



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANDERSON FERREIRA GOUVEIA

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM CÃES
HÍGIDOS**

BRASÍLIA
2013

ANDERSON FERREIRA GOUVEIA

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM CÃES
HÍGIDOS**

**Monografia apresentada para a
conclusão do curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de
Brasília**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Paula Diniz Galera

Brasília

2013

GOUVEIA, Anderson Ferreira

Padronização do Teste da Cristalização da lágrima em cães hípidos; Anderson Ferreira Gouveia, orientação de Paula Diniz Galera- Brasília, 2013

Monografia- Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2013.

1. Filme lacrimal. 2. Cristalização da lágrima. 3. Mucinas.

Cessão de Direitos

Nome do autor: Anderson Ferreira Gouveia

Titulo da monografia de conclusão de curso: Padronização do teste de cristalização da lágrima em cães Hípidos

Ano : 2013

É concedida a 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.

Anderson Ferreira Gouveia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: GOUVEIA, Anderson Ferreira

Título: Padronização do Teste da Cristalização da Lágrima em cães Hígidos

Monografia de
Conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da
Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Profª Drª Paula Diniz Galera (orientadora)

Julgamento: _____

M.V. Me. Rômulo Vitelli Rocha Peixoto

Julgamento: _____

M.V. Me. Mário Sérgio Almeida Falcão

Julgamento: _____

Instituição: FAV/UnB

Assinatura: _____

Instituição: FAV/UnB

Assinatura: _____

Instituição: FAV/UnB

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as minhas conquistas durante a minha vida.

Aos meus pais, Antônio e Ana Lúcia, por todo o amor, dedicação e apoio, pela participação em minha vida acadêmica e por não medirem esforços para a minha realização profissional.

A minha orientadora, Professora Paula Diniz Galera, por todo conhecimento transmitido e por me incentivar na realização das pesquisas.

A professora Luciana Sonne, que muito contribuiu para minha formação profissional com ensinamentos, dedicação e conselhos durante o início da minha graduação.

Aos meus amigos da graduação, Beatrice Barbosa, Máira Gonçalves, Yonara Garcia, Susy Hermes, André Leonardo, Maryna Barbosa, Verônica Takatsuka, Lorena Campos, Aline Coelho e outros que mesmo não aqui citados contribuíram com bons momentos e incentivos.

A Laura Reis e Mário Falcão por todo o conhecimento transmitido, puxões de orelha e incentivos durante meu estágio no Serviço de Oftalmologia Veterinária.

Aos Membros da equipe da Clínica Cirúrgica de pequenos animais do Hospital Veterinário da UnB e do Laboratório e de Patologia Veterinária.

Muito obrigado a todos!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 8 |
| RESUMO..... | 9 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| INTRODUÇÃO..... | 11 |
| OBJETIVOS..... | 13 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 14 |
| RESULTADOS..... | 16 |
| DISCUSSÃO..... | 27 |
| CONCLUSÃO..... | 29 |
| REFERÊNCIAS..... | 30 |

LISTA DE ABREVIATURAS

TLS-Teste Lacrimal de Schirmer

UnB- Universidade de Brasília

IgG- Imunoglobulina da classe G

IgM- Imunoglobulina da classe M

BUT- Break up time

FLPC-Filme lacrimal pré

corneal **CCS**-Ceratoconjuntivite

Seca **MUC**- Mucina

RESUMO

GOUVEIA, A. F. Padronização do Teste da Cristalização da lágrima em cães Hígidos (Standardization of Ferning Test in healthy dogs) 2013. Monografia (Conclusão de curso em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. DF.

O filme lacrimal é complexo, de estrutura dinâmica, composto por lipídeos, proteínas e mucinas montadas sobre a superfície hidrofóbica do epitélio corneal. O teste de cristalização da lágrima se baseia no princípio de que a lágrima, quando seca, apresenta cristalização de alguns de seus componentes, que assumem formatos variados, lembrando folhas de samambaia. Rolando (1984) classificou os achados em quatro grupos distintos, de acordo com a presença e exuberância destas folhas, sendo que os padrões encontrados se diferem entre as lágrimas de indivíduos normais e com deficiências. Esse estudo foi realizado no Serviço de Oftalmologia Veterinária da Universidade de Brasília, composto de 45 cães, clinicamente hígidos e submetidos a semiotécnica oftálmica de rotina composta pelo teste lacrimal de Schirmer, biomicroscopia em lâmpada de fenda, teste de fluoresceína para avaliação da integridade da superfície ocular e para o tempo de ruptura do filme lacrimal. Ato contínuo a avaliação da integridade ocular os animais foram submetidos à coleta lacrimal para posterior avaliação do perfil de cristalização por meio da classificação de Rolando(1984) por três avaliadores. Os animais avaliados no estudo apresentaram padrão predominante do tipo II, este padrão é considerado de boa qualidade lacrimal, o que é esperado trabalhando-se com animais hígidos e sem alterações oculares prévias, qualidade confirmada pelos valores do teste lacrimal de Schirmer e pelo tempo de ruptura do filme lacrimal. O teste demonstrou ser de fácil execução, baixo custo e de fácil classificação podendo ser aplicada na rotina oftalmológica veterinária como um teste de triagem importante para a síndrome do olho seco em cães. Não foram detectados padrões significativos nas diferentes faixas etárias.

Palavras-chaves: Filme lacrimal; Cristalização da lágrima; Mucina.

ABSTRACT

The tear film is a complex, dynamic structure, composed of lipids, proteins and mucins mounted on the surface of the hydrophobic corneal epithelium. The Ferning test is based on the principle that the tear, when dry, presents crystallization of some of its components, which various shapes, resembling a fern leaves. Rolando (1984) classified the findings in to four distinct groups according to the presence and exuberance of the leaves, and the patterns found differ between the tears of normal subjects and disabled. This study was conducted in the service of Veterinary Ophthalmology at the University of Brasilia, composed of 45 dogs, clinically healthy and under went routine ophthalmic semiotechnique with the completion of the Schirmer tear test, slit lamp biomicroscopy, fluorescein dye to assess the integrity ocular surface and the length of the break up time. Immediately there after ocular health evaluation the animals were collected for further evaluation of lacrimal profile through the crystallization Rolando (1984) by three evaluators. The animals evaluated in this study showed a predominant pattern of type II, a pattern considered good quality tear, which is expected to working with healthy animals and without previous ocular, quality confirmed by the values of the Schirmer tear test and the Break up Time. The test proved easy to perform, inexpensive and easy sorting can be applied in routine of veterinary ophthalmology as a important screening test for dry eye syndrome in dogs. No significant patterns were detected in differents age.

Key words: tear film; Ferning Test; mucin.

INTRODUÇÃO

O filme lacrimal é complexo, de estrutura dinâmica, composto por lipídeos, proteínas e mucinas, montadas sobre a superfície hidrofóbica do epitélio corneal. É um filme trilaminar, no qual seu maior componente, cerca de 90%, é a camada intermediária aquosa, produto das glândulas lacrimais (DAVIDSON et al,2004). O Filme lacrimal tem várias defesas como a órbita óssea, pálpebras, cílios, epitélio corneal e epitélio conjuntival (DAVIDSON et al, 2004). Portanto o filme lacrimal pré- corneal (FLPC) deve ser estável e saudável para a manutenção tanto da qualidade óptica quanto da saúde da superfície ocular, bem como assegurar a homeostase ocular. Modificações na sua estrutura repercutem em efeitos diretos sobre os componentes da superfície ocular, como a conjuntiva, limbo e epitélio corneal (TSUBOTA, 2001).

As principais funções da lágrima são: manter a superfície lisa para refração, lubrificar as pálpebras, conjuntiva e córnea, fornecer nutrientes e subprodutos metabólicos para a superfície da córnea, fornecer glóbulos brancos com acesso para a córnea e conjuntiva além de defender a superfície ocular contra patógenos(DAVIDSON, 2004). O filme lacrimal é constituído pela glândula lacrimal principal, glândula da terceira pálpebra, glândulas de meibômio, e células caliciformes da conjuntiva bulbar(SLATTER, pág 259)

A camada mais externa da película lacrimal, lipídica, é uma combinação de lipídeos polares e não polares que são produtos da secreção das glândulas meibômio, que são túbulo-acinar, glândulas holócrinas que descarregam todo o seu conteúdo no processo de secreção(FOULKES, 2013). Contém lipídeos polares e não polares tais como ésteres de cera, hidrocarbonetos e triglicérides, além de uma fina camada interior que contém fosfolipídeos. A integridade dos lipídeos externos depende da estabilidade dos lipídeos mais internos que permitem a interface com a porção mais aquosa do filme lacrimal. Os lipídeos não polares retardam a evaporação da porção aquosa e os lipídeos polares facilitam a interação com a porção aquosa(JONHSON et al., 2004). A camada lipídica em humanos é formada por ésteres de colesterol, fosfolípidos, triglicérides e colesterol impedindo a evaporação da porção aquosa e lipídica localizada abaixo(AIRES et al , 2010).

A Camada aquosa do filme lacrimal tem a função de proteção e lubrificação da superfície ocular. Composta de 98,2 % de água e 1,8% de sólidos constituintes de proteínas . A porção aquosa também contém lactoferrina, lisozima, imunoglobulina(IgA), glicoproteínas, ceruloplasmina, transferrina. Também tem componentes essenciais para a nutrição da córnea como sais inorgânicos, oxigênio e proteínas(LIMA, 2011). Mucinas solúveis também estão presentes na porção aquosa e diminuem a tensão superficial e melhoram a consistência da camada aquosa, contribuindo assim, para a viscosidade do filme lacrimal(DAVIDSON et al, 2004).

A camada mais interna mucosa, composta por mucinas, glicoproteínas glicolisadas, secretadas pelas células caliciformes da conjuntiva. Impede a adesão de corpos estranhos, células inflamatórias, ou agentes patogênicos na superfície ocular(MANTELLI, 2013). As mucinas são também essenciais para manutenção e proteção do epitélio corneal, formando uma barreira epitelial através da interação de proteínas e carboidratos de ligação chamados de galactose lectinas de ligação, que são altamente expressas pelo epitélio conjuntival(MANTELLI, 2013). As mucinas possuem várias funções sobre a superfície ocular e ficam entre o epitélio hidrofóbico e a porção aquosa do filme lacrimal. Existem vários tipos de mucinas em seres humanos que geralmente incluem MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5, MUC 5AB E MUC-5C(GILGER, 2008).A mucina também permite o espalhamento do filme lacrimal na superfície ocular e protege a superfície ocular de micro traumas e age como uma barreira contra patógenos, pois quando o animal tem uma deficiência de mucina,

contaminantes apolares ligam-se ao epitélio o que acentua problemas e aumenta o risco de infecção(JONHSON et al., 2004).A produção de mucina acontece nas células caliciformes da conjuntiva bulbar e a secreção por estímulos sensoriais simpáticos e parassimpáticos na córnea e conjuntiva(PICKETT et al., 2013).

A síndrome do olho seco é uma desordem ocular comum em humanos e em cães, e sua incidência nessa espécie chega a aproximadamente 1-4%(WILLIANS; MANN, 2013). Ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma deficiência da camada aquosa do filme lacrimal pré-corneal(HENDRIX et al.,2011) ou da excessiva evaporação, sendo este segundo um déficit qualitativo(FOULKES, 2013). Os sinais clínicos em cães com CCS incluem secreção ocular mucopurulenta, conjuntivite, ceratite, e blefarospasmo(HENDRIX et al.,2011). Em Humanos com esta afecção existe pouca capacidade de reserva para compensar qualquer aumento da evaporação e em casos de olho seco mais grave toda a produção da lágrima deve ser perdida por este processo.

Dentre as causas de CCS canina, a destruição da glândula lacrimal por mecanismo imunomediado é a mais prevalente, mas pode também decorrer de endocrinopatias como diabetes mellitus, hiperadrenocorticismos, hipotireoidismo, medicamentos como sulfas, opióides ou ainda resultado de déficits neurológicos, infecções, e por iatrogenia(CHANDLER et al, 2013). Cães com CCS apresentam um teste lacrimal de Schirmer(TLS) menor do que 10 mm/minuto, e os cães gravemente afetados têm frequentemente um resultado de zero mm/min (HENDRIX et al.,2011).

A avaliação qualitativa é realizada por meio do teste de ruptura do filme lacrimal, visibilizada por meio de um exame com lâmpada de fenda e luz de cobalto até o aparecimento dos primeiros *spots* enegrecidos sobre a superfície corneal(PENG et al.,2013).

Além do teste lacrimal de Schirmer e o tempo de ruptura do filme lacrimal, a coloração da superfície ocular com rosa bengala ou lissamina verde demonstram regiões desprovidas da cobertura do filme lacrimal, indicando instabilidade do mesmo. Corroborando para avaliação da superfície ocular em pacientes com suspeita ou com diagnóstico confirmado de olho seco, a avaliação qualitativa da lágrima pode ser feita pela citologia conjuntival de impressão, análise do perfil protéico do filme lacrimal, mensuração da osmolaridade da lágrima e o teste de cristalização do filme lacrimal(FELBERG et al., 2008).

O teste de cristalização da lágrima se baseia no principio de que a lágrima, quando seca, apresenta cristalização de alguns de seus componentes, que assumem formatos variados, lembrando “folhas de samambaia”. Rolando(1984) classificou os achados em quatro grupos distintos, de acordo com a presença e exuberância destas folhas, sendo que os padrões encontrados se diferem entre as lágrimas de indivíduos normais e com deficiências lacrimais. O teste de Cristalização foi inicialmente usado na medicina para determinar período de ovulação em mulheres avaliando características dos cristais no muco da cervix(EVANS et al., 2009). Sendo a cristalizaç um fenômeno conhecido em outros fluidos corporais como humor aquoso, saliva, líquido(HORWATH et al., 2001).

No padrão de Cristalização do tipo I, as estruturas se apresentam uniformes sem espaços entre as ramificações; no tipo II, pequenos espaços começam a aparecer, mas ainda estão presentes as ramificações; no tipo III, há grandes espaços presentes com ramificações pobres, e no tipo IV, o fenômeno de cristalização está ausente(HORWATH et al, 2001).

Uma grande variedade de estudos foi publicada, nos últimos anos utilizando o teste de cristalização em pacientes com as mais diversas afecções(FELBERG et al., 2008). Entretanto, este teste não fora, ainda, conduzido nas diferentes espécies animais.

OBJETIVOS

Objetivou-se, por meio deste estudo, padronizar a técnica do Teste de Cristalização da Lágrima em cães hípidos e avaliar diferenças nos padrões de cristalização em grupos com diferentes idades e, correlacionar os valores com a temperatura e umidade relativa.

Apesar do grande número de publicações em oftalmologia humana, o uso do Teste da Cristalização da Lágrima ainda não fora realizado e descrito em cães previamente a este estudo. Verificou-se, aqui, a reprodutibilidade dos padrões descritos por Rolando(1984).

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Serviço de Oftalmologia Veterinária da Universidade de Brasília com utilização de 45 cães clinicamente hígidos (90 olhos), de diferentes raças(tabela 1), sendo vinte machos e vinte e cinco fêmeas, com idade variando de 06 meses a 14 anos. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais e realizado no período de Janeiro à Outubro de 2013.

Tabela 1- Raças avaliadas

| Raça | Quantidade |
|------------------------------|------------|
| Boxer | 3 |
| Cocker Spaniel Inglês | 5 |
| Golden Retriever | 2 |
| Lhasa Apso | 5 |
| Pinscher | 2 |
| Poodle | 3 |
| Pug | 1 |
| Scotish Terrier | 1 |
| Schnauzer Miniatura | 1 |
| Shih Tzu | 2 |
| SRD | 15 |
| Sptiz Alemão | 1 |
| Yorkshire Terrier | 3 |

Os animais foram separados em três grupos, de acordo com a faixa etária. O Grupo 1 era composto de cães com idade entre 06 meses até 02 anos; o Grupo 2 com cães entre 03 anos e 5 anos e o Grupo 3 entre 6 anos até 14 anos.

Os animais foram submetidos à semiotécnica oftálmica de rotina com mensuração dos reflexos pupilares, teste da lágrima de Schirmer (Teste de Schirmer[®], Ophthalmos Fórmulas, São Paulo, SP, Brasil), teste da fluoresceína (Fluoresceína Strips[®], Ophthalmos Fórmulas, São Paulo, SP, Brasil), biomicroscopia com lâmpada em fenda (Kowa-SL[®]; Kowa, Tokyo, Japan),

tonometria de aplanção (Tonômetro TonoPen – XL[®]; Medtronic Solon, Jacksonville, FL, EUA) e fundoscopia indireta (Heine – Omega 200[®]; Heine Quality, Alemanha).

O Teste da lágrima de Schirmer foi realizado com a tira de papel específica no saco conjuntival inferior, deixando-a durante 1 minuto em cada olho, para medir a produção quantitativa da lágrima e seguindo como padrões os valores entre 15 a 30 mm/ min, para serem incluídos no estudo. O teste de Ruptura do Filme Lacrimal (Break up Time), foi realizado com a fita de Fluoresceína, colocada na região da conjuntiva bulbar e, após o mecanismo de piscar, o filme se espalha sobre a córnea onde era contado em segundos até o surgimento dos spots enegrecidos.

Os animais considerados hígidos foram submetidos à coleta lacrimal para posterior avaliação do perfil de cristalização.

A lágrima foi coletada com tubo microcapilar do fórnice conjuntival inferior do olho direito e esquerdo, sem nenhum tipo de estímulo local (Figura 1), sendo coletado uma mesma quantidade de todos os animais, o equivalente a 3 mm medido no tubo de microcapilar onde a lágrima penetra por capilaridade. Após coleta, a lágrima foi depositada sobre uma lâmina de vidro, deixando-a secar por dez minutos sob temperatura e umidade aferidas com o uso do aparelho de Termo-Higrômetro (Incoterm- indústria de termômetros, modelo 7666.02.0.00). Seguiu-se avaliação da amostra lacrimal por microscopia de luz (Microscópio Diagtech, modelo XJS 900T, Diagtech Comércio e importação LTDA) em aumento de 10 e 40 x. As amostras foram fotografadas com uma câmera (Sony IS 300, 3 Mega Pixels) acoplada ao microscópio com a utilização do programa View7 para posterior avaliação e classificação. Em cada cristalização foram retiradas três fotos: uma mais na margem; a segunda na região de transição e uma terceira mais central.

Posteriormente os animais foram classificados de acordo com o descrito por Rolando em três padrões de cristalização, sendo: Tipo I, Tipo II, Tipo III e Tipo IV por três avaliadores diferentes seguindo como base os padrões estabelecidos por Rolando (1984). A Classificação entre os avaliadores foi feita de forma separada, para que, a opinião de um não influenciasse a opinião do outro.

Os testes estatísticos utilizados foram a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) pois permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores e o coeficiente de concordância KAPPA que mediu a intensidade de concordância entre três avaliadores.

RESULTADOS

Para a classificação foram estabelecidos quatro padrões de acordo com o modelo estabelecido por Rolando(1984) porem não se observou o padrão do tipo quatro devido os animais serem hígidos e não apresentarem alterações.

Apesar da higidez dos animais o padrão de cristalização predominante nos três grupos avaliados foi o do tipo II(56,29%),seguido pelo tipo III(28,13%) e por último o tipo I, nos olhos direito e esquerdo(15.55%).

As fotos retiradas em microscópio de luz com o aumento de 40 vezes não foram significativas para o estudo pois o campo observado se mostra muito restrito e impede dessa forma a classificação das cristalizações.

Tabela 2- Padrões de Cristalização Grupo 1

| GRUPO 1 | OLHO DIREITO | OLHO ESQUERDO |
|-----------------|---------------------|----------------------|
| TIPO I | 6,66% | 2,22% |
| TIPO II | 64,44% | 60% |
| TIPO III | 28,9% | 37,77% |

Tabela 3-Padrões de Cristalização Grupo 2

| GRUPO 2 | OLHO DIREITO | OLHO ESQUERDO |
|-----------------|---------------------|----------------------|
| TIPO I | 33,33% | 31,11% |
| TIPO II | 51,11% | 42,22% |
| TIPO III | 15,56% | 26,67% |

Tabela 4- Padrões de Cristalização Grupo 3

| GRUPO 3 | OLHO DIREITO | OLHO ESQUERDO |
|-----------------|---------------------|----------------------|
| TIPO I | 8,89% | 11,11% |
| TIPO II | 57,78% | 62,22% |
| TIPO III | 33,33% | 26,67% |

Tabela 5- Valores encontrados Grupo 1

| Animal | Raça | Idade | Schirmer OD | Schirmer OE | BUT OD | BUT OE | Temperatura OD | Temperatura OE | Umidade OD | Umidade OE |
|--------|-------------|-------------|----------------|----------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|
| 1 | SRD | 2 | 20 | 22 | 13 | 14 | 25.6°C | 25.6°C | 46% | 46% |
| 2 | Yorkshire | 1,5 | 25 | 25 | 20 | 22 | 24.5°C | 24.5°C | 43% | 43% |
| 3 | Poodle | 2 | 18 | 19 | 23 | 24 | 26.3°C | 26.3°C | 47% | 47% |
| 4 | Poodle | 1,3 | 20 | 23 | 21 | 19 | 26.3°C | 26.3°C | 47% | 47% |
| 5 | SRD | 10 meses | 25 | 13 | 14 | 21 | 26.3°C | 26.1°C | 46% | 46% |
| 6 | SRD | 1,8 | 26 | 24 | 23 | 20 | 25.6°C | 25.6°C | 42% | 42% |
| 7 | SRD | 1 | 25 | 25 | 18 | 19 | 25.6°C | 25.6°C | 42% | 42% |
| 8 | SRD | 1,5 | 17 | 23 | 13 | 16 | 24.8°C | 24.8°C | 42% | 42% |
| 9 | BorderColie | 2 | 26 | 24 | 18 | 21 | 26.6°C | 26.6°C | 45% | 45% |
| 10 | SRD | 2 | 23 | 22 | 21 | 18 | 25.3°C | 25.3°C | 41% | 41% |
| 11 | SRD | 1,5 | 26 | 19 | 26 | 13 | 24.6°C | 24.6°C | 46% | 46% |
| 12 | LhasaApso | 06 meses | 23 | 19 | 14 | 13 | 23.1°C | 23.1°C | 61% | 61% |
| 13 | Boxer | 1 | 24 | 22 | 12 | 11 | 26.7°C | 26.7°C | 63% | 63% |
| 14 | Boxer | 1 | 30 | 28 | 14 | 13 | 26.3°C | 26.3°C | 31% | 31% |
| 15 | SRD | 1 | 20 | 23 | 19 | 20 | 26.2°C | 26.1°C | 31% | 31% |

Tabela 6- Valores encontrados no Grupo 2

| Animal | Raça | Idade | Schirmer OD | Schirme OE | BUT OD | BUT OE | Temperatura OD | Temperatura OE | Umidade OD | Umidade OE |
|--------|--------------------------|-------|----------------|---------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|
| 1 | ScottishTerrier | 5 | 21 | 22 | 21 | 19 | 26.5°C | 26.5°C | 46% | 46% |
| 2 | SRD | 3 | 28 | 25 | 23 | 22 | 29.1°C | 29.1°C | 44% | 44% |
| 3 | ShihTzu | 3 | 25 | 26 | 23 | 22 | 24.7°C | 24.7°C | 41% | 41% |
| 4 | Cocker Spaniel Inglês | 5 | 30 | 28 | 13 | 11 | 28.1°C | 28.1°C | 50% | 50% |
| 5 | Cocker Spaniel Inglês | 4 | 27 | 25 | 14 | 12 | 28.2°C | 28.1°C | 50% | 51% |
| 6 | CockeSpaniel Inglês | 4 | 31 | 30 | 16 | 14 | 28.1°C | 28.2°C | 49% | 49% |
| 7 | YorkshireTerrier | 5 | 26 | 28 | 20 | 18 | 27.2°C | 28.0°C | 63% | 63% |
| 8 | YorkshireTerrier | 4 | 26 | 20 | 14 | 16 | 24.8°C | 24.8°C | 64% | 64% |
| 9 | LhasaApso | 5 | 25 | 23 | 13 | 13 | 26.5°C | 26.1°C | 62% | 62% |
| 10 | LhasaApso | 5 | 28 | 30 | 20 | 18 | 26.4°C | 26.4°C | 60% | 60% |
| 11 | Boxer | 4 | 26 | 23 | 14 | 15 | 26.2°C | 26.3°C | 31% | 31% |
| 12 | SRD | 3 | 24 | 26 | 12 | 15 | 26.3°C | 26.3°C | 31% | 31% |
| 13 | SRD | 5 | 26 | 21 | 18 | 20 | 26.0°C | 26.1°C | 31% | 31% |
| 14 | Golden Retriever | 4 | 24 | 25 | 22 | 22 | 26.3°C | 26.2°C | 33% | 32% |
| 15 | Golden Retriever | 5 | 30 | 32 | 19 | 22 | 26.4°C | 28.0°C | 47% | 47% |

Tabela 7- Valores encontrados no Grupo 3

| Animal | Raça | Idade | Schirmer OD | Schirme OE | BUT OD | BUT OE | Temperatura OD | Temperatura OE | Umidade OD | Umidade OE |
|--------|-----------------------------|-------|----------------|---------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|
| 1 | Schnouzer Miniatura | 6 | 19 | 19 | 22 | 20 | 25.2°C | 25.2°C | 42% | 42% |
| 2 | Pinscher | 10 | 24 | 20 | 16 | 14 | 24.5°C | 24.5°C | 43% | 43% |
| 3 | LhasaApso | 6 | 20 | 22 | 14 | 17 | 25.7°C | 25.7°C | 47% | 47% |
| 4 | PoodleToy | 11 | 12 | 21 | 9 | 23 | 25.4°C | 25.4°C | 55% | 55% |
| 5 | Pinscher | 12 | 26 | 25 | 19 | 14 | 25.4°C | 25.4°C | 56% | 56% |
| 6 | Spitz Alemão | 13 | 23 | 25 | 18 | 22 | 25.3°C | 25.3°C | 43% | 43% |
| 7 | ShihTzu | 8 | 28 | 27 | 23 | 21 | 25.3°C | 25.3°C | 44% | 44% |
| 8 | SRD | 10 | 26 | 23 | 18 | 20 | 24.3°C | 24.3°C | 46% | 46% |
| 9 | SRD | 6 | 17 | 22 | 17 | 20 | 24.3°C | 24.3°C | 45% | 45% |
| 10 | SRD | 7 | 23 | 25 | 14 | 13 | 24.3°C | 24.3°C | 46% | 46% |
| 11 | SRD | 12 | 21 | 29 | 13 | 11 | 24.6°C | 24.6°C | 46% | 46% |
| 12 | Cocker SpanielInglês | 6 | 26 | 28 | 18 | 17 | 27.8°C | 28.3°C | 49% | 50% |
| 13 | Cocker Spaniel Inglês | 14 | 26 | 24 | 14 | 16 | 28.4°C | 28.1°C | 49% | 49% |
| 14 | Pug | 8 | 24 | 26 | 13 | 13 | 23.6°C | 23.1°C | 61% | 61% |
| 15 | LhasaApso | 6 | 30 | 31 | 15 | 17 | 26.1°C | 26.3°C | 66% | 66% |

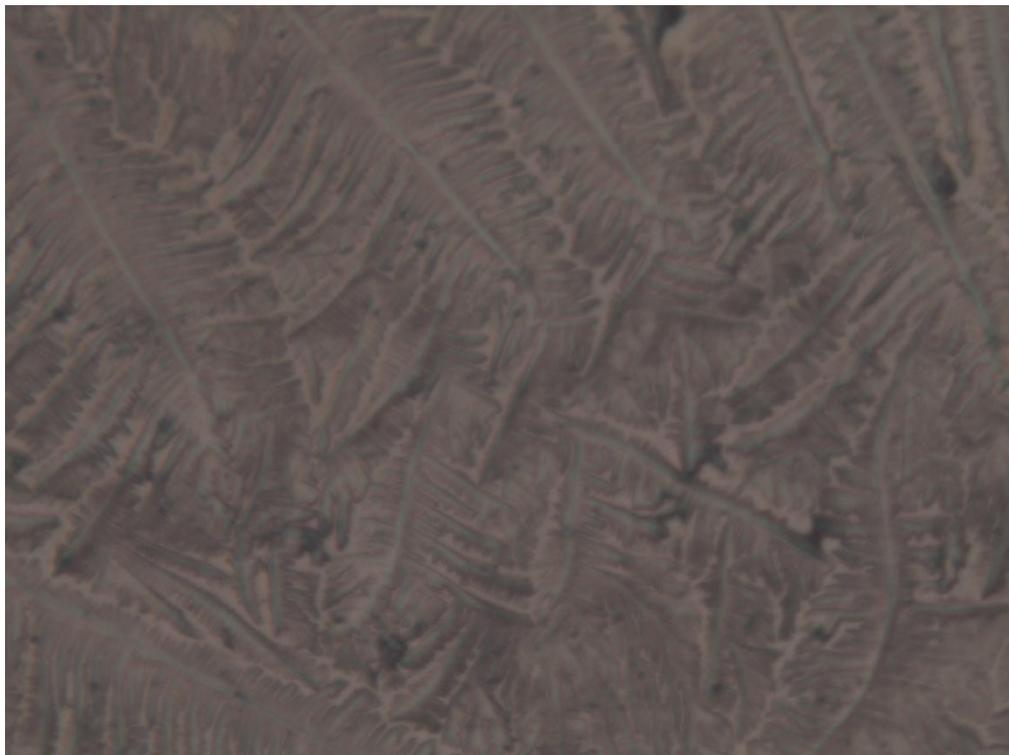


Figura 1- Coleta da lágrima do fórnice conjuntival inferior de um cão da raça Cocker Spaniel Inglês

Figura 2-Tipo I



Figura 3- Tipo I



Figuras 2 e 3. Padrão de cristalização tipo I, com cristalização uniforme, abundante ramificação ausência de espaçamento entre os cristais. Fotografia em aumento de 10x, microscopia de luz.

Figura 4- Tipo II

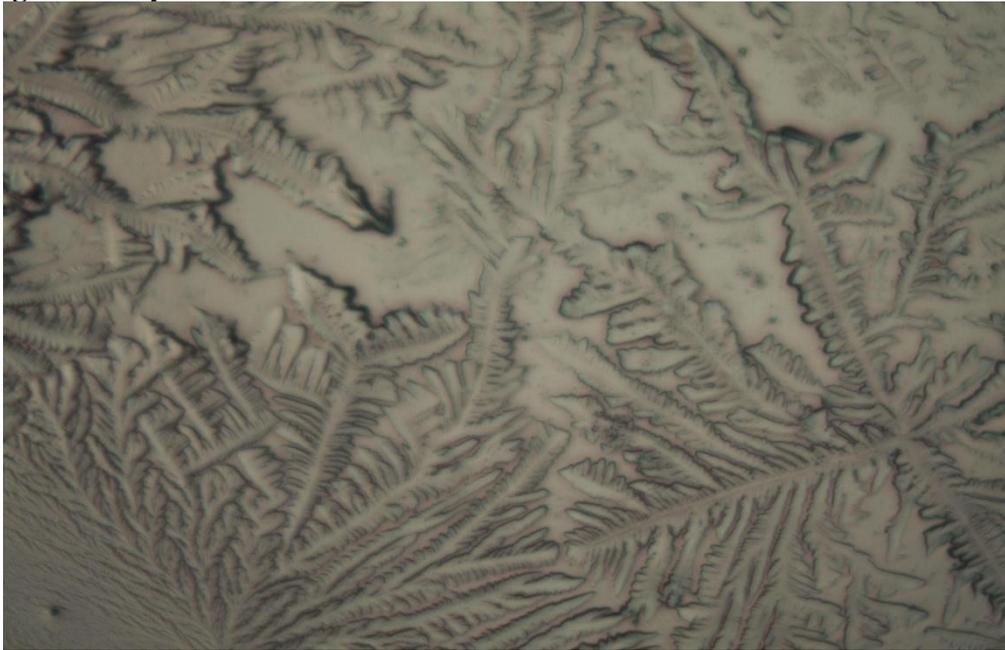


Figura 5- Tipo II



Figuras 4 e 5. Padrão de cristalização tipo II, com formação completa dos cristais , porém com espaçamento entre eles.

Figura 6- Tipo III



Figura 7- Tipo III

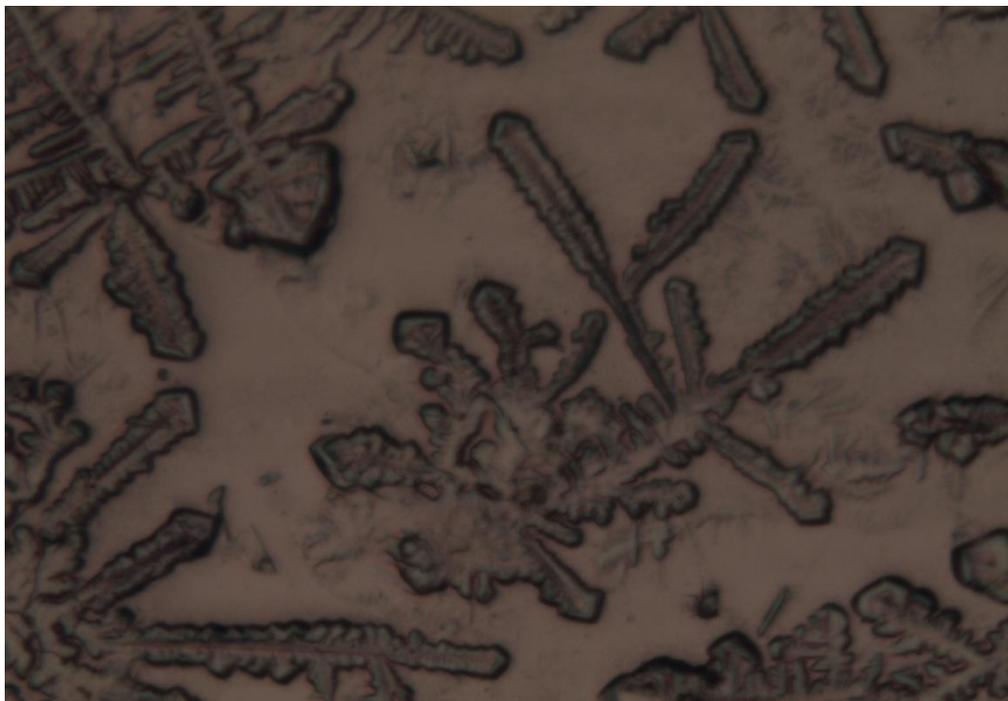


Figura 6 e 7. Padrão de cristalização tipo III, com formação de raros cristais, muitas vezes incompletos e sem ramificações, além de presença abundante de espaçamento entre eles. Fotografia em aumento de 10x , microscopia de luz.

Para avaliação estatística dos valores obtidos no experimento foram utilizadas as médias dos valores do Teste Lacrimal de Schirmer, do tempo de ruptura do filme lacrimal, da temperatura ambiente no momento da coleta de amostras e Umidade relativa do ar. Foi avaliado o coeficiente de concordância Kappa , Odds Ratio e a Curva ROC.

Foi observada uma maior concordância entre o observador 3, comparando olho direito com o olho esquerdo, e a menor concordância foi ,entre o observador 2 no olho direito e observador 3 no olho direito.

Tabela 8- Coeficiente de concordância Kappa, Erro padrão entre os 3 observadores nos padrões de cristalização.

| Observador | Observador | Kappa | Erro Padrão |
|------------|------------|--------|-------------|
| Obs 1 OD | Obs 1 OE | 0,6197 | 0,1143 |
| Obs 2 OD | Obs 2 OE | 0,4578 | 0,1159 |
| Obs 3 OD | Obs 3 OE | 0,6241 | 0,1045 |
| Obs 1 OD | Obs 2 OD | 0,3888 | 0,1223 |
| Obs 1 OD | Obs 3 OD | 0,514 | 0,116 |
| Obs 2 OD | Obs 3 OD | 0,2905 | 0,122 |
| Obs 1 OE | Obs 2 OE | 0,4602 | 0,1191 |
| Obs 1 OE | Obs 2 OE | 0,4987 | 0,1121 |
| Obs 1 OE | Obs 3 OE | 0,5267 | 0,1092 |

Tabela 9- Observador 1 para olho Direito e Esquerdo

| Coeficiente Kappa | |
|----------------------------------|--------|
| Kappa | 0,6197 |
| Erro padrão | 0,1143 |
| 95% limite de confiança superior | 0,3957 |
| 95% limite de confiança inferior | 0,8437 |
| Teste de H0: Kappa = 0 | |
| Erro padrão sobre H0 | 0,1176 |
| Z | 5,268 |
| Um olho Pr > Z | <.0001 |
| Dois olhos Pr > Z | <.0001 |
| Coeficiente Kappa Pesado | |
| Kappa | 0,618 |
| Erro padrão | 0,1208 |
| 95% limite de confiança superior | 0,3812 |
| 95% limite de confiança inferior | 0,8548 |
| Tamanho da amostra = 45 cães | |

Tabela 10- Observador 2 para olho Direito e Esquerdo

| Coeficiente Kappa | |
|----------------------------------|--------|
| Kappa | 0,4578 |
| Erro Padrão | 0,1159 |
| 95% Limite de confiança inferior | 0,2307 |
| 95% limite de confiança superior | 0,6849 |
| Test of H0: Kappa = 0 | |
| Erro padrão sobre H0 | 0,1067 |
| Z | 4,2912 |
| Um olho Pr > Z | <.0001 |
| Dois olhos Pr > Z | <.0001 |
| Coeficiente Kappa Pesado | |
| Kappa | 0,5436 |
| Erro padrão | 0,101 |
| 95% Limite de confiança inferior | 0,3456 |
| 95% Limite de confiança superior | 0,7416 |
| Tamanho da amostra = 45 cães | |

Tabela 11- Observador 3 para olho Esquerdo e Direito

| Coeficiente KAPPA | |
|----------------------------------|--------|
| Kappa | 0,6241 |
| Erro padrão | 0,1045 |
| 95% Limite de confiança superior | 0,4192 |
| 95% Limite de confiança inferior | 0,8289 |
| Teste de H0: Kappa = 0 | |
| Erro padrão sobre H0 | 0,1109 |
| Z | 5,6296 |
| Um olho Pr > Z | <.0001 |
| Dois olhos Pr > Z | <.0001 |
| Peso do coeficiente Kappa | |
| Peso Kappa | 0,6426 |
| Erro padrão | 0,1048 |
| 95% Limite de confiança superior | 0,4373 |
| 95% Limite de confiança inferior | 0,8479 |
| Tamanho da amostra = 45 cães | |

O efeito da temperatura foi significativo no olho direito como explicado no gráfico a seguir seguindo como base o padrão 1 como o ideal para a cristalização.

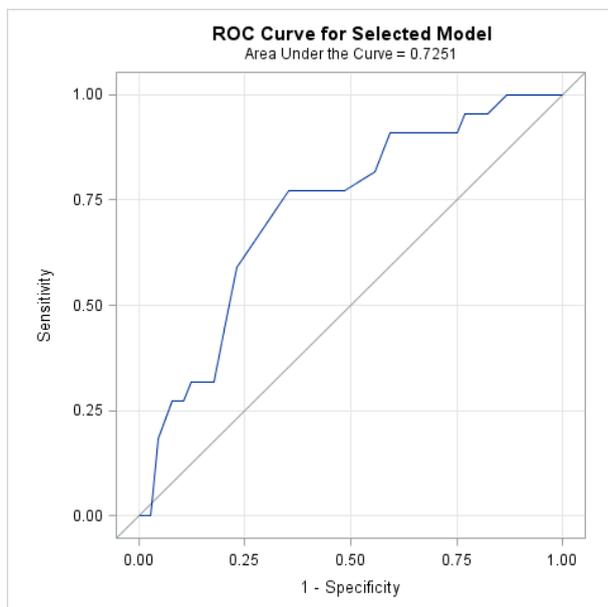


Figura 8- Efeito da Temperatura sobre o olho direito.

A relação do Teste lacrimal de Schirmer com um padrão ideal de cristalização, não foi significativa para o estudo no olho direito, mas foi significativa no esquerdo como demonstrado nas figuras abaixo:

Figura 9- Efeito da Temperatura sobre o olho esquerdo.

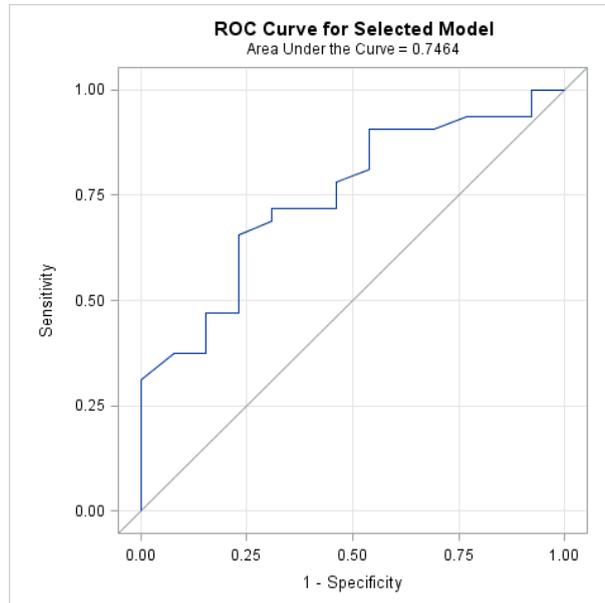


Figura 10- Efeito da temperatura sobre o olho esquerdo

Foi observado nos três grupos testados que, quanto maior a temperatura no olho direito menor a probabilidade de encontrar um padrão de cristalização do tipo 1, que seria o ideal. No olho esquerdo esses valores não foram tão significativos.

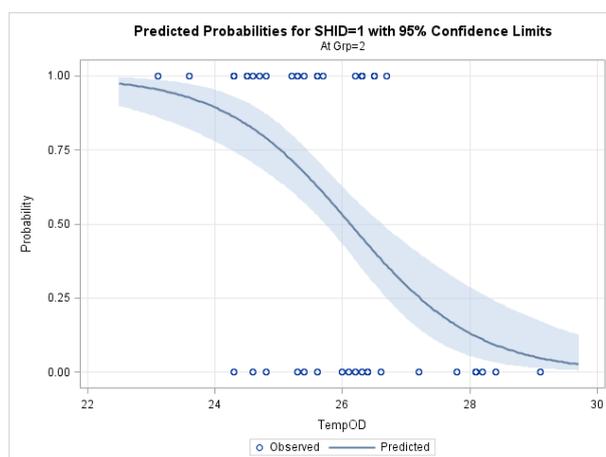


Figura 11- Efeito da temperatura sobre o padrão de cristalização ideal para o olho direito.

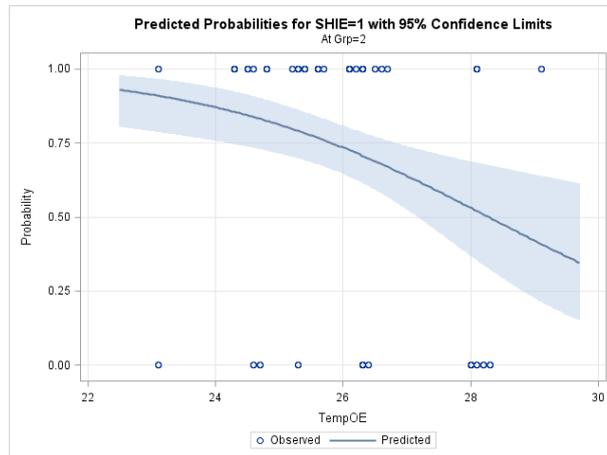


Figura 12- Efeito da temperatura sobre o padrão de cristalização ideal para o olho esquerdo

Temperatura do olho direito e esquerdo

A temperatura foi mais significativa no olho esquerdo do que no olho direito como demonstra a figura abaixo.

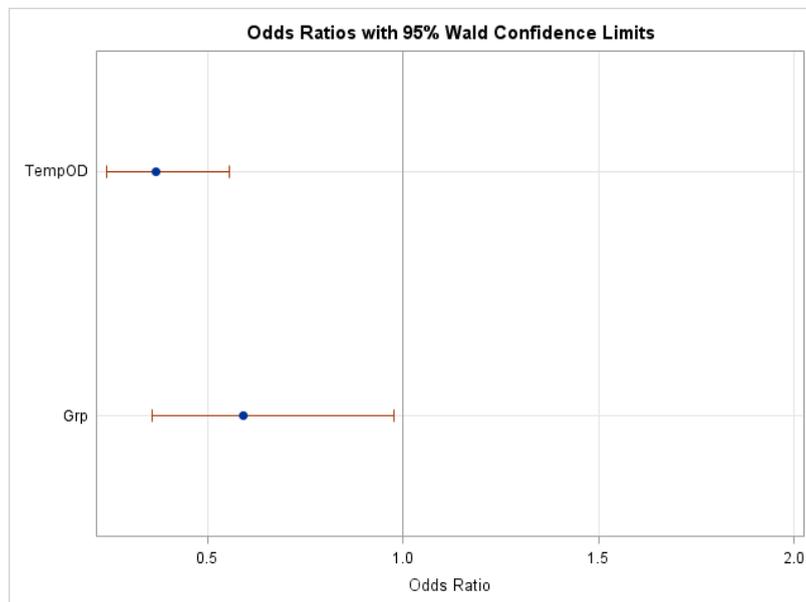


Figura 13- Temperatura Olho Direito

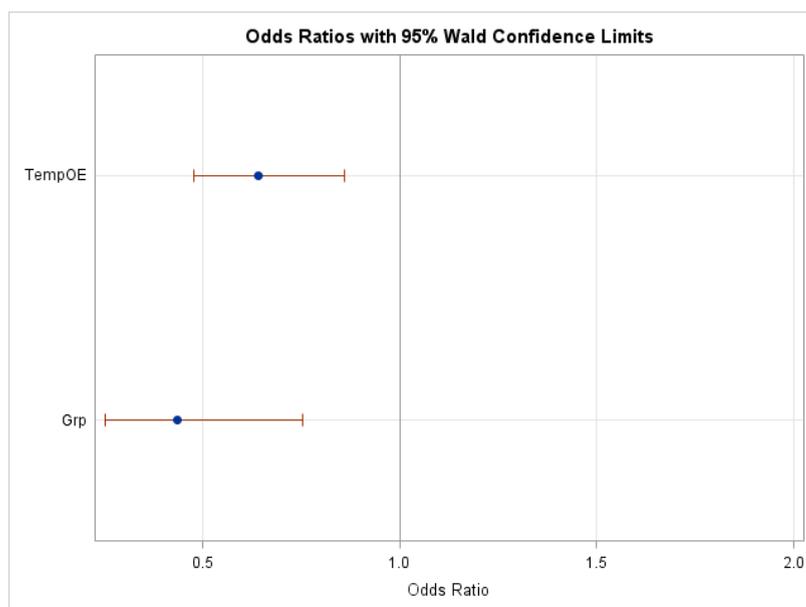


Figura 14- Temperatura Olho esquerdo

DISCUSSÃO

Os valores do teste lacrimal de Schirmer encontraram-se dentro dos valores de normalidade para a espécie no grupo 1 e 3 (22.3 e 24.0 mm/min), porém apresentaram média superior de 26.0 mm/min no grupo 2, as quais foram descritas por Martin et al.(2010) , Barabino et al. (2004) e Saito et al. (2001).

A facilidade para a realização do teste foi um dos fatores observados, já que os cães não apresentaram relutância às coletas e as amostras foram coletadas cuidadosamente, observando sempre as extremidades dos capilares, pois estes podem apresentar falhas de continuidade. Tais achados também foram citados por Felberg et al. (2008), que realizou o teste em humanos e relatou acidentes relacionados a técnica de coleta de lágrima para o exame de cristalização ou outras complicações relacionadas ao método.

Os animais avaliados nesta pesquisa apresentaram um padrão predominante de cristalização do tipo II, considerado de boa qualidade lacrimal para humanos, o que é esperado, mas não o ideal, trabalhando-se com animais hígidos e sem alterações oculares prévias,

qualidade confirmada pelos valores do teste lacrimal de Schirmer e avaliação da superfície ocular (FELBERG, et al., 2008).

Apesar da classificação do tipo de cristalização ser compatível com a de humanos, a morfologia dos cristais não é a mesma entre essas duas espécies. Essa diferença pode estar relacionada à estrutura das mucinas como o menor tamanho da cadeia O-Glicano dos cães em comparação a de humanos (ROYLE et al., 2008). Ou mesmo, devido às diferenças nas concentrações de sais e a relação entre eletrólitos e macromoléculas como proteínas e mucopolissacarídeos (ROLANDO et al., 1988; HORWATH et al., 2001; KOGBE et al., 1991). Não foram encontradas diferenças nos padrões de cristalização nas diferentes faixas etárias. De acordo com Sweeney et al. (2013), em humanos com a idade mais avançada, existe uma menor estabilidade do filme lacrimal devido a vários fatores, como, a produção da porção lipídica e de mucinas que diminui o tempo de ruptura do filme lacrimal.

As fotos retiradas em microscópio de luz com aumento de 40 vezes não foram significativas para o estudo pois o campo observado se mostra muito restrito e impede desta forma a classificação das cristalizações.

De acordo com Silva et al. (2013), a porção lipídica em neonatos é mais expressiva do que em adultos, o que é pensado para prevenir uma solução aquosa mais delgada, mas não foram observadas diferenças significativas quanto aos padrões de cristalização entre as três faixas etárias estudadas, visto que o animal mais novo do estudo já apresentava aos seis meses uma produção lacrimal fisiologicamente de um cão adulto.

O padrão de cristalização foi inicialmente proposto como uma interação de eletrólitos, especialmente sódio e cloreto com as mucinas e proteínas. Estudos demonstraram que o padrão do tipo I pode se transformar em um padrão do tipo IV com a adição de solução salina, o que sugere hiper osmolaridade do filme lacrimal (EVANS et al.).

Diferentes padrões de cristalização também estão relacionados às diferenças na concentração de sal e alteram reações entre eletrólitos e macromoléculas (HOWARTH et al., 2001), o que explica que as alterações podem se dar por influências na qualidade lacrimal.

De acordo com Howarth et al. (2001), corpos estranhos no fluido lacrimal, detritos, produtos cosméticos e fios podem agregar no centro da gota e prejudicar os padrões, o que indica que o ambiente da coleta, secagem e observação deve ser limpo, assim como um banho no animal antes da coleta se faz necessário.

CONCLUSÃO

O teste demonstrou ser de fácil execução, baixo custo e de fácil classificação podendo ser aplicada na rotina oftalmológica veterinária como um teste de triagem importante para a síndrome do olho seco em cães e outras afecções oculares relacionadas a deficiência qualitativa da lágrima.

Não foram observadas diferenças nos padrões de cristalização entre diferentes faixas etárias e entre machos e fêmeas. Também não houve relação entre os valores do teste lacrimal de Schirmer em relação às classificações da cristalização.

Estudos com câmaras climáticas seriam interessantes para mensurar a secagem da lágrima e verificar diferenças entre temperaturas no momento da cristalização e estudos se fazem necessários em animais com ceratoconjuntivite seca de forma a avaliar as diferenças nos padrões de cristalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES. R. C.; Avaliação do Filme lacrimal em trabalhadores de usina de açúcar e álcool de Rubiataba-GO. 2010 Pág 25.

BITTON. E. Tear ferning: A valuable tool in determining dry eye. **Optician** 21.09.2007.

BRANTMAN. K. R. et al. Tear Film VEGF in Dogs with Vascularizing Corneal Disease. 2013 Pág 17. 2013.

CHANDLER. A.J. et al. Preliminary evaluation of tear production in dogs hospitalized in na intensive care. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** 23(3) 2013, pp 274–279.

CULLEN. L. C. et al. Tear film breakup times in Young healthy cats before and after anesthesia. **Veterinary Ophthalmology** 2005, 3,159-165 .

DAVIDSON. H. J.; KUONEN. V. J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**. 2004 Março-Abril;7(2):71-7

EVANS. K. S. E.; NORTH R. V.; PURSLOW C. Tear ferning in contact lens wearers. **Ophthalmic and Physiological Optics** 2009:29 199-2004.

FELBERG, S.; CORDEIRO, H.; SATO, E.H.; MARTINI, D. F.; ,DANTAS, M.C.N.; MITIYAKI, R.E.; CORREA, P.E.D.; Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjogren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia** 2008:7(2): 228-33.

FOULKES G.N. The Correlation Between the tear film Lipid Layer and Dry eye Disease. **Survey of Ophthalmology**, 2007 Julho-Agosto;52(4):369-74.

HENDRIX, D. V. H. ; ADKINS, E. A.; WARD, D. A.; STUFFLE, J. N. A Investigation Comparing the Efficacy of Topical Ocular Application of Tacrolimus and Cyclosporine in Dogs. **Veterinary of Medicine International**.2011, Article ID 487592.

HORWATH. J.; ETTINGER. K.; BACHERNEGG. M.; BODNER. E.; SCHMUT. O. Ocular Ferning Test- Effect of Temperature and Humidity on Tear Ferning Patterns. **Ophthalmologica** 2001; 2015:102-107.

JOHNSON, M. E.; MURPHY, P. J .Changes in the film and ocular surface from dry eye syndrome. **Progress in Retinal and eye Research** 23(2004) 449-474.

KOGBE O.; LIOTET S.; TIFFANY J.M.; Factors responsible for tear ferning. **Cornea** 1991;10:433– 444.

LIMA. A. M. V. et al. Produção lacrimal e densidade de células caliciformes conjuntivais em cães da raça ShihTzu. **Ciência Animal Brasileira-Goiânia** v. 12, n.2., p. 353-358, abr./jun. 2011.

MANTELLI, F. et al. The Cellular Mechanisms of Dry Eye: from pathogenesis to Treatment. **Journal of cellular Physiology**. 2013.

PENG, C. C.; et al. Evaporation-driven instability of the pre corneal tear film. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2013.

ROLANDO, M. Tear mucus Ferning test and normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret International Jornal Ophtalmology**, v. 2, n. 4, p. 32-41. 1984.

ROYLE L.; MATTHEWS E.; CORFIELD A.; BERRY M.; RUDD P.M.; DWEK R.A. CARRINGTON S. D. Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. **Glycoconjugate journal**. 2008; 25(8):763-73.

SLATTER D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2005; 259-260.

SILVA. E. G.; SANDMEYER. L.S; GIONFRIDDO. J.R.; FERREIRA. F. M.; GALERA. P.D. Tear Production in canine neonates –evaluation using a modified Schirmer tear test. **Veterinary Ophtalmology** 2013: 16, 3, 175-179.

SWEENEY. D. F.; MILLAR. T. J.; RAJU. S. R. Tear film stability: a review. **Experimental Eye Research**, 117(2013) 28-38.

TSUBOTA. K.; TSENG. S. C. G. Anatomy and Physiology of Ocular Surface. In **Ocular Surface Diseases: Medical and Surgical Management** Ed. Holland EJ and Mannis MJ. Springer, p. 3-15, 2001.

WILLIAMS, D. L.; MANN, B. K. A Cross linked HA-Based Hydrogel Ameliorates Dry Eye Symptoms in Dogs. **Survey of ophthalmology**, volume 52, number4 July-August 2007.

