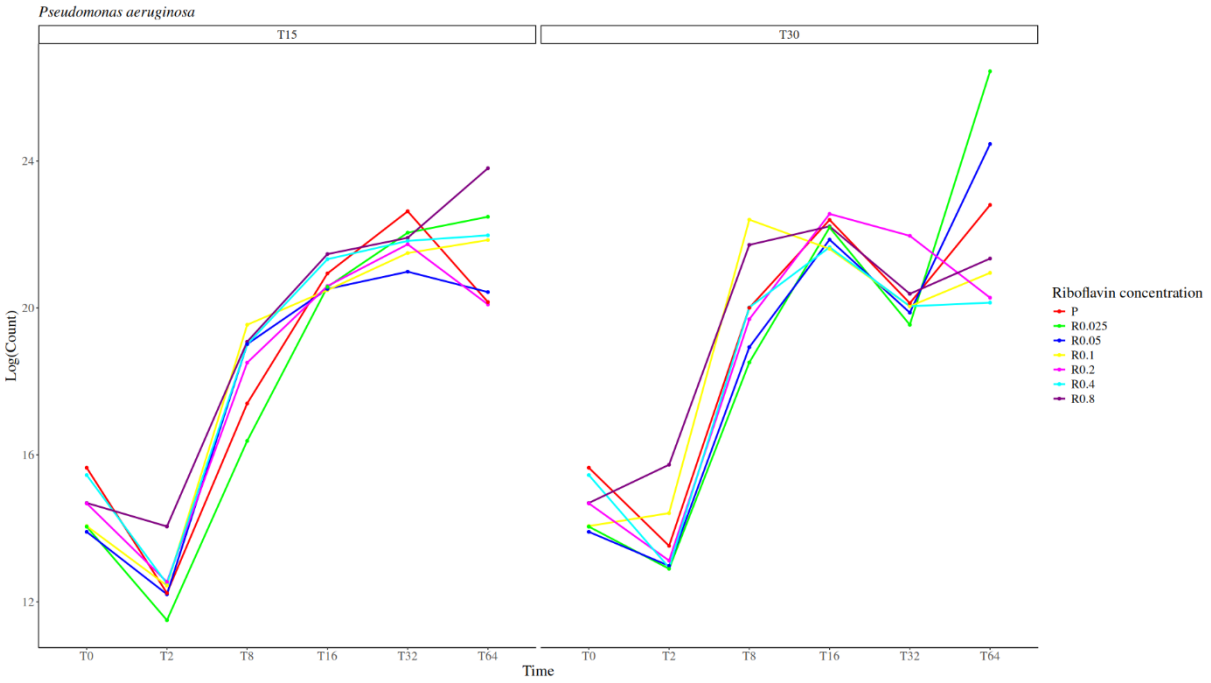

Figure A1. "Boxplot" illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Pseudomonas aeruginosa*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

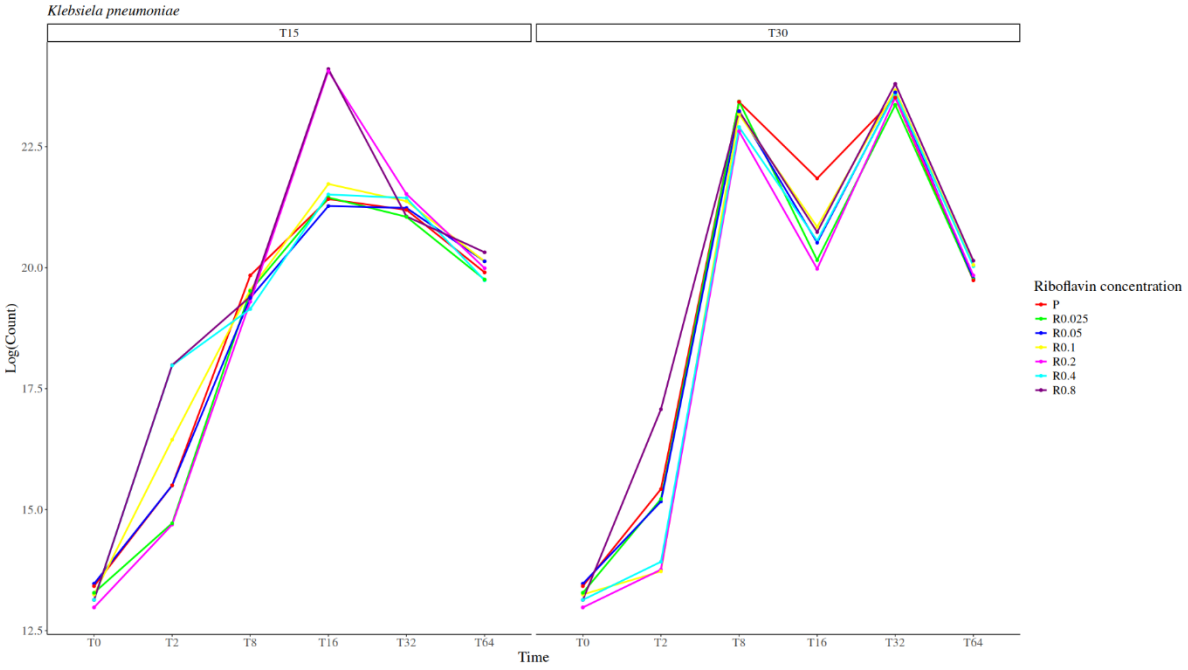

Figure A2. Antibacterial effect of Riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15

(T15) and 30 (T30) minutes in *K. pneumoniae*, exposed to light at T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

APPENDIX B – "Boxplots" Illustrating the Variation in Antibacterial Activity of Riboflavin Photoactivated on Microorganisms of Canine Ulcerative Keratitis

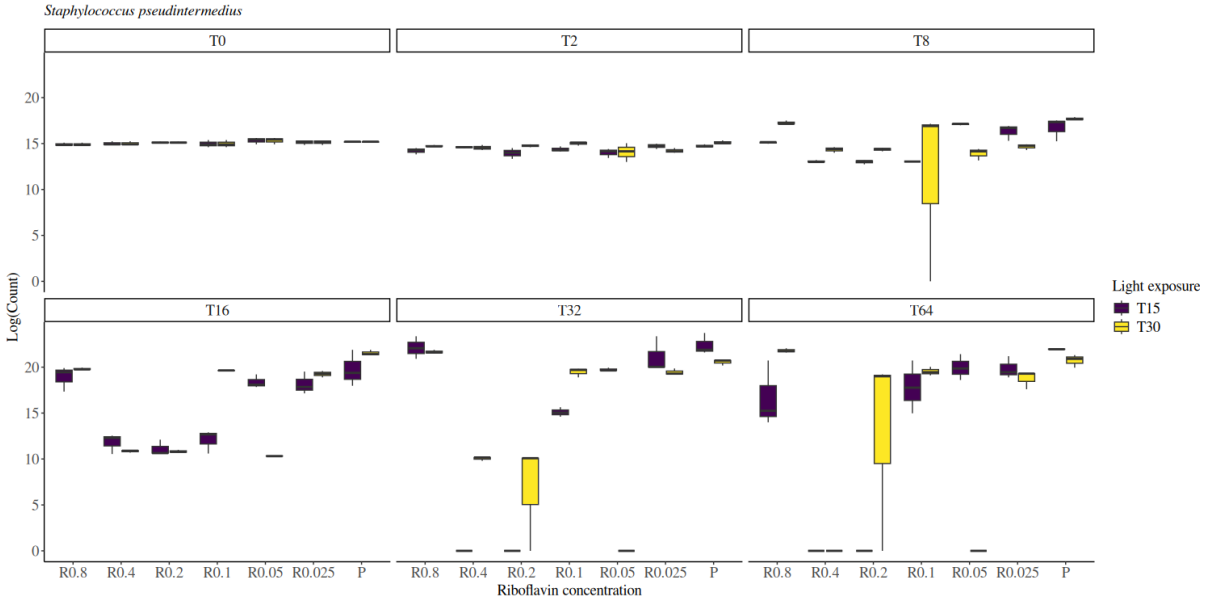

Figure B1. "Boxplot" illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Staphylococcus pseudintermedius*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

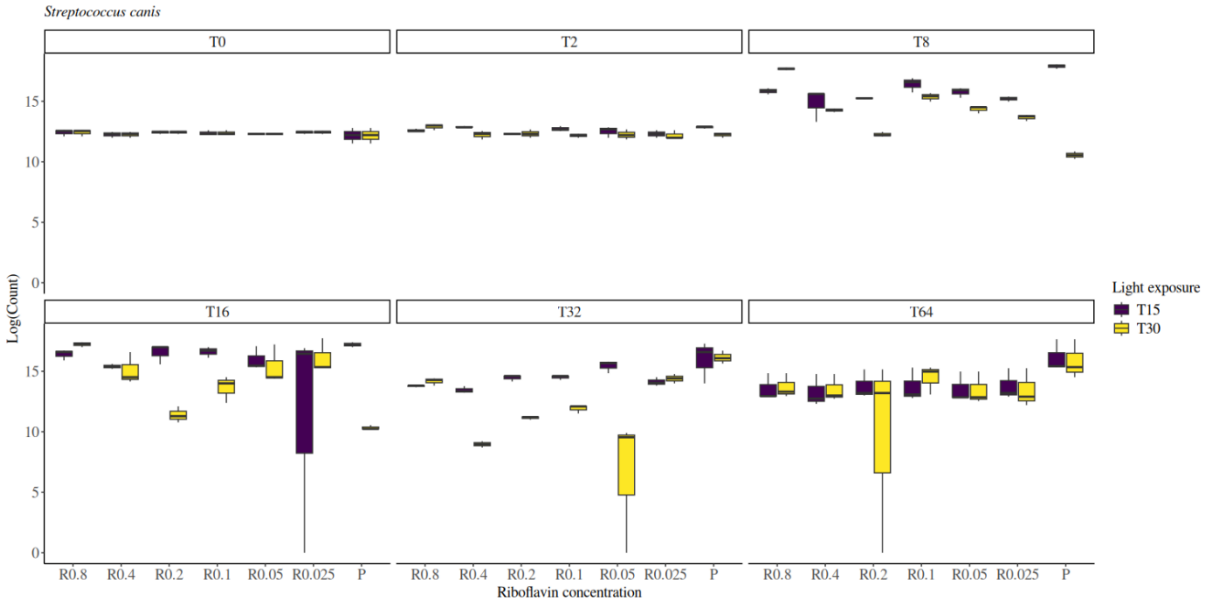

Figure B2. “Boxplot” illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Streptococcus canis*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

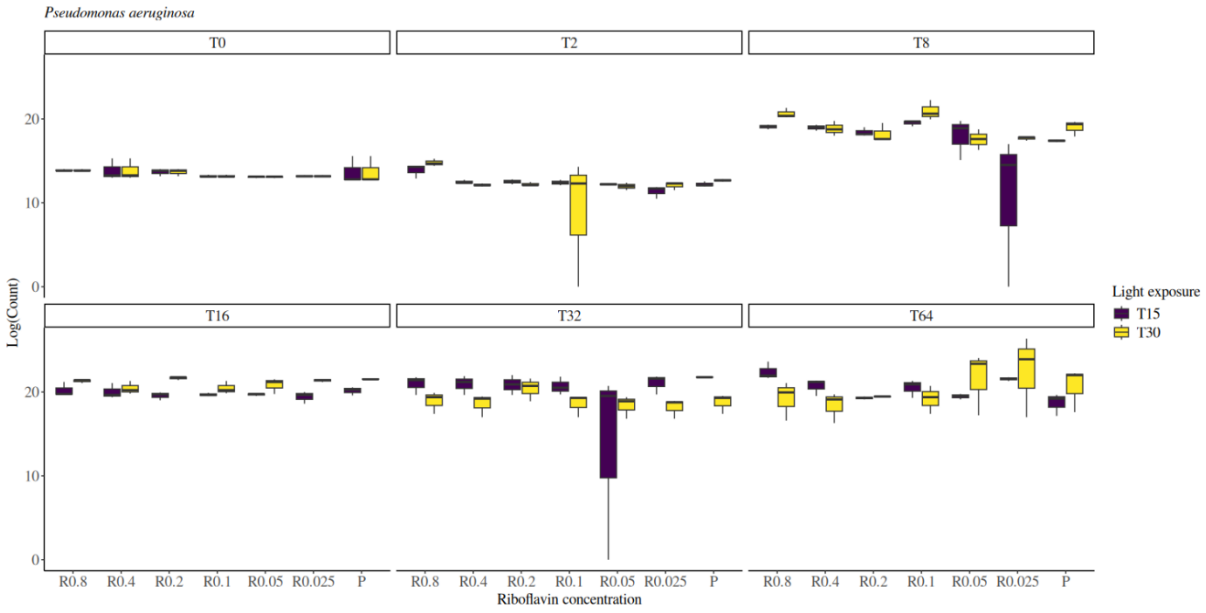

Figure B3. Antibacterial effect of Riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15 (T15) and 30 (T30) minutes in *Pseudomonas aeruginosa*, exposed to light at T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

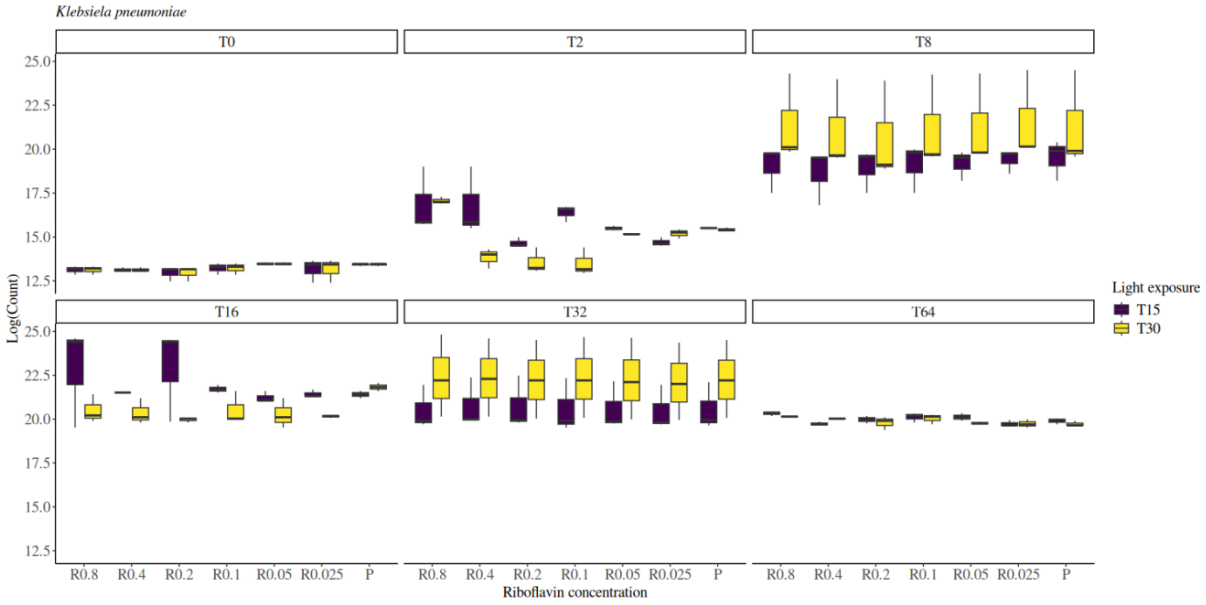

Figure B4. “Boxplot” illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Klebsiella pneumoniae*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64.

[1] Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista *Veterinary Ophthalmology* e encontra-se em avaliação para publicação.