



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM CÃES DA RAÇA
SHIH TZU CONSIDERADOS SAUDÁVEIS PELOS TUTORES**

Júlia Batistella Avancini

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula Diniz Galera

BRASÍLIA - DF

Novembro/2016



JULIA BATISTELLA AVANCINI

**TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM CÃES DA RAÇA
SHIH TZU CONSIDERADOS SAUDÁVEIS PELOS TUTORES**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula Diniz Galera

BRASÍLIA - DF

Novembro/2016

BAV946 Batistella Avancini, Júlia
t TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM CÃES DA RAÇA
SHIH TZU CONSIDERADOS SAUDÁVEIS PELOS TUTORES /
Júlia Batistella Avancini; orientador Paula Diniz
Galera. -- Brasília, 2016.
27 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --
Universidade de Brasília, 2016.

1. Cristalização da lágrima. 2. Alterações
oftálmicas. 3. Shih Tzus. 4. Síndrome Ocular
braquicefálica. 5. STEPanizer stereology tool. I.
Diniz Galera, Paula, orient. II. Título.

Nome do Autor: Júlia Batistella Avancini

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Teste de cristalização da lágrima
em cães da raça Shih Tzu considerados saudáveis pelos tutores

Ano: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias
desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para
propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de
publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a
autorização por escrito do autor.

Júlia Batistella Avancini

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: AVANCINI, Júlia Batistella

Título: Teste de cristalização da lágrima em cães da raça Shih Tzu considerados saudáveis pelos tutores

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 29/ 11/ 2016

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera

Instituição: UnB

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. M.Sc. Rômulo Vitelli Rocha Peixoto

Instituição: UPIS

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dr^a. Ana Carolina da Veiga Rodarte de Almeida

Instituição: UnB

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roberto e Leonise, aos quais devo tudo o que sou hoje, que batalharam a vida inteira para proporcionar a melhor educação que eu e minha irmã poderíamos ter, pelo apoio incondicional, por todos conselhos prestados em momentos de desespero e dúvida, por formarem não só uma veterinária, mas um ser humano que valoriza a vida, as espécies, a natureza e o planeta;

À minha irmã, Renata, que compartilha desde cedo minha paixão pelos animais e que sempre me traz forças e inspiração para ser o melhor exemplo de pessoa em quem ela possa se espelhar.

E à todos os animais que passaram pela minha vida, tanto na parte profissional quanto na pessoal, acrescentando na minha formação e me tornando uma pessoa capaz de amar, valorizar, cuidar e respeitar. Aos que encontram-se apenas em memória – Pretinha, Claudius e aos que ainda estão ao meu lado – Molly, Filó, Tuca. Obrigada por cada momento e ensinamento, dedico não só esse trabalho, mas todos os frutos dessa profissão, que sem dúvida é por vocês, por todos os animais e por amor.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores, mestrandos, doutorandos, colegas de profissão, colegas de graduação, que gentilmente cederam seu tempo para compartilhar de seus conhecimentos e contribuíram imensamente para minha formação.

À professora e orientadora Paula Galera, por me acolher como sua orientada de TCC, PIBIC, PIBEX, artigo e estágios. Agradeço por toda paciência e dedicação nesse período, serei eternamente grata.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, especialmente a Raísa, Thaís Jorge, Camilinha, Guilherme, Estéfany, Rosa, Madu, Thaís Seixas, Tainara, Jéssica, Vanessa, Gabriel, Paula, Tainã, Kássia e a todos os outros que estiveram ao meu lado nesses anos, que não foram dos mais fáceis, mas com certeza foram os melhores da minha vida. Obrigada por cada piada, companhia, risadas, momentos tristes e de desespero, apoio mútuo, podrões e muito estudo. Não tenho como agradecer o suficiente e nem como mensurar a importância de vocês na minha vida. Que nela vocês permaneçam para sempre.

Àquelas que não são apenas amigas, mas irmãs de uma vida inteira - Bárbara, Michelle, Samara, Raíssa, Fernanda, Sofia, Camila, Isabella, Luma e Fabianna. Por sempre estarem ao meu lado, nos piores e melhores momentos da minha vida. Eu amo vocês.

Aos colegas de estágio, tanto de Brasília quanto Jaboticabal, especialmente à Amanda, Cecília, Daniela, Layla, Léo, Thaissa, Carol, Nathália, Laura, Mayara. Obrigada por terem feito dessa experiência a melhor possível, mesmo com as adversidades. Que o contato, independente da distancia, nunca se perca.

À equipe de oftalmologia do Hospital Veterinário de pequenos animais da UnB e de Jaboticabal, especialmente a Rafaela, Raquel, Carol, Flor, Thaís, Ivan, Alexandre e Bia, por todo conhecimento passado, paciência, risadas, conversas e muito trabalho.

À família Gemfel, especialmente a professora Christine por esses longos anos de amizade, cumplicidade, conhecimento e amor aos nossos queridos felinos.

A todos proprietários que cederam gentilmente seus Shih Tzus para o projeto, à Isabela e Ana Raquel, pela paciência e disponibilidade, e à minha querida faculdade, UnB, não apenas pelo espaço de estudo, mas pelos melhores anos da minha vida.

E por fim, a todos que acreditaram no meu potencial e me agraciaram com palavras de gentileza e amizade. Meu muito obrigada.

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes”.

Albert Schweitzer (1875–1965)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. METODOLOGIA	2
4. RESULTADOS.....	3
5. DISCUSSÃO.....	10
6. CONCLUSÃO.....	13
7. REFERÊNCIAS.....	14

RESUMO

Objetivou-se descrever o Teste de Cristalização da lágrima (TCL) em cães da raça Shih Tzu, utilizando-se o programa *STEPanizer* © *stereology tool version 1.8* como método de classificação complementar para o teste. Foram incluídos neste estudo 75 cães (150 olhos), 45 fêmeas e 30 machos, com idades entre 7 meses e 10 anos, considerados saudáveis e livres de afecções oculares pelos seus tutores. A lágrima foi coletada com auxílio de tubo microcapilar, a partir do menisco lateral inferior de ambos os olhos. O conteúdo do tubo microcapilar foi cuidadosamente depositado em uma lâmina de vidro com auxílio de uma seringa agulhada de três milímetros, deixando-a secar à temperatura ambiente. Observou-se que 39% (59 olhos) das amostras coletadas apresentaram classificação tipo II, 34% apresentaram classificação tipo III (51 olhos), 17% apresentaram classificação tipo I (25 olhos) e 10% apresentaram classificação tipo IV (15 olhos). Embora a maioria (55%) dos animais tenha apresentado classificação considerada normal, uma quantidade expressiva dos cães (44%) recebeu classificação tipo III e IV condizente com ceratoconjuntivite seca, no ser humano. A associação da classificação por Rolando com a classificação pelo *STEPanizer* reduz a subjetividade do TCL. Verificou-se que cães da raça Shih Tzu podem apresentar alteração qualitativa da lágrima ao TCL, mesmo apresentando valores de Teste lacrimal de Schirmer dentro da normalidade.

Palavras-chave: Shih Tzu, síndrome ocular braquicefálica, alterações oftálmicas.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the Ferning Test (FT) in Shih Tzu dogs, with the *STEPanizer* © *stereology tool version 1.8* program as a complementary method for the test. Seventy-five dogs were included in the study (150 eyes), 45 females and 30 males, aged between 7 months and 10 years, healthy and considered without eye disease by their tutors. Tears were collected with a microcapillary tube, from the inferior lateral meniscus of both eyes. The contents of the microcapillary tube were carefully deposited on a glass slide with the a three millimeters needle syringe, allowed to dry at room temperature. It was observed that 39% (59 eyes) of the samples presented type II, 34% type III (51 eyes), 17% type I (25 eyes) and 10% presented type IV classification (15 eyes). Although the majority (55%) of the animals received a normal TF classification, an expressive amount of dogs (45%) was classified with type III and type IV, according to dry eye in humans. The association of both tests reduce the subjetctivity of the TCL. It was concluded that the Shih Tzu breed can present a poor TF classification, even presenting normal Schirmer tear test values.

Keywords: Shih Tzu, brachycephalic ocular syndrome, ophthalmic alterations.

1. INTRODUÇÃO

Os cães da raça Shih Tzu têm apresentado popularidade crescente em todo mundo, inclusive no Brasil. Trata-se de uma raça de pequeno porte e temperamento dócil, com características típicas de uma raça braquicefálica (LIMA, 2008; CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA, 2015), como o crânio curto, largo e fortemente convexo. Tais características despertam a simpatia de criadores, porém, podem causar prejuízos a saúde e bem estar destes animais (LIMA, 2008; KOCH et al., 2003; OROZCO & GOMEZ, 2003). A frequência das enfermidades oftálmicas e alterações morfológicas nos anexos oculares em Shih tzus é relevante, e influenciam diretamente na qualidade da lágrima. Destacam-se alterações como a ceratoconjuntivite seca, úlceras corneais, ceratites, entrópio de canto medial e triquíase nasal (LIMA, 2008).

Os Shih Tzus apresentam características anatômicas que contribuem para uma distribuição inadequada do filme lacrimal sobre a superfície ocular, dentre elas uma órbita rasa e ampla fissura palpebral, promovendo a exoftalmia e lagofthalmia nesses animais (SLATTER, 2005; LIMA, 2008). Tais alterações levam a evaporação precoce do filme lacrimal e aumento da exposição corneana ao meio ambiente, favorecendo a desidratação e o desenvolvimento de lesões na córnea (CARRINGTON et al., 1989; MOORE, 1999; WOERDT, 2004; LIMA, 2008). A integridade da superfície ocular é dependente de um filme lacrimal pré corneano (FLPC) estável. Portanto, modificações do FLPC possuem efeitos diretos no conforto ocular e visual, bem como refletem a higidez da superfície ocular (LIMA, 2008).

Dentre os vários testes empregados na avaliação da superfície ocular elencam-se o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), que mensura a porção aquosa do FLPC; o Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), que verifica a estabilidade do filme lacrimal e pode indicar deficiência indireta de mucina; e o Teste de Cristalização da Lágrima (TCL), que permite a mensuração indireta da osmolaridade do FLPC, considerada padrão-ouro no diagnóstico da síndrome do olho seco (BARABINO et al., 2004; JOHNSON & MURPHY 2004). O TCL, embora utilizado na rotina oftálmica de humanos, apenas recentemente foi descrito na semiotécnica da oftalmologia veterinária (MOTA 2014, SILVA et al, 2015), mas não há relatos em raças específicas. Uma vez que a classificação proposta por Rolando (1984) é considerada subjetiva por alguns autores (MASMALI, MURPHY & PURSLOW 2014), propõe-se

associá-la ao programa *STEPanizer*[®] *stereology tool* que permite uma avaliação mais objetiva da formação dos cristais.

O *STEPanizer* pode ser encontrado através do site www.STEPanizer.com, tendo acesso livre para download. É um software utilizado como ferramenta para avaliação estereológica de imagens digitais e possibilita a classificação mais precisa da ramificação dos cristais (MOTA, 2014).

2. OBJETIVOS

Dada a predisposição de cães Shih Tzu às alterações da superfície ocular, objetivou-se descrever o Teste de Cristalização da Lágrima (Rolando, 1984) nesta raça, associando-o ao programa *STEPanizer* © *stereology tool*.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Brasília (UnB.doc.143391/2015), atendendo às normas para experimentação animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). O estudo foi divulgado em redes sociais (anexo A), com o objetivo de atrair tutores de cães da raça Shih Tzu, para participação voluntária no projeto. Foram incluídos no estudo animais considerados saudáveis pelo tutor, sem alterações oculares previamente diagnosticadas, e que não estivessem realizando tratamento clínico ou oftálmico.

O estudo foi realizado no período de seis meses (março-agosto, 2016). Os animais foram atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Participaram do estudo 75 cães (150 olhos), 46 fêmeas e 30 machos, com idades entre 7 meses e 10 anos.

3.2. Avaliação do filme lacrimal

A lágrima foi coletada com auxílio de tubo microcapilar (*Perfecta*[®] sem heparina), a partir do menisco lateral inferior de ambos os olhos. O conteúdo do tubo microcapilar foi cuidadosamente depositado em uma lâmina de vidro com auxílio de uma seringa agulhada de três milímetros, deixando-a secar à temperatura ambiente. Decorridos dez minutos da coleta da lágrima, a lâmina foi observada em microscopia

de luz (Leica Microsystems Ltd. DM750) nos aumentos de 4x, 10x e 20x. Em seguida, foram obtidas imagens digitais das lâminas através de câmera fotográfica própria acoplada ao microscópio de luz. Foi feita a classificação do Teste de Cristalização da lágrima segundo a proposta por Rolando (1984), em tipos I a IV, observando-se as imagens digitais capturadas, de acordo com o padrão de arborização e distancia entre os cristais.

Posteriormente foi feita a classificação através do programa *STEPanizer*[®] *stereology tool version 1.8*, na contagem de 100 pontos equidistantes sobreposta as imagens digitais (figuras 1, 2 e 3). Em cada ponto é feita a escolha de um dos quadrantes para realizar a contagem (figura 3), que é feita apenas no quadrante que possuir cristal de lágrima. Determinou-se que o quadrante inferior esquerdo de cada ponto seria contado. Após a contagem dos campos, o resultado (número) foi substituído na fórmula descrita abaixo, chegando à classificação do TCL pelo *STEPanizer*.

Classificação segundo Rolando (1984) = 5,37 - (0,04 x <i>STEPanizer</i>)

Quarenta minutos após a coleta da lágrima, os animais foram submetidos à biomicroscopia com lâmpada em fenda (Kowa SL-15[®]), ao Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Teste de Schirmer Ophthalmos[®], São Paulo/SP), à tonometria de aplanção (Tono-pen[®] XL Tonometer Medtronic Solan) e ao teste de coloração com fluoresceína (FLUO) (Fluoresceína Strips Ophthalmos[®], São Paulo/SP).

4. RESULTADOS

Todos os animais avaliados, embora fossem considerados sem alterações oculares pelos tutores, apresentaram algum tipo de alteração de anexos oftálmicos, sendo a triquíase de carúncula presente em todos os cães. Os animais foram avaliados entre os meses de março a agosto de 2016, cuja temperatura média máxima e mínima foram de 28 °C e 14,8 °C, respectivamente (tabela 2)(accuweather) e a umidade média foi de 62% respectivamente (tabela 2)(temperature weather).

Os resultados obtidos com o teste de cristalização da lágrima e a classificação pelo *Stepanizer* estão descritos na Tabela 1. Observou-se que 39% das amostras apresentaram classificação tipo II (59 olhos), 34% apresentaram classificação tipo III

(51 olhos), 17% apresentaram classificação tipo I (25 olhos) e 10% apresentaram classificação tipo IV (15 olhos) (Gráficos 1 e 2).

Foram encontrados apenas dois pacientes que apresentaram TLS abaixo do valor normal (15 mm/min), em apenas um dos olhos. Não foi possível realizar o TLS em dois pacientes, pois ambos se mostraram agressivos durante a avaliação.

As porcentagens não evidenciaram valores discrepantes entre machos e fêmeas, para todas as classificações de Rolando (1984) e *STEPanizer* (tipo I, II, III e IV), o mesmo sendo observado também para a idade dos animais. Tanto animais jovens, quanto animais idosos apresentaram classificação variando de I a IV.

Tabela 1 - Dados coletados dos 75 animais avaliados no estudo.

	Sexo	Idade	Classificação Rolando (Ferning)		Classificação STEPanizer		Variação STEPanizer - Ferning		Teste de Schirmer	
			OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD
1. Donna	F	2 anos	2	3	2,49	2,93	0,49	0,07	25	29
2. Meg	F	6 anos	2	1	2,25	1,57	0,25	0,57	19	35
3. Meg	F	3 anos	3	3	2,89	2,77	0,11	0,23	24	32
4. Totó	M	2 anos	1	1	1,41	1,49	0,41	0,49	32	31
5. Rex	M	1 ano e 6 meses	1	1	1,41	1,49	0,41	0,49	17	16
6. Cherrie	F	5 anos	2	4	2,21	4,21	0,21	0,21	22	22
7. Nina	F	4 anos	4	4	4,33	4,21	0,33	0,21	32	24
8. Luna	F	—	3	2	2,97	2,41	0,03	0,41	27	31
9. Nick	M	4 anos	4	3	3,85	2,73	0,15	0,27	22	25
10. Lili	F	3 anos	2	2	1,77	2,17	0,23	0,17	26	27
11. Leia	F	4 anos	2	3	2,05	2,89	0,05	0,11	29	34
12. Tuca	F	6 anos	2	1	2,33	1,69	0,33	0,69	31	33
13. Bob	M	2 anos	3	3	3,45	3,29	0,45	0,29	30	27
14. Billy	M	6 anos	2	3	1,89	2,45	0,11	0,55	30	30
15. Kika	F	5 anos	2	4	2,49	4,25	0,49	0,25	30	24
16. Enrico	M	8 meses	3	3	3,37	2,61	0,37	0,39	26	30
17. Mel	F	2 anos e 8 meses	3	2	3,33	1,73	0,33	0,27	32	34
18. Mel	F	2 anos e 8 meses	2	2	1,93	1,65	0,07	0,35	22	27
19. Tulipa	F	1 ano e 5 meses	1	1	1,61	1,69	0,61	0,69	22	27
20. Dimitri	M	4 anos e 7 meses	2	2	1,89	2,05	0,11	0,05	22	30

21. Rufio	M	4 anos	2	2	1,89	2,49	0,11	0,49	29	27
22. Chanel	F	8 anos	3	4	3,17	4,25	0,17	0,25	26	26
23. Cheron	F	—	2	1	1,89	1,53	0,11	0,53	30	30
24. Fred	M	3 anos	2	2	1,93	1,89	0,07	0,11	12	28
25. Shelly	F	11 meses	1	2	1,41	1,73	0,41	0,27	30	29
26. Angel	F	3 anos	3	2	3,21	2,53	0,21	0,53	30	30
27. Marie	F	4 anos	2	3	2,53	2,93	0,53	0,07	21	11
28. Pretinha	F	10 anos	2	4	2,65	*	0,65	**	22	17
29. Sushi	M	7 anos	3	1	3,17	1,57	0,17	0,57	30	30
30. Lisa	F	4 anos e 8 meses	2	2	1,65	1,77	0,35	0,23	24	22
31. Jade	F	4 anos	2	2	1,85	2,61	0,15	0,61	25	24
32. Toddy	M	1 ano 3 meses	2	2	1,85	2,45	0,15	0,45	27	27
33. Maya	F	1 ano	1	3	1,93	3,53	0,93	0,53	34	28
34. Farofa	M	9 meses	3	3	2,57	3,09	0,43	0,09	32	29
35. Zezinho	M	4 anos	2	2	1,77	2,69	0,23	0,69	22	25
36. Maya	F	1 ano e 6 meses	2	2	2,21	2,41	0,21	0,41	29	29
37. Chopp	M	1 ano	4	3	3,97	3,41	0,03	0,41	26	26
38. Mel	F	3 anos	2	1	1,69	1,53	0,31	0,53	21	22
39. Andynho	M	1 ano e 6 meses	3	2	3,33	2,57	0,33	0,57	***	***
40. Brigitte	F	3 anos	1	3	1,73	3,73	0,73	0,73	29	35
41. Lucky	M	1 ano e 6 meses	4	3	3,97	4,09	0,03	1,09	24	34
42. Lola	F	1 ano e 3 meses	3	4	2,61	4,85	0,39	0,85	18	20
43. Nick	M	2 anos e 2 meses	1	3	1,69	3,29	0,69	0,29	23	28
44. Cindy	F	3 anos e 11 meses	2	1	1,93	1,45	0,07	0,45	23	19
45. Bolinha	M	6 anos	3	2	2,53	2,77	0,47	0,77	22	22
46. Julie	F	1 ano e 6 meses	3	3	3,41	3,09	0,41	0,09	35	29
47. Nicole	F	9 anos	3	3	3,45	2,97	0,45	0,03	24	19
48. Léo	M	1 ano e 6 meses	3	3	2,81	3,61	0,19	0,61	21	34
49. Mel	F	—	4	3	4,61	2,69	0,61	0,31	32	27
50. Cristal	F	1 ano e 6 meses	4	3	4,01	3,05	0,01	0,05	21	18

51. Brigitte	F	2 anos e 6 meses	4	3	4,41	3,17	0,41	0,17	26	27
52. Bela	F	2 anos e 5 meses	1	3	1,57	3,89	0,57	0,89	35	28
53. puff	F	—	3	4	3,85	3,85	0,85	0,15	32	28
54. Meg	F	—	3	4	3,25	3,57	0,25	0,43	29	30
55. George	M	1 ano e 7 meses	3	2	3,69	2,01	0,69	0,01	30	32
56. William	M	2 anos e 10 meses	4	4	4,05	4,49	0,05	0,49	16	21
57. Layka	F	2 anos e 6 meses	2	2	1,81	2,77	0,19	0,77	35	29
58. Escovão	M	7 meses	3	3	3,61	2,25	0,61	0,75	29	25
59. Amy	F	3 anos	2	1	2,45	1,57	0,45	0,57	20	28
60. Adam	M	9 meses	1	1	1,49	1,57	0,49	0,57	24	30
61. Tulipa	F	2 anos e 2 meses	2	2	1,85	1,89	0,15	0,11	26	34
62. Woody	M	4 anos	2	3	2,01	3,37	0,01	0,37	26	23
63. Toy	M	1 ano e 5 meses	1	2	1,61	1,77	0,61	0,23	***	***
64. Lulu	F	2 anos e 6 meses	3	2	2,81	2,01	0,19	0,01	29	31
65. Peppa	F	1 ano e 5 meses	2	2	1,61	2,57	0,39	0,57	33	34
66. Oliver	M	1 ano e 11 meses	3	2	2,41	2,05	0,59	0,05	32	23
67. Thor	M	1 ano	3	3	2,69	2,17	0,31	0,83	***	***
68. Pretinho	M	2 anos e 10 meses	3	2	3,09	1,73	0,09	0,27	33	30
69. Mel	F	9 anos	3	3	3,21	2,89	0,21	0,11	>35	33
70. Meg	F	2 anos e 6 meses	1	2	1,57	1,97	0,57	0,03	20 em 40s	25
71. Cheetos	M	6 anos	1	3	1,69	2,93	0,69	0,07	31	30
72. Meg	F	3 anos	2	1	1,93	1,61	0,07	0,61	35	30
73. Zeus	M	3 anos e 3 meses	1	2	1,53	1,49	0,53	0,51	>35	>35
74. Agnes	F	2 anos e 6 meses	2	2	2,29	2,85	0,29	0,85	34	30
75. Payla	F	11 meses	2	2	2,41	2,57	0,41	0,57	34	40

* Não houve presença alguma de cristais, levando a um número fora da escala de Rolando (1984) (5,37).

** Devido ao número sair muito da escala de Rolando (1984) não foi feita a variância.

*** Os animais foram agressivos no momento do teste, portanto, não foi possível realizar o TLS.

Tabela 2 – Média da variação da temperatura de Brasília entre os meses de Março à Agosto de 2016 e média da umidade relativa do ar de Brasília entre Março à Agosto nos últimos 7 anos.

	Temperatura oC		Umidade %
	Máxima	Mínima	
Março	28,3 °C	17,7 °C	74%
Abril	29,1 °C	16,6 °C	68%
Maio	28,3 °C	15,8 °C	65%
Junho	26,9 °C	12,3 °C	61%
Julho	27,5 °C	11,9 °C	57%
Agosto	27,8 °C	14,35 °C	48%

Refêrencia: accuweather; temperature weather.

Gráfico 1 - Resultado da classificação de ambos os testes (TCL e *STEPanizer*) da análise de 150 olhos.

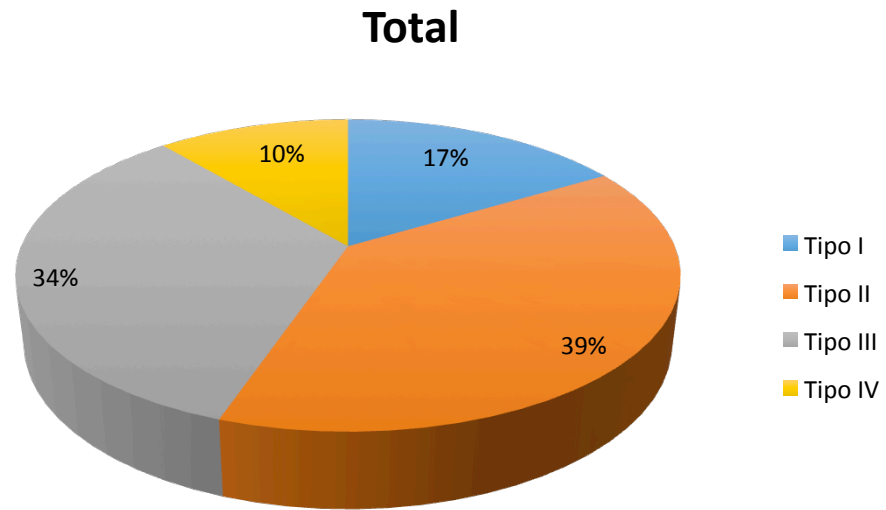
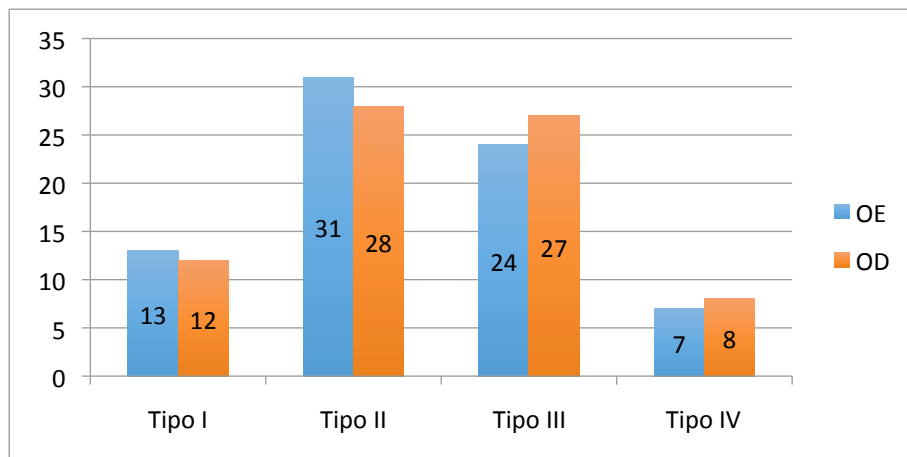


Gráfico 2 – Resultado da classificação de ambos os testes (TCL e *STEPanizer*) da análise de 150 olhos. Número de olhos direito e esquerdo classificados de I a IV.



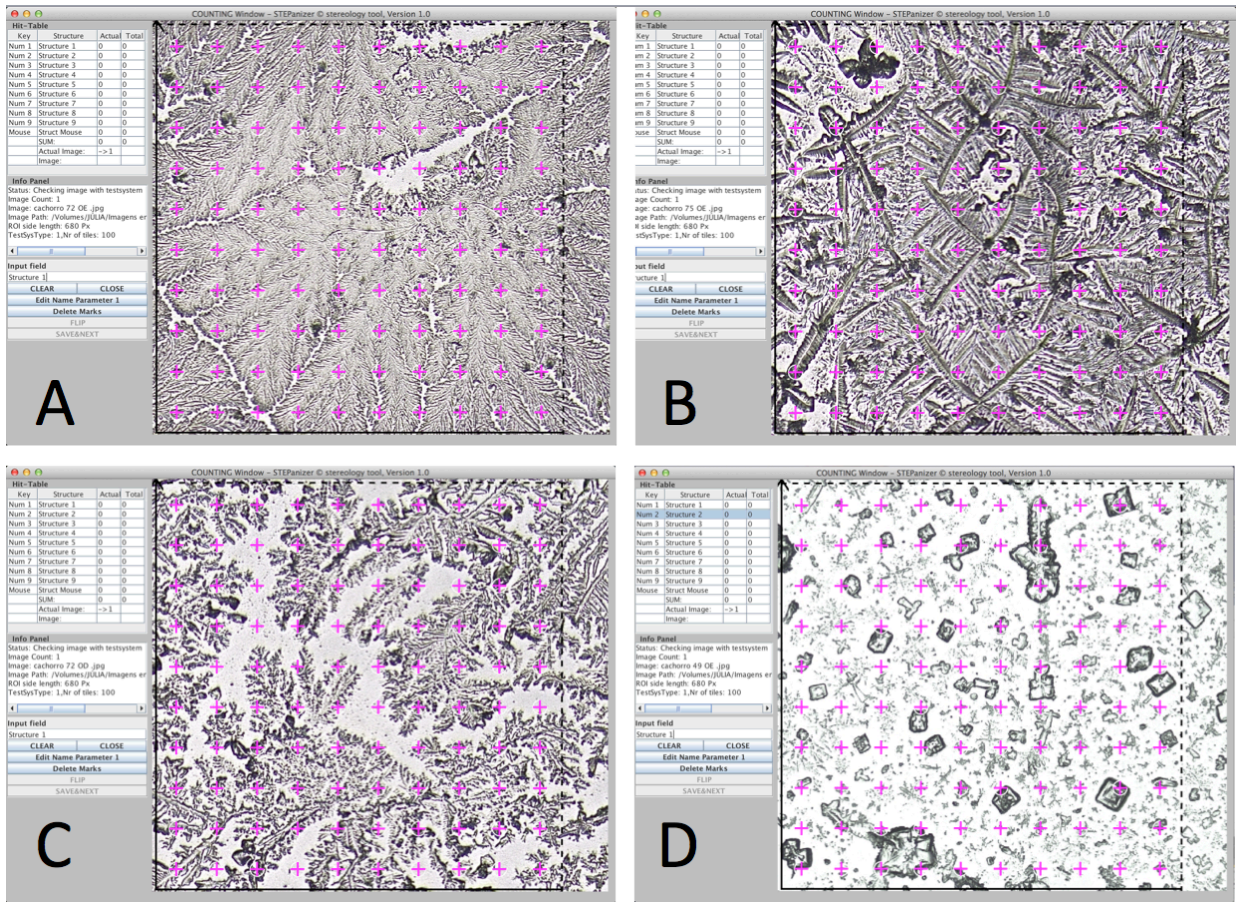


FIGURA 1 – Imagens fotográficas demonstrando o uso do programa *STEPanizer© stereology tool, version 1.8*. As imagens encontram-se em aumento de 4x e 10x com 100 pontos equidistantes sobrepostos em um campo delimitado. Foi observada a presença de cristais em 92 quadrantes na figura (A), evidenciando um padrão de classificação tipo I; 77 quadrantes na figura (B), evidenciando um padrão de classificação tipo II; 61 quadrante na figura (C) evidenciando um padrão de classificação tipo III; e 19 quadrantes na figura (D), evidenciando um padrão de classificação tipo IV.

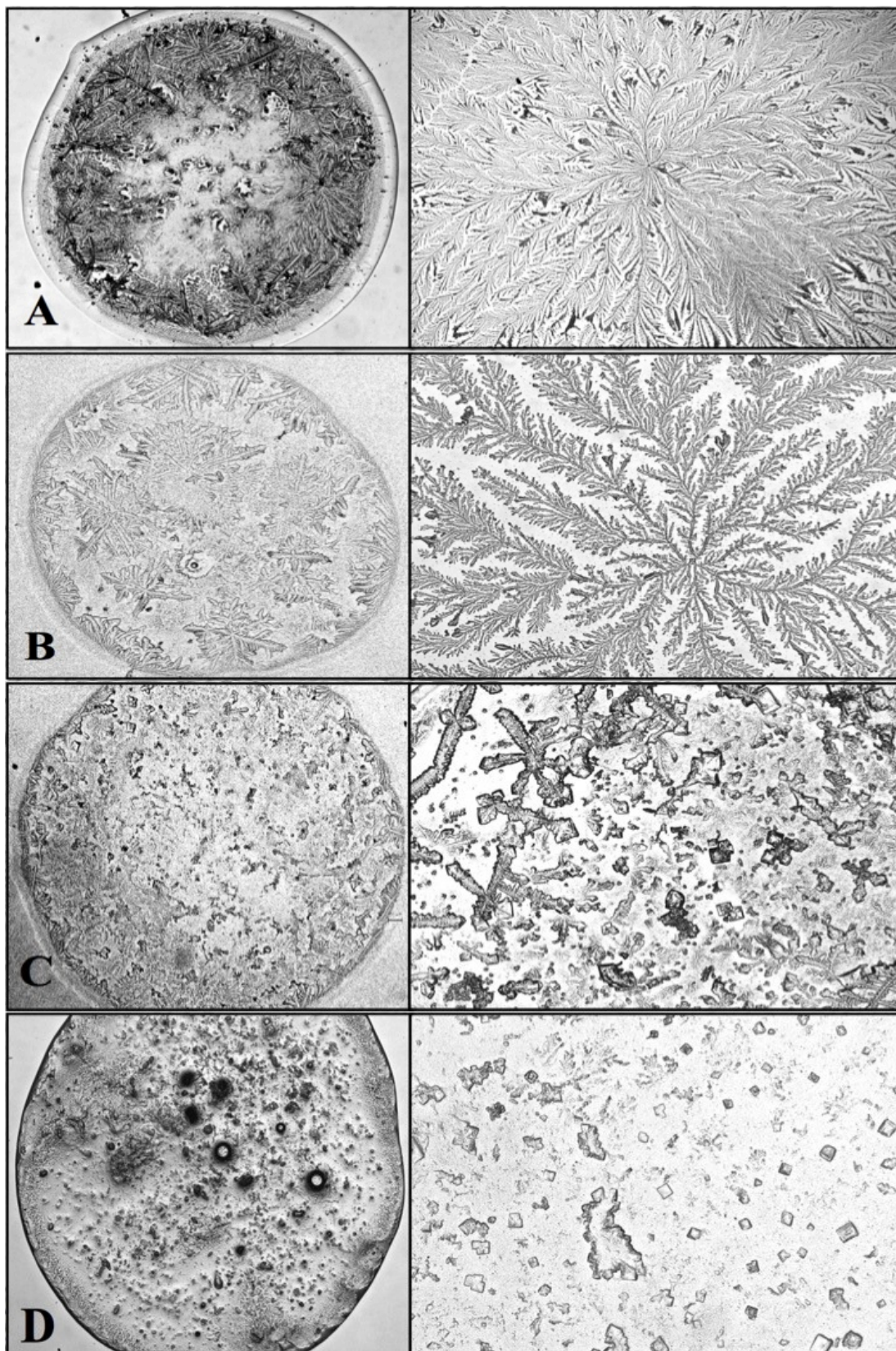


FIGURA 2 - Imagem obtida por microscópio de luz (LEICA DM750), nos aumentos de 4x e 10x, respectivamente, evidenciando classificação dos cristais da lágrima em (A) Tipo I, (B) Tipo II, (C) Tipo III e (D) Tipo IV.

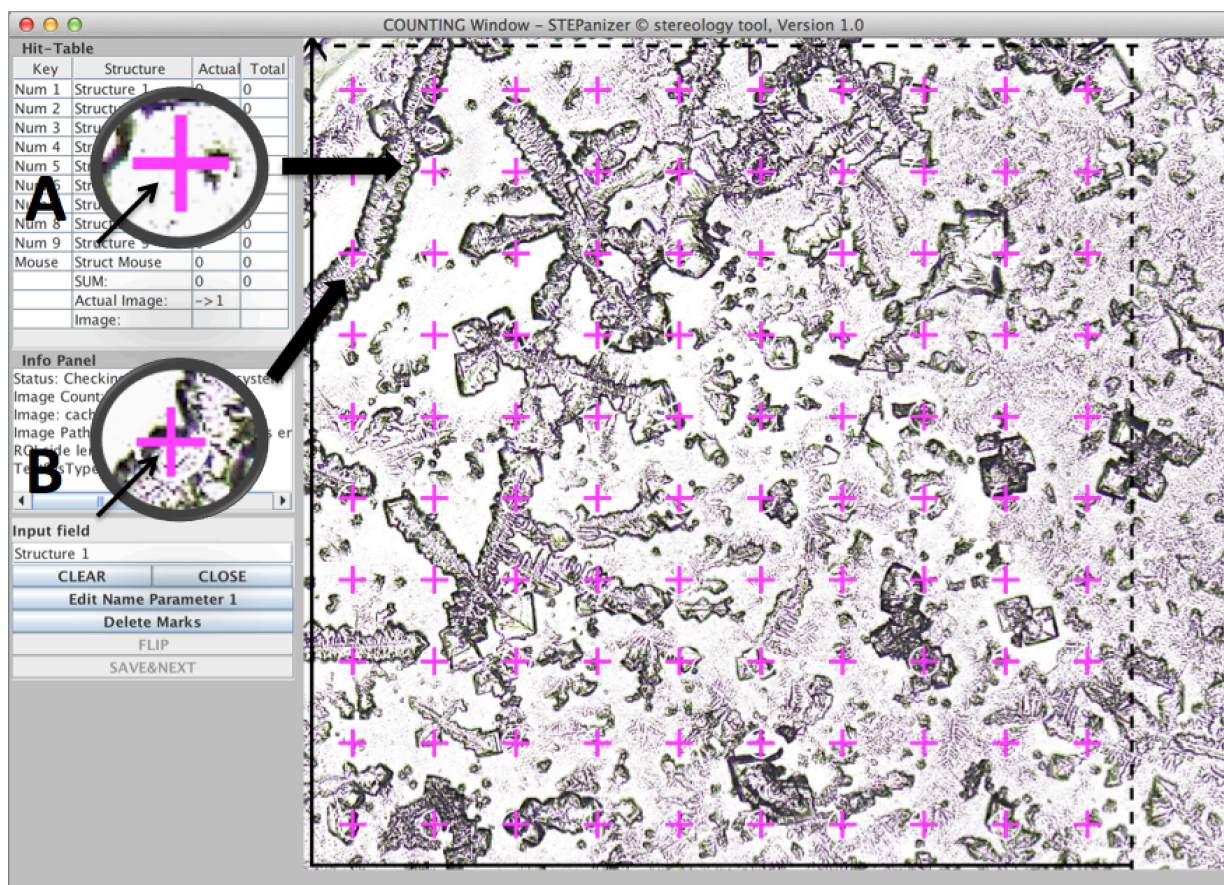


FIGURA 3 - A contagem do *STEPanizer*® *stereology tool* é realizada pela presença de cristal no quadrante escolhido de cada ponto. No presente estudo o quadrante inferior esquerdo foi escolhido para a contagem. Na imagem (A) no aumento de 20x, evidenciamos a ausência de cristal no quadrante, sendo assim, esse quadrante não é contado. Na imagem (B) evidenciamos cristal no quadrante, sendo considerado na contagem dos 100 pontos equidistantes.

5. DISCUSSÃO

A osmolaridade do filme lacrimal representa a concentração de cátions (sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro e cobre) e ânions (cloretos, bicarbonatos, fosfatos) dissolvidos dentro da porção aquosa da lágrima. A osmolaridade é influenciada tanto pela taxa de secreção lacrimal como pela taxa de evaporação da lágrima, e a instabilidade do filme lacrimal pode resultar em hiperosmolaridade (MURUBE, 2006). Portanto, a avaliação da superfície ocular deve combinar o resultado dos testes diagnósticos disponíveis aos sinais clínicos observados (JOHNSON & MURPHYA 2004),.

Considera-se a mensuração da osmolaridade do filme lacrimal o melhor método de diagnosticar e classificar a síndrome do olho seco no homem (Charters, 2011 MÓDIS & SZALAI 2011). Sua aferição tem sido considerada como um

biomarcador da severidade da doença que afeta a superfície ocular, visto que a hiperosmolaridade da lágrima é um dos eventos centrais no ciclo vicioso da síndrome do olho seco (BAUDOUIN et al., 2013), com produção de citocinas inflamatórias desencadeando a apoptose das células epiteliais e corneanas, incluindo as células caliciformes, secretoras de mucinas (JULIO et al., 2012) e subsequente instabilidade do filme lacrimal, (VERSURA, PROFAZIO & CAMPOS, 2010).

Embora o olho seco seja freqüente em cães braquicefálicos (LAUS et al., 1995), esta correlação ainda não foi estabelecida, tampouco o TCL foi descrito em raças específicas de cães, embora tenha sido reportado em cães por esta equipe (GOUVEIA et al., 2013, MOTA 2014). A incidência elevada de alterações da superfície ocular de cães da raça Shi tzu (LIMA, 2008), bem como o interesse crescente da população por eles foram a principal motivação deste trabalho.

Apesar de ser útil no diagnóstico do olho seco, a aferição direta da osmolaridade do filme lacrimal requer instrumentação especializada, incomum na rotina clínica. Entretanto, ela pode ser aferida de forma indireta, através de um teste clínico simples, rápido e barato, denominado teste de cristalização do filme lacrimal (TCL), que indica as propriedades bioquímicas do filme lacrimal (BITTON 2008, MASMALI et al., 2014). Neste estudo, verificou-se ser um teste exequível e de baixo custo, conforme relatado na literatura. Entretanto, embora seja de simples execução, há muitas variáveis que devem ser padronizadas para que se obtenha resultados confiáveis.

Os primeiros estudos dos cristais formados em amostras de lágrimas foram realizados em 1791, por cientistas franceses. Posteriormente, Tabbara & Okumoto (1982), Rolando (1984) e Norm (1987) deram continuidade às pesquisas, padronizando o TCL na oftalmologia humana. As lágrimas, quando secam, levam a cristalização de alguns de seus componentes, que assumem vários arranjos, semelhantes a folhas de samambaia, como pode ser verificado nos resultados apresentados, de forma semelhante à lágrima humana (ROLANDO 1984) e equina (SILVA et al., 2015). Segundo Rolando (1984), a lágrima pode receber as classificações entre I e IV, sendo os tipos I e II relacionados a maior presença de cristais e menor espaçamento entre eles, e os tipos III e IV, a um pior prognóstico, como indivíduos que apresentam ceratoconjuntivite seca.

A maior porcentagem dos animais (39%) recebeu a classificação Tipo II, que juntamente com aqueles classificados em Tipo I perfazem a maioria dos cães avaliados (55%), condizente com animais com superfície ocular saudável, similar ao observado em humanos. Entretanto, a classificação III e IV corresponde a um número expressivo de animais (45% dos animais) e no homem está relacionada a alterações da superfície ocular, como a ceratoconjuntivite seca (ROLANDO 1984, MASMALI et al., 2014). Este é um dado que sugere uma alteração qualitativa da lágrima na raça Shih tzu, por se tratarem de animais supostamente sem alterações, e sem redução quantitativa deste fluido, indicando que embora a produção esteja, na maioria dos animais, dentro dos padrões de normalidade ou mesmo acima dele, a qualidade do filme lacrimal não é satisfatória. No presente estudo, foram encontrados apenas dois pacientes que apresentaram TLS abaixo do valor normal (15 mm/min) (SLATTER, 2005) em um dos olhos. Entretanto, dentre os animais cuja classificação do TCL foi tipo III e IV, na maioria dos animais os valores do TLS encontravam-se dentro dos valores de normalidade, indicando uma alteração qualitativa do filme lacrimal. A epífora, verificada em muitos cães, pode decorrer de lacrimamento reflexo, causada por alterações de cílios, como a triquíase de carúncula, presente em todos os animais.

Acredita-se que a reação de cristalização é causada por uma interação entre eletrólitos (sais inorgânicos) e macromoléculas (proteínas e mucopolissacarídeos), e os diferentes padrões de cristalização são relacionados a diferenças na concentração dos sais e às relações alteradas entre estes componentes (HORWATHA et al., 2001, FELBERG et al. 2008, MCGINNIGLE et al., 2012). Macromoléculas tais como mucinas, estão limitadas a periferia da lágrima, enquanto os cristais são formados pelos sais inorgânicos, com a evaporação da parte líquida da lágrima (PEARCE et. al. 2000, JULIO et. al. 2012). Na fig.2 pode-se observar, comparando-se a fig.2A com 2D, uma halo ao redor da gota de lágrima na primeira, já ausente na fig.2D. Apesar de não ter sido o escopo deste estudo, verifica-se uma alteração na camada de mucina em conformidade com a classificação do TCL. A redução da camada de mucina em um TCL tipo IV, por exemplo, pode ter sido desencadeada pela redução das células calciformes da conjuntiva (JULIO et al., 2012). Entretanto, a mensuração destas células não estava entre os objetivos deste estudo.

Reporta-se subjetividade da classificação de Rolando (1984) em relação ao avaliador, principalmente entre a classificação II e III (MASMALI et al., 2014), igualmente observado no presente estudo. Por este motivo, todas as classificações foram feitas por um mesmo avaliador, com treinamento prévio. Para uma classificação objetiva, sugeriu-se associar o TCL a outra classificação, baseada na análise estereológica das imagens da lágrima cristalizada, o programa STEPanizer[®] stereology tool (STEPanizer), que possibilita a classificação mais precisa da ramificação dos cristais (MOTA, 2014, SILVA et al., 2015).

Este programa pode ser obtido através do site www.STEPanizer.com, tendo acesso livre para download. Pode ser utilizado para imagens microscópicas e macroscópicas. O software funciona através da criação de um sistema de teste sobreposto às imagens digitais, permitindo exportar os dados gerados para programas como o Microsoft Office Excel, possibilitando a conversão dos pontos contados em resultados estatísticos (TSCHANZ et al., 2011). Foi previamente determinado que a melhor correlação do *STEPanizer* com a classificação de Rolando (1984) foi o do sistema teste com 100 pontos equidistantes por campo. Verificou-se que quanto maior a contagem de pontos pelo *STEPanizer*, menor o tipo de cristalização segundo Rolando (1984), constatado, também, no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Nas condições em que este estudo foi conduzido pode-se concluir que cães da raça Shih Tzu podem apresentar, mesmo apresentando valores do TLS dentro da normalidade, deficiência qualitativa da lágrima, mediante avaliação do TCL. A análise pelo STEPanizer associada a classificação por Rolando (1984), é um método objetivo e passível de ser empregado na rotina clínica oftalmológica.

7. REFERÊNCIAS

ACCUWEATHER. Brasília, Brasil meteorologia. [online]. Disponível em: <http://www.accuweather.com/>. Acesso em: novembro de 2016.

BARABINO, S.; CHENA, W. & DANA, M.R. 2004. **Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations.** Experimental Eye Research. 79: 613–621.

BAUDOUIIN, et. al. **Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: Proceedings of the OCEAN groupe meeting.** Clinical Science. The ocular surface, October 2013, vol. 11 no. 4. P. 246-258.

BITTON, E.; KEECH, A.; JONES, L. & SIMPSON, T. 2008. **Subjective and Objective Variation of the Tear Film Pre- and Post-Sleep.** Optometry and Vision Science. 85: 740–749.

Bortner CD, Cidlowski JA. **Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes.** Am J Physiol 1996;271:C950-61

CHARTERS, L. 2011. **Tear osmolarity a useful metric: osmometer enables diagnosis, management of dry eye disease with minimal disturbance.** Ophthalmology times. Ocular allergy & dry eye, July 2011, p. 15.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFLIA. Shih tzu. [online]. Disponível em: www.cbck.org. Acesso em: novembro de 2016.

FELBERG, S.; CORDEIRO, H.; SATO, E.H.; FILHO, D.M.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; ENDO, R.M. & DANTAS, P. E. C. 2008. **Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjögren.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 71: 228-33.

Galvez A, Morales MP, Eltit JM, et al. **A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes.** Cell Tissue Res 2001;304:279-85

GOUVEIA, A.F., SILVA, L.R., FALCÃO, M.S.A., GALERA, P. D. **Tear ferning in healthy dogs** In: American College of Veterinary Ophthalmologists 44th Annual Conference, 2013, Porto Rico. American College of Veterinary Ophthalmologists 44th Annual Conference. Elsevier, 2013. p.E26 - E50

HORWATHA, J.; ETTINGERB, K.; BACHERNEGGA, M.; BODNERA, E. & SCHMUTA, O. 2001. **Ocular Ferning Test – Effect of Temperature and Humidity on Tear Ferning Patterns.** Ophthalmologica. 215: 102 –107.

JOHNSON, M.E. & MURPHYA, P.J. 2004. **Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome.** Progress in Retinal and Eye Research. 23: 449–474.

JULIO G, LIUCH S, PUJOL P et al. **Effects of tear hyperosmolarity on conjunctival cells in mild to moderate dry eye.** *Ophthalmic Physiological Optics* 2012; 32(4):317-323.

KOCH, D.A.; HUBLER, A.S.M., MONTAVON, P.M. **Brachycephalic syndrome in dogs.** *Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian*, Princeton, v.25, n.1, p.48-54. 2003.

KOGBE O, LIOTET S, TIFFANY JM. **Factors responsible for tear ferning.** *Cornea*1991;10(5):433-44.

LAUS, J. L.; GALERA, P. D.; SOUZA, M. S. B.; MORALES, A.; ANDRADE, A. L. **Padronização dos valores do “teste da lágrima de schirmer modificado” e da “tonometria de indentação pelo método de schiotz”, em cães da região de Jaboticabal – SP - Brasil.** *Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo*, v .32. n.3. p. 173-176, 1995.

LIMA, A. M. V. **Produção lacrimal e densidade de células caliciformes conjuntivais em cães da raça Shih-Tzu.** 2008. 39 f. Tese (Pós-graduação em ciência animal) – Escola de veterinária, Universidade Federal do Goiás, Goiânia. 2008.

MOTA, L. P. A. **Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra.** Agosto/2014. 45 f. Tese (Pós-graduação em saúde animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2014.

MASMALI A.M., MURPHY P.J. & PURSLOW C. 2014. **Development of a new grading scale for tear ferning.** *Contact Lens & Anterior Eye.* 37: 178-184.

MCGINNIGLE S., NAROO S.A. & EPERJESI F. 2012 **Evaluation of Dry Eye.** *Survey of Ophthalmology.* 57: 293-316.

Módis L, Szalai E. **Dry eye diagnosis and management.** *Expert Review of Ophthalmology* 2011; 6.1: 67.

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 and visual science*, St. Louis, v.28, p.1925-1932, 1987.

MURUBE J. **Tear osmolarity.** *The Ocular Surface* 2006; 4: 62–73.

NORM M. **Ferning in conjunctival-cytologic preparations. crystallization in stained semiquantitative pipette samples of conjunctival fluid.** *Acta Ophthalmologica* 1987;65(1):118-22

OROZCO, S.C.; GÓMEZ, L.F. **Manejo médico y quirúrgico del síndrome de las vías aéreas superiores del braquicéfalo.** Reporte de un caso. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias*, Medellín, v.16: n.2, 2003.

PEARCE E, TOMLINSON A. **Spatial location studies on the chemical composition of human tear ferns**. *Ophthalmic and Physiological Optics* 2000; 20(4):306-13.

ROLANDO M. 1984. **Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes**. *Chibret International journal of ophthalmology*. 2: 32-41.

SILVA, L.R., GOUVEIA, A.F., FATIMA, C, OLIVEIRA, L.B., REIS Jr., J. L., FERREIRA, Rf, PIMENTEL, C.M.M., GALERA, P. D. **Tear ferning test in horses and its correlation with ocular surface evaluation**. *Veterinary Ophthalmology (Print)*. , v.18, p.198 - 209, 2015.

TABBARA KF, OKUMOTO M. **Ocular ferning test**. A qualitative test for mucus deficiency. *Ophthalmology* 1982;89(6):712-4.

TEMPERATURE WEATHER. Media mensal de dados meterológicos para a região de Brasília no Brasil. [online]. Disponível em: <http://www.temperatureweather.com>. Acesso em: novembro de 2016.

TSCHANZ S.A., BURRI P.H. & WEIBEL E.R. 2011. **A simple tool for stereological assessment of digital images**: the STEPanizer. *Journal of Microscopy*, 243: 47–59.

VERSURA, P.; PROFAZIO, V.; CAMPOS, E.C. 2010. **Performance of Tear Osmolarity Compared to Previous Diagnostic Tests for Dry Eye Diseases. Tear Osmolarity in Dry eye Disease**. *Informa Healthcare, Current Eye Research*, 35(7), 553–564, 2010.

WOERDT, A.V.D. **Adnexal surgery in dogs and cats**. *Veterinary Ophthalmology*, Oxford, v.7, n.5, p.284-290; 2004.

ANEXO A



O setor de oftalmologia do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (UnB) realizará um estudo sobre a lágrima em cães da raça Shih Tzu.



Se você tem um cãozinho saudável da raça e tem interesse em contribuir com o estudo, entre em contato conosco

E-mail: projetoshihtzuunb@gmail.com