



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

MESTRADO

FELIPE BALDO LIMA

**AVALIAÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE CÃES: TRÊS
MÉTODOS DE COLHEITA E COMPARAÇÃO ENTRE DUAS ESCALAS DE
CLASSIFICAÇÃO**

**Salvador – Bahia
Março/2017**

FELIPE BALDO LIMA

**AVALIAÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE CÃES: TRÊS
MÉTODOS DE COLHEITA E COMPARAÇÃO ENTRE DUAS ESCALAS DE
CLASSIFICAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Arianne Pontes Oriá.

**Salvador – Bahia
Março/2017**

Nunca é alto o preço a pagar pelo privilégio de pertencer a si mesmo.
(Friedrich Nietzsche)

Dedico este trabalho a minha família, em especial, a minha mãe, sinônimo de lealdade, honestidade, garra, batalha. Com eles, aprendi o que é o verdadeiro amor, com eles, aprendi com quem posso contar de fato, com eles, aprendi que desistir jamais, com eles, aprendi que a vida é muito boa para se curtir, mas que ela não é fácil, não... São pessoas em que posso confiar e com as quais posso contar de verdade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, que me deu o dom da sabedoria, a força para caminhar, a persistência para seguir, e que, diariamente, me mostra que sou muito amado e abençoado por Ele. Honras e glórias a ti, Senhor, que és amor incondicional.

A minha família, que é meu alicerce, meu porto seguro; pessoas que me ensinaram tudo que formou o ser humano que sou hoje, minhas referências de boa índole, de batalha, de compaixão pelo próximo; e, em especial, a minha Mãe, o maior exemplo que tenho na vida, e por quem sempre quero fazer o melhor.

A Saulo, que caminhou ao meu lado durante grande parte desta pós-graduação, e quem, a cada tropeço, a cada desânimo, a cada vontade de desistir, me sacudia e mandava levantar a cabeça e olhar para frente, mirando sempre no objetivo, e me fez acreditar no meu potencial sempre. Obrigado, meu Amor.

Aos meus amigos que, aqui em Salvador, são a família que escolhi: Júlia e Rosi, minhas irmãs, Lobo, meu irmão, Mari que, mesmo em Recife, ouviu muitas lamentações e me consolou um bocado; e muitos outros, como os amigos dos grupos do *WhatsApp* que me fizeram por alguns momentos desopilar desta loucura.

A minha orientadora, Arianne Oriá, que, apesar dos muitos percalços durante o antigo e o novo projeto, acreditou em mim e me incentivou muito, e com a qual aprendi Oftalmologia Veterinária e me apaixonei pela especialidade.

Aos colegas da Oftalmo, em especial, Ana e Vini que deram sangue nessa reta final, Nay e Debi pelo apoio de sempre, e todos os demais sempre solícitos para todas as minhas dúvidas, pessoas que sabem que juntos somos mais fortes, um grupo reconhecidamente forte dentro da Escola de Medicina Veterinária da UFBA.

Por fim, ao CNPq, que subsidiou toda esta pesquisa por meio de auxílio financeiro via bolsa de estudos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático do FLPC e suas camadas, e as mucinas dispersas na camada aquosa.	16
Figura 2 - Tira de papel milimetrada inserida no fórnix conjuntival inferior durante a realização do teste da lágrima de Schirmer – I.	19
Figura 3 - Avaliação de integridade do epitélio corneano após instilação da fluoresceína em sala escura e com filtro azul de cobalto.	22
Figura 4 - Teste da lissamina verde para verificação de viabilidade celular.	22
Figura 5 - Macrofotografia do procedimento de colheita de lágrima realizado com o tubo microcapilar.	26
Figura 6 - Macrofotografia do procedimento de colheita de lágrima realizado com micropipeta.	26
Figura 7 - Tiras de papel milimetrado utilizadas para o teste da lágrima de Schirmer.	27
Figura 8 - Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo a classificação de Rolando (1984).	28
Figura 9 - Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo classificação de Masmali, Murphy e Purslow (2014).	29
Figura 10 - Diagrama esquemático do modelo proposto da cristalização da lágrima.	31
Figura 11 - Diagrama representativo da divisão dos grupos experimentais.	47
Figura 12 - Padrões de cristalização da lágrima em cães sadios de acordo com classificação de Rolando (1984).	50
Figura 13 - Padrões de cristalização da lágrima de cães sadios de acordo com classificação segundo Masmali, Murphy e Purslow (2014).	51
Figura 14 - Distribuição da frequência das classificações de acordo a escala de Rolando (1984).	53

Figura 15 - Distribuição da frequência das classificações de acordo a escala de Masmali, Murphy e Purslow (2014).....	54
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Critérios para a avaliação e classificação dos padrões de cristalização da lágrima segundo Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014).....48
- Tabela 2**- Descrição das frequências de tipo (Rolando, 1984) e grau (Masmali, Murphy e Purslow, 2014) em relação a um mesmo olho submetido a dois diferentes métodos de colheita52
- Tabela 3** - Frequências das classificações para Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014) para cristalização da lagrima em cães53

LISTA DE SIGLAS

- FLPC** – Filme lacrimal pré-corneano
- TCL** – Teste de Cristalização da Lágrima
- IgA** – Imunoglobulina A
- IgG** – Imunoglobulina G
- TLS** – Teste Lacrimal de Schirmer
- TLVF** – Teste lacrimal vermelho fenol
- CCS** – Ceratoconjuntivite seca
- BUT** – Tear break-up time
- SG** – Grupo Schirmer
- MPG** – Grupo micropipeta
- MCG** – Grupo microcapilar
- S2G** – Grupo Schirmer segunda colheita

BALDO-LIMA, Felipe, **Avaliação da cristalização da lágrima de cães**: Três métodos de colheita e comparação entre duas escalas de classificação. 2017, 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

RESUMO

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) é de importância vital para manutenção da saúde da superfície ocular, entretanto, trata-se de uma estrutura complexa e de baixo volume o que por vezes dificulta a sua avaliação, portanto, é importante entender de forma completa a fisiologia do filme lacrimal. Testes para a avaliação quantitativa do FLPC são utilizados de forma rotineira em Medicina Veterinária, contudo, testes que avaliem a qualidade da lágrima são desafiadores, por possuírem técnicas complexas ou que demandem alto custo de aparelhagem. O teste de cristalização da lágrima apesar de ser um teste classificado como laboratorial, possui aplicabilidade na rotina clínica, e pode trazer informações indiretas importantes em relação a composição bioquímica bruta do FLPC. Diversos estudos atestam a sua aplicabilidade e reprodutibilidade, o teste consiste em deixar uma gota de lágrima secar sobre uma lâmina de microscopia e avaliar o padrão de cristalização assumido pela amostra, padrão similar a “folhas de samambaia”. A classificação dos padrões de cristalização se dá de acordo com a densidade das formações dos cristais, e é comumente realizada a partir da escala proposta por Rolando, todavia, mais recentemente uma nova escala, a escala de Masmali, Murphy e Purslow, foi desenvolvida a fim de melhorar sua aplicação na rotina clínica. Não há um consenso na literatura em relação a metodologia a ser empregada para a obtenção de lágrima, e não existem relatos na literatura em relação ao uso do TC em cães. Foram avaliadas três metodologias de colheita de lágrima (schirmer, microcapilar e micropipeta) e aplicada duas escalas de classificação da cristalização em cães hípidos. A colheita de lágrima para o TC demonstrou-se possível e é factível a utilização de ambas escalas na classificação do fenômeno de cristalização em cães.

Palavras-chave: olho, superfície ocular, Rolando, Masmali, composição lacrimal, filme lacrimal.

BALDO-LIMA, Felipe, **Tear ferning evaluation in dogs: Three sampling techniques and comparison between two grading scales.**2017, 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

ABSTRACT

The pre-corneal tear film (PCTF) is vitally important for the ocular surface health maintenance. However, this is a complex structure and of low volume that, sometimes, makes it difficult to evaluate. Therefore, the complete understand of the tear film physiology is important. Tests for quantitative assessment of PCTF are routinely used in veterinary medicine; however, tests for qualitative evaluation of tear are challenging, due to the complex techniques and the expensive equipments requirements. Despite the tear ferning test is considered a laboratorial technique, the results demonstrate that its applicability in the clinical routine can indirectly suggest important informations about the gross biochemistry composition of PCTF. Several studies describe its applicability and reproductibility, that consist in put a tear drop over a microscope slide and wait for drying to evaluate the ferning pattern assumed by the sample, similar to “fern leaves”. The classification of ferning pattern is performed according to the density of cristal formation, and is commonly performed by the grading proposed by Rolando. Recently, a new ferning grading was proposed by Masmali, Murphy and Puslow in order to improve the applicability of the test in the clinical routine. There is no consensus in the literature regarding the methodology for tear sampling, and there are no reports in the literature of ferning test use in dogs. Three tear sampling methodologies were assessed (schirmer, microcapillary tubes and micro-pipette) and applied to two ferning grading in healthy dogs. The tear sampling for ferning test was possible and the use of both ferning grading was feasible in dogs.

Keywords: Eye, ferning, Masmali, ocular surface, Rolando, tear components, tear film.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I.....	14
REVISÃO DE LITERATURA	
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 FILME LACRIMAL PRÉ-CORNEANO	16
2.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DA LÁGRIMA.....	17
2.3 AVALIAÇÃO DA LÁGRIMA	18
2.3.1 Avaliação quantitativa.....	18
2.3.2 Avaliação qualitativa.....	20
2.3.2.1 Corantes vitais.....	20
2.3.2.2 Osmolaridade	22
2.3.2.3 Teste de cristalização da lágrima ou <i>tear ferning test</i>	23
2.3.2.3.1 Breve Histórico	23
2.3.2.3.2 Aplicação da cristalização em Medicina e Medicina Veterinária	24
2.3.2.3.3 Teste de cristalização da lágrima.	25
2.3.2.3.4 Metodologias de colheita de lágrima	29
2.3.2.3.4 O fenômeno da cristalização	30
3 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO II	39
AVALIAÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE CÃES: TRÊS MÉTODOS DE COLHEITA E COMPARAÇÃO ENTRE DUAS ESCALAS DE CLASSIFICAÇÃO	
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1 OBJETIVOS.....	42
1.1 GERAIS	42

1.2 ESPECÍFICOS	42
2 INTRODUÇÃO	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Considerações Éticas	44
3.2 Animais.....	45
3.3 Grupos Experimentais.....	45
3.4 Processamento e avaliação das amostras	47
3.5 Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO I – ARTIGO SUBMETIDO	61

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) é o responsável pela manutenção da saúde da superfície ocular e pálpebras; seus componentes carregam nutrientes, distribuem leucócitos para a córnea e promovem limpeza e proteção física da superfície. Dessa forma, o FLPC é considerado como defesa primária do olho (GRAHN; STOREY, 2004; ROYLE et al., 2008).

As avaliações das deficiências do componente aquoso da lágrima, denominadas de quantitativas, possuem metodologias consagradas na medicina e na medicina veterinária, sendo a mais utilizada o teste da lágrima de Schirmer (TLS) (VAN KAMPEN; JAMES, 1971; SWEENEY et al., 2013). As deficiências qualitativas, decorrentes da alteração da composição bioquímica ou biofísica do FLPC, levam à instabilidade e são clinicamente mais sutis, por esse motivo, seu diagnóstico é mais laborioso e delicado (SWEENEY; MILLAR; RAJU, 2013; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

Alguns testes para a avaliação da qualidade da lágrima, como citologia, densidade de células caliciformes, análise proteômica, osmolaridade, já foram descritos em algumas espécies, entretanto são testes laboratoriais que congregam maior complexidade e maiores custos, e há que ser considerado que o baixo volume da lágrima obtido os torna mais desafiadores (HENDRIX, 2005; FELBERG et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; MCGINNIGLE; NAROO; EPERJESI, 2012). Contudo, o teste de cristalização da lágrima (TCL), mesmo sendo método laboratorial, é rápido, de baixo custo, fácil exequibilidade e pode indicar, de maneira indireta, propriedades bioquímicas do FLPC.

O entendimento do TCL tem sido discutido amplamente na medicina, e, inicialmente, acreditava-se estar relacionado com a quantidade de mucina do filme lacrimal (TABBARA; OKUMOTO, 1982; ROLANDO, 1984; NORN, 1987). No entanto, estudos posteriores a notaram que a cristalização do filme lacrimal está ligada, diretamente, à composição iônica e, indiretamente, à relação íons/proteínas do FLPC, conseqüentemente, à sua osmolaridade, que se reflete diretamente na qualidade do FLPC (PEARCE; TOMLINSON, 2000; BARABINO; CHEN; DANA, 2004; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

Na medicina, o teste já foi utilizado em diversos fluidos corporais como o muco cervical e saliva (PAPANICOLAOU, 1946), para diagnóstico de período fértil, lágrima, para ceratoconjuntivite seca (CCS), além de diversas doenças oculares, genéticas e com repercussão sistêmica (ABOU-SHABANAH; PLOTZ, 1957; ROLANDO, 1984; FILIPELLO

et al.; 1992; HERRERAS et al., 1992; MARAGOU et al., 1996; JOHNSON; MURPHY, 2004; VERSURA, et al., 2007).

A escala desenvolvida por Rolando (1984) a partir de olhos normais foi utilizada em estudos anteriores relacionados à cristalização da lágrima, entretanto, algumas dificuldades foram descritas, porquanto as variações dos padrões de cristalização parecem ser maiores que os quatro tipos propostos pela escala do autor. Diante dessa lacuna, Masmali, Murphy e Purslow (2014) desenvolveram outra escala a fim de facilitar a aplicação na rotina clínica. Trata-se de teste já descrito em medicina veterinária, na espécie canina (COASSIN et al. 2005; GOUVEIA et al. 2013), na espécie equina (SILVA et al., 2016) e em camelos (AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014), no entanto, até o presente momento, não é de conhecimento do autor a existência de trabalhos quanto à comparação entre metodologias de colheita, que podem interferir na concentração de proteína do FLPC (OHASHI; DOGRU; TSUBOTA, 2006; POSA et al., 2013), moléculas que participam de forma indireta na formação dos cristais da lágrima. O TCL é subjetivo, exequível e pode trazer informações indiretas quanto à composição da lágrima e higidez da superfície ocular, portanto, alterações no padrão de cristalização podem sugerir início de doença da superfície ocular (TABBARA; OKUMOTO, 1982; GOLDING; BRENNAN, 1989).

O presente trabalho tem como objetivo descrever os achados do TCL em cães hígdos com três metodologias de colheita de lágrima e classificá-las segundo as escalas propostas por Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O filme lacrimal possui composição complexa e funções primordiais para a manutenção da saúde da superfície ocular e anexos (DAVIDSON; KOUNENT, 2004). Podem-se elencar como principais funções do FLPC a manutenção da superfície lisa para refração da luz, lubrificação e nutrição das pálpebras, lubrificação da conjuntiva e córnea, nutrição da córnea e transporte de subprodutos metabólicos da superfície corneana e conjuntival, remoção de materiais estranhos da córnea e conjuntiva, e por fim, defesa primária da superfície ocular a agentes patogênicos por possuir substâncias antibacterianas e inibir a aderência destes agentes (LAMBERTS, 1994). Portanto faz-se necessário o estudo da produção, composição e função dos componentes do FLPC assim como conhecer e entender as metodologias de avaliação quantitativa e qualitativa, itens a serem abordados nesta revisão de literatura.

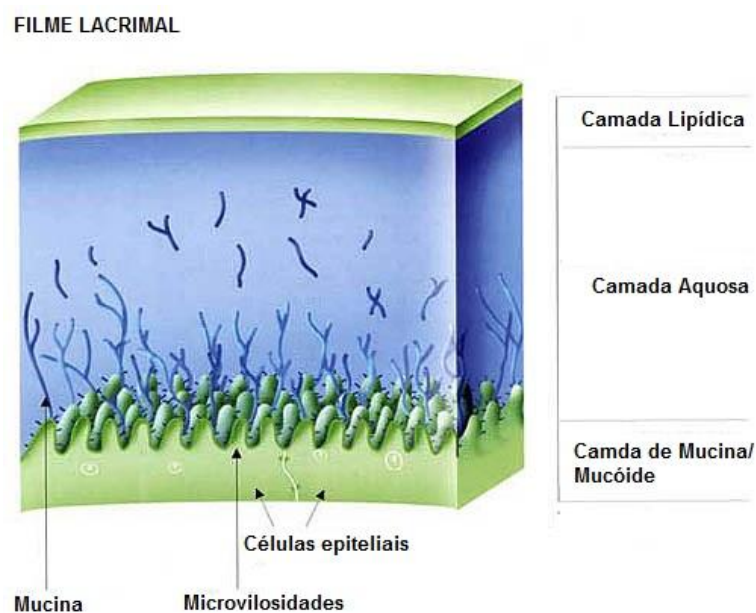
2.1 FILME LACRIMAL PRÉ-CORNEANO

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) é descrito como estrutura líquida complexa, trilaminar, que, na sua camada mais externa, tem uma fase lipídica, além de uma camada intermediária aquosa e uma camada mais interna e intimamente ligada à córnea, denominada camada mucoide. Alguns autores preconizam que a fase aquosa e a mucoide figuram como únicas camadas nominadas de gel-mucina porquanto seus componentes possuem íntima interação (Figura 1) (ROYLE et al., 2008; WILLIAMS, 2008).

Esse complexo possui ligação com a conjuntiva bulbar e a córnea, e cuja principal função é a manutenção da saúde da superfície ocular por proteção física, mantendo-a sempre lubrificada, além de participar no transporte de nutrientes e células de defesa para a região da córnea que, por ser avascular, necessita desse aporte externo para manutenção da sua higidez (RIBEIRO et al., 2008; WILLIAMS, 2008).

Sabe-se, ainda, que são inúmeros os fatores que podem alterar a composição e a dinâmica do FLPC como anomalias de pálpebras, inflamação da conjuntiva, idade, ciclo estral e sexo (UNCU et al., 2006; BEECH et al., 2013), o que torna o seu estudo complexo. Além das variáveis capazes de influenciar a dinâmica do FLPC, o seu pequeno volume e as metodologias de avaliações disponíveis para seu estudo tornam-se também fatores limitantes para seu emprego na rotina clínica (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

Figura 1– Desenho esquemático do FLPC e suas camadas, e as mucinas dispersas na camada aquosa.



Fonte: Modificado de Allergan

2.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DA LÁGRIMA

A camada mais externa do FLPC é composta por lipídeos, que são secretados por estruturas tubulares acinares situadas no tarso palpebral, denominadas glândulas de meibômio. Essas glândulas são acionadas de maneira física, sendo, a cada incursão palpebral, estimulada a secreção desses lipídeos que compõem a lágrima, além de serem efetuados estímulos neurais e hormonais, por enquanto ainda não bem elucidados. Essa camada possui cerca de 0,1µm de espessura e é composta por mistura de ácidos graxos, triglicerídeos e ésteres. Sua porção mais externa é composta por lipídeos não polares e sua porção mais interna, por lipídeos polares. A principal função da camada lipídica do FLPC é evitar a evaporação do componente intermediário aquoso, e a deficiência de tal camada é condição importante na patogênese do olho seco em cães (WOLFF, 1946; WILLIAMS, 2008).

Denominada fase aquosa e com aproximadamente 6 a 10µm de espessura, a camada intermediária do FLPC é produzida pela glândula lacrimal principal, localizada dorso lateralmente à pálpebra superior, mas também pela glândula da membrana nictitante. A secreção pela glândula lacrimal principal está sob controle neural e hormonal e possui inervação parassimpática e simpática, com arco-reflexo identificado a partir dos nervos sensoriais na córnea de ativação parassimpática eferente, e nervos simpáticos que se originam do núcleo motor parassimpático do nervo facial e passam através do nervo trigêmeo para a glândula lacrimal. Os neurotransmissores envolvidos nessa secreção são a acetilcolina, os peptídeos intestinais vasoativos, a substância P, a noradrenalina e os peptídeos relacionados ao gene da calcitonina, entretanto a acetilcolina e a noradrenalina geram os estímulos mais potentes para secreção de água e eletrólitos lacrimais (KRENZER et al., 2001; WILLIAMS, 2008). Os hormônios andrógenos são estimuladores potentes da produção lacrimal, dessa forma, efeitos de gênero e relacionados com a idade são fatores a serem considerados relativamente à produção de lacrimal (KRENZER et al., 2001; SCHAUMBERG et al., 2001; UNCU et al., 2006).

Entre os componentes da porção aquosa do FLPC, podem-se elencar vários eletrólitos, proteínas, vitaminas, fatores de crescimento, peptídeos hormonais, imunoglobulinas e citocinas, que desenvolvem em conjunto o papel de proteção da superfície ocular, manutenção da estrutura do filme lacrimal e da pressão osmótica, funcionando também como tampão para conservação do pH.

A camada denominada mucosa é formada por diversas mucinas, imunoglobulinas, ureia, sais, glicose, leucócitos, debris celulares e enzimas. As células caliciformes presentes na

conjuntiva são responsáveis por sua secreção, e a sua principal função é a ancoragem da porção aquosa do FLPC ao epitélio corneano hidrofóbico, além de inibir a aderência de bactérias. No cão, as células caliciformes são encontradas em maior quantidade na conjuntiva bulbar e no fórnix conjuntival (ROYLE et al. 2008; WILLIAMS, 2008; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

Estudos mais recentes mostram que a distinção entre as camadas aquosa e de mucina não é correta. O epitélio corneano possui superfície de glicocálix composta de mucinas, como MUC 1, 3, 4, 12, 13 e 16 que atravessam a membrana e preenchem a camada aquosa com pequenas mucinas solúveis (MUC 7 e 9), o que forma, portanto, um gel mucoso ou gel mucina onde também se encontram as mucinas MUC 2, 5, 6, e 19 (GIPSON; HORI; ARGUESO, 2004; ROYLE et al. 2008; WILLIAMS, 2008).

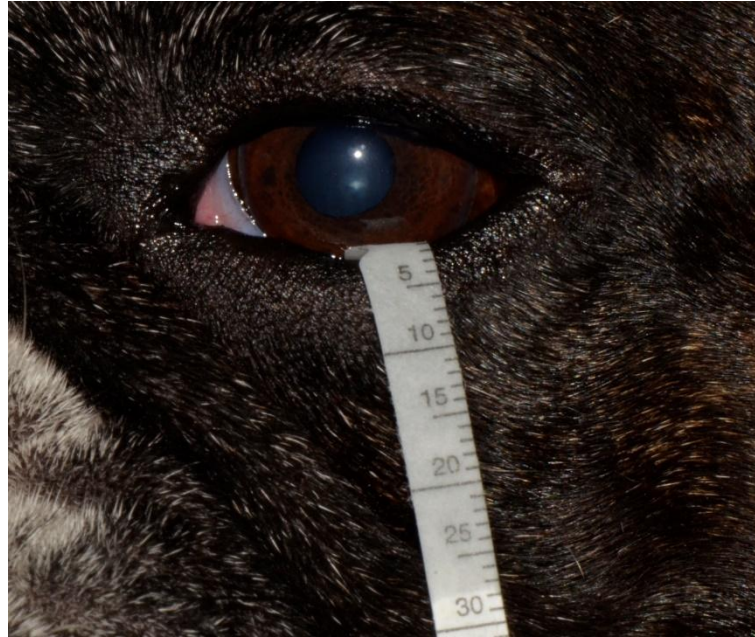
2.3 AVALIAÇÃO DA LÁGRIMA

2.3.1 Avaliação quantitativa

O teste da lágrima de Schirmer (TLS) é um teste de avaliação quantitativa da produção lacrimal e uma importante ferramenta na oftalmologia veterinária para o diagnóstico de doenças associadas à produção do fluxo da lágrima, principalmente aquelas que envolvem a córnea e a conjuntiva (WILLIAMS, 2008; GELLAT, 2013).

O TLS utiliza tira de papel padronizada inserida no saco conjuntival ventral, durante 60 segundos, e o comprimento de papel umedecido é medido por escala milimétrica presente na tira. O TLS pode ser subdividido em TLS-I e TLS-II. No TLS-I, o resultado compreende a mensuração basal e reflexa da porção aquosa do filme lacrimal. Já o TLS-II avalia a produção de lágrima basal após a aplicação de anestésico tópico, e seus valores preditivos são utilizados em animais com ulceração da córnea que não toleram o TLS-I (Figura 2).

Figura 2 - Tira de papel milimetrada inserida no fórnix conjuntival inferior durante a realização do teste da lágrima de Schirmer – I.



Fonte: Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFBA (2016).

Valores superiores a 15mm/min no TLS-I em cães são considerados normais (WEICHSLETER, 2008). A maioria dos autores concordam que os valores médios com as tiras de teste padrão são de 15 a 25mm/min, porém podem existir pequenas variações entre raças (SAITO; KOTANI, 1999; HAMOR et al., 2000; KOBASHIGAWA et al. 2015), em diferentes horários do dia (HARTLEY; WILLIAMS; ADAMS, 2006), por idade (KASWAN et al., 1989; HARTLEY et al., 2006) e entre animais castrados e inteiros (HARTLEY, WILLIAMS; ADAMS, 2006), mas não inferiores a 15 ou superiores a 25mm/min.

Animais com valores entre 11 e 14mm/min podem apresentar ceratoconjuntivite seca (CCS) inicial ou subclínica, com hiposecreção, devendo-se avaliar os sinais clínicos para fechar o diagnóstico. Valores entre 6 e 10mm/min são indícios de CCS moderada ou leve, mas, quando os valores são menores ou iguais a 5mm/min, caracteriza-se CCS severa (PEIFFER Jr., PETERSEN-JONES, 2000; MOORE et al., 2001; GIULIANO; MOORE, 2007).

O teste da lágrima do vermelho de fenol (TLVF) é usado como uma alternativa principal em animais silvestres e felinos, no qual a extremidade de um fio de algodão, impregnado com vermelho de fenol, é colocada no fórnix conjuntival durante 15 segundos (HOLT; ROSENTHAL; SHOFER, 2006; LANGE; LIMA; MONTIANI-FERREIRA, 2012;

ORÍ et al., 2015). O princípio da técnica é similar ao TLS-I e a medição da porção molhada é feita imediatamente após esse período com um paquímetro digital.

Outro teste de produção lacrimal recentemente introduzido na rotina oftálmica é a tira endodôntica de papel absorvente, originalmente utilizado na odontologia por sua propriedade absorviva. Consiste na inserção da ponta de papel no fórnix conjuntival e após o período de 15 ou 60 segundos, a depender da espécie animal em avaliação, a porção umedecida é mensurada com o auxílio de um paquímetro digital (LANGE; LIMA; MONTIANI-FERREIRA, 2012; ORÍ et al.,2015).

2.3.2 Avaliação qualitativa

A deficiência do FLPC também advém de outras porções que não a fase aquosa deste. A enfermidade denominada olho seco ou ceratoconjuntivite seca também se dá por distúrbios das outras porções que levam a instabilidade do FLPC e, conseqüentemente, sua disfunção (MANNING; WEHRLY; FOULKS, 1995; GELLAT, 2013).

Distúrbios nas glândulas de meibômio são relacionadas a evaporação excessiva do FLPC. Além disso, secreção de lipídeos alterados podem também ser tóxicos para o epitélio corneano. blefarites, blefarosconjuntivites e meibomites recorrentes podem prejudicar a secreção correta do componente lipídico do FLPC. Alterações na secreção de mucina também se relacionam com instabilidade do FLPC. Nos cães o olho seco por deficiência de mucina pode ocorrer de forma espontânea ou decorrente de inflamações crônicas da conjuntiva onde se encontram as células calciformes responsáveis pela produção desta porção (MANNING; WEHRLY; FOULKS, 1995; GELLAT, 2013). Para tanto, alguns testes clínicos ou laboratoriais devem ser empregados para assegurar a qualidade do FLPC tais como: utilização de corantes vitais, aferição de osmolaridade e o teste de cristalização da lágrima ou *tear ferning test*.

2.3.2.1 Corantes vitais

Os três corantes vitais mais utilizados na medicina e na medicina veterinária são a fluoresceína, o rosa bengala e a lissamina verde. A fluoresceína (Figura 3) é um corante hidrofílico e, por esse motivo, cora primariamente a película lacrimal, como a primeira camada. Como o epitélio corneano é hidrofóbico, a fluoresceína, em uma córnea íntegra, não irá se aderir, entretanto, caso haja descontinuidade dessa camada, a seguinte, denominada estroma, que é hidrofílica, será corada pelo corante, o que torna este teste diagnóstico

definitivo de ulcerações corneanas (KIM, 2000). Além disso, a fluoresceína pode ser utilizada para verificação da patência dos ductos de drenagem da lágrima pelo teste de Robert Jones, assim como para a estabilidade do filme lacrimal através do teste de ruptura do filme lacrimal (GELLAT, 2013). A fluoresceína pode ainda ser utilizada para verificar a estabilidade do filme lacrimal através do tempo de ruptura do filme lacrimal ou *tear break-up time*, que consiste em depositar sobre o olho do animal uma gota de fluoresceína e o examinador munido de um biomicroscópio com luz azul cobalto mantendo as pálpebras do paciente abertas, verifica o tempo de dissociação do corante sobre a superfície corneana, ou seja, a quebra do filme (SWEENEY; MILLAR; RAJU, 2013). No cão, a média de o teste varia de $19,7 \pm 5$ a $21,53 \pm 7,42$ segundos (MOORE, 1990, SAITO; KOTANI, 2001). Este teste avalia de forma indireta a deficiência de componentes responsáveis pela estabilidade do FLPC como a mucina e os lipídeos (GELLAT, 2013).

O corante rosa bengala e a lissamina verde são corantes supravitais utilizados para corar tecidos necróticos, degenerados ou desvitalizados, tratam-se de corantes importantes para detecção de deficiência celular corneana e conjuntival. A lissamina verde (Figura 4) é um corante orgânico produzido sinteticamente e possui padrão de coloração muito similar ao rosa bengala, entretanto possui algumas vantagens, tais como baixa toxicidade e maior tolerabilidade pelo paciente (MANNING; WEHRLY; FOULKS, 1995; GELLAT, 2013).

Figura 3 - Avaliação de integridade do epitélio corneano após instilação da fluoresceína em sala escura e com filtro azul de cobalto. Teste de fluoresceína negativo.



Fonte: Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFBA (2016).

Figura 4 - Teste da lissamina verde para verificação de viabilidade celular. Teste negativo.



Fonte: Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFBA (2016).

2.3.2.2 Osmolaridade

A osmolaridade do FLPC é representada pela concentração de cátions e ânions dissolvidos em sua porção aquosa. Esse fator pode ser influenciado por diminuição da produção lacrimal e por excesso de evaporação, o que leva a uma instabilidade do filme e

resulta em hiperosmolaridade (MURUBE, 2006; BAUDOUIN, 2007; DAVIS; TOWNSEND, 2011).

A hiperosmolaridade do FLPC induz as células epiteliais a expressarem citocinas inflamatórias e, conseqüentemente, a ativação das células inflamatórias epiteliais, e leva à apoptose das células conjuntivais, incluindo as células caliciformes e células corneanas. Portanto, a hiperosmolaridade é um fator crítico de doença da superfície ocular (DAVIS; TOWNSEND, 2011; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014; BEST; HENDRIX; WARD, 2015).

Testes como o tempo de ruptura do filme lacrimal '*tear break-up time*' (BUT) e o teste de cristalização da lágrima ou '*tear ferning test*' têm sido associados com a osmolaridade do FLPC (LIM et al., 2009; MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014). Além desses dois testes, avaliações com equipamentos próprios para a osmolaridade, desenvolvidos com microeletrodos que podem ser inseridos na pálpebra, já estão disponíveis no mercado e com estudos sendo desenvolvidos em cães, gatos e equinos (DAVIS; TOWNSEND, 2011).

2.3.2.3 Teste de cristalização da lágrima ou *tear ferning test*

2.3.2.3.1 Breve Histórico

Facuory e Vauquelin (1791) são os pioneiros na descrição do fenômeno de cristalização que observaram ao deixar a lágrima secar sobre uma superfície a formação de cristais, no entanto, o fenômeno ficou esquecido por aproximadamente 150 anos (MURUBE, 2004) quando em 1946 Papanicolau utilizou os princípios do fenômeno na ginecologia, em muco cervical, que então começou a ser utilizado para diagnóstico de período fértil, ovulação, menopausa. Tabbara e Okumoto (1982) a partir dos estudos de cristalização da ginecologia aplicaram o princípio à oftalmologia, onde caracterizaram conjuntivite penfigóide cicatrizante da não cicatrizante pela modificação do padrão de cristalização. Em 1984, Rolando, na Itália desenvolveu uma escala de quatro tipos balizada na densidade da formação dos cristais e, sendo esta dependente da quantidade de mucina.

Norn em 1987 criou nova classificação, balizada na área coberta pelos cristais e na formação de ângulos retos, oblíquos e agudos que partem dos ramos primários, secundários e

terciários das formações das cristalizações, além disso, tal classificação necessita da adoção de complexa fórmula aritmética para interpretação dos resultados.

Cientificamente a escala de Rolando tem sido utilizada, sua reprodutibilidade atestada, entretanto não foi desenvolvida para aplicação clínica e sim para observação, logo, a partir de dificuldades da interpretação nos padrões de cristalização propostos por Rolando; Masmali, Murphy e Purslow (2014) rediscutiram o entendimento da aplicação da técnica a partir da composição do filme lacrimal, em que atribuem a cristalização como dependente da quantidade de íons e não de mucina como se acreditava anteriormente, além disso, desenvolveram uma escala de classificação por meio de regressão linear, que resultou em uma grade de cinco graus, a fim de melhorar as condições de utilização clínica de rotina da técnica.

2.3.2.3.2 Aplicação da cristalização em Medicina e Medicina Veterinária

Em medicina o teste de cristalização tem estudos variados em diversos fluidos corporais como saliva (MARAGOU et al., 1996), lágrima, muco cervical (PAPANICOLAU, 1946) e suor. Na ginecologia o emprego do fenômeno de cristalização a muco cervical e vaginal já foi utilizado para diagnóstico de gravidez, período fértil e menopausa (PAPANICOLAU, 1946; SRINIVASAN; JOYCE; JONES, 2007). Na oftalmologia, têm-se relatos do emprego do teste de cristalização em pacientes com desordens oftálmicas diversas, sejam elas primárias ou secundárias a doenças sistêmicas, tais como, ceratoconjuntivite seca (ROLANDO, 1984), fibrose cística (ROLANDO; BALDI; CALABRIA, 1987), síndrome de Sjögren (VAIKOUSSIS; GEORGIU; NOMICARIOS, 1994), intolerância ao uso de lentes de contato (KOGBE; LIOTET, 1987; LI et al. 2007), qualidade da lágrima em pacientes com pterígio antes e após cirurgia de excisão (LI et al. 2007).

Na medicina veterinária estudos recentes aplicaram o fenômeno de cristalização para diagnóstico de prenhes em vacas (SKALOVA; FEDOLOVA; BRANDLOVA, 2013), entretanto, não existem relatos da aplicação da técnica para diagnóstico de doenças em animais, no entanto, Coassin e colaboradores (2005) estudaram a evolução do teste de cristalização em cães com CCS iatrogênica tratados com fator de crescimento neural tópico e notaram melhora da cristalização do tipo IV para o tipo II após tratamento. As aplicações da técnica em oftalmologia veterinária limitaram-se a descrever padrões de cristalização em caninos (GOUVEIA et al. 2013), equinos (SILVA, et al. 2016) e camelos (AKHATAR;

MASMALI; KHAN, 2014) hígidos, sem considerar metodologia de colheita ou escala de classificação aplicada.

2.3.2.3.3 Teste de cristalização da lágrima.

O TCL é descrito como simples e de baixo custo para avaliação clínica da qualidade da lágrima e pode inferir um nível de composição bioquímica bruta a partir de seu resultado. A sua subjetividade tem sido questionada no meio científico, porém estudos recentes atestam sua reprodutibilidade e confiabilidade (FELBERG et al., 2008; MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014).

A técnica consiste em depositar uma gota de lágrima em lâmina de microscópio e deixá-la secar em temperatura e umidade relativa do ar monitorizadas, com variação de 21–26 °C e 50–60%, respectivamente. Após secagem, o padrão de cristalização é avaliado e classificado segundo escala predeterminada. Além da temperatura e umidade, outros fatores influenciam o padrão de cristalização da lágrima como: sujidades, teor de muco, taxa de evaporação (HORWATH et al. 2001; MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014a).

Para a colheita da lágrima, diversos estudos já foram realizados e alguns diferentes materiais já foram utilizados, a exemplo dos tubos capilares de vidro (Figura 5), espátulas, pipetas (Figura 6), papeis de Schirmer (Figura 7). No entanto, para o teste em questão o método classicamente utilizado é o tubo capilar de vidro (GOUVEIA et al. 2013; POSA et al., 2013; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

Figura 5 - Macrofotografia do procedimento de colheita de lágrima realizado com o tubo microcapilar.



Fonte: Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFBA (2016).

Figura 6 - Macrofotografia do procedimento de colheita de lágrima realizado com micropipeta.



Fonte: Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFBA

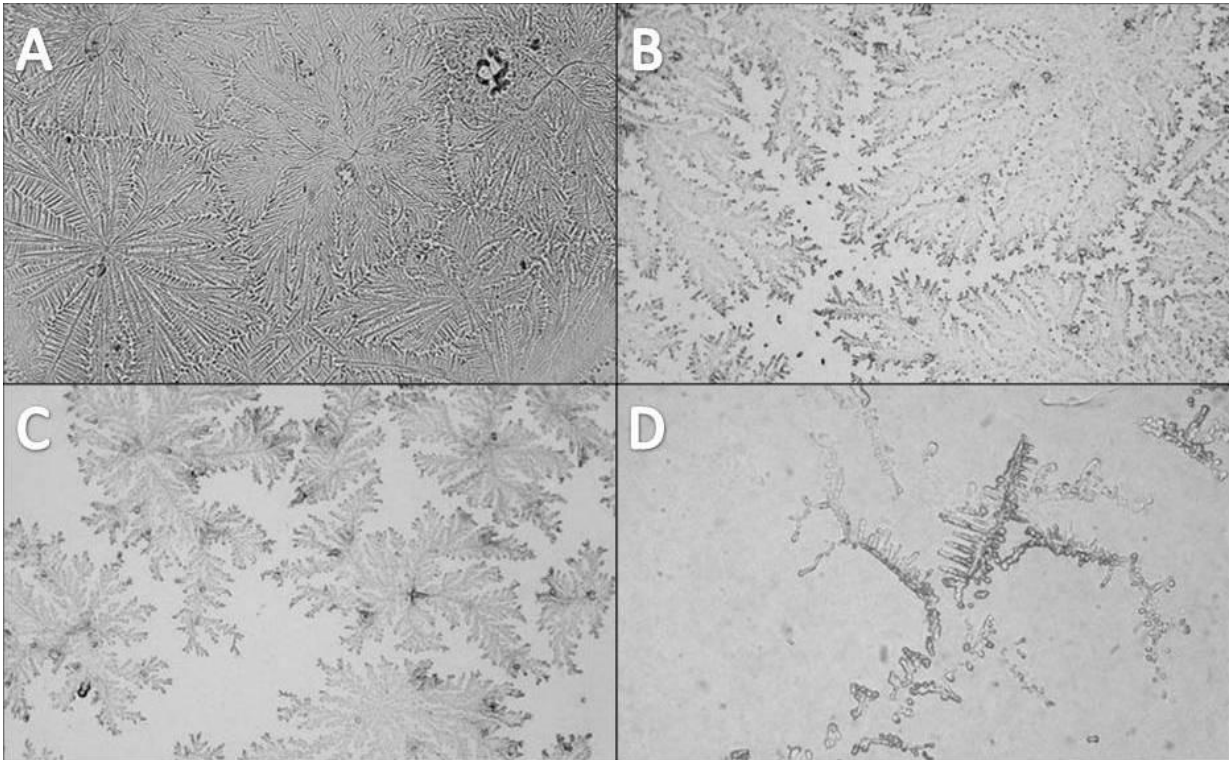
Figura 7 - Tiras de papel milimetrado utilizadas para o teste da lágrima de Schirmer.



Fonte: **Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFBA**

A depender da composição do FLPC, diversos padrões de cristalização podem ser observados, no entanto olhos saudáveis devem produzir padrões de cristalização densos e completos, enquanto olhos com deficiência em componentes lacrimais produzem padrões grosseiros de cristalização (MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014; MASMALI et al., 2015). Rolando (1984) descreveu quatro tipos de padrões de cristalização, onde: no tipo I a cristalização da lágrima origina “árvores” de cristais multirramosos, sem espaços vazios entre as arborificações (Figura 8-A); o tipo II apresenta ramos mais curtos e as arborificações são menores, com a aparição de espaços entre elas (Figura 8-B); Já no tipo III os espaços entre as arborificações são amplos, e as ramificações são raras, com presença de cristais grosseiros (Figura 8-C); e o tipo IV é caracterizado por grumos de cristais que raramente formam pequenas arborificações, ou pela ausência total de cristalização (Figura 8-D).

Figura 8 - Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo a classificação de Rolando (1984).

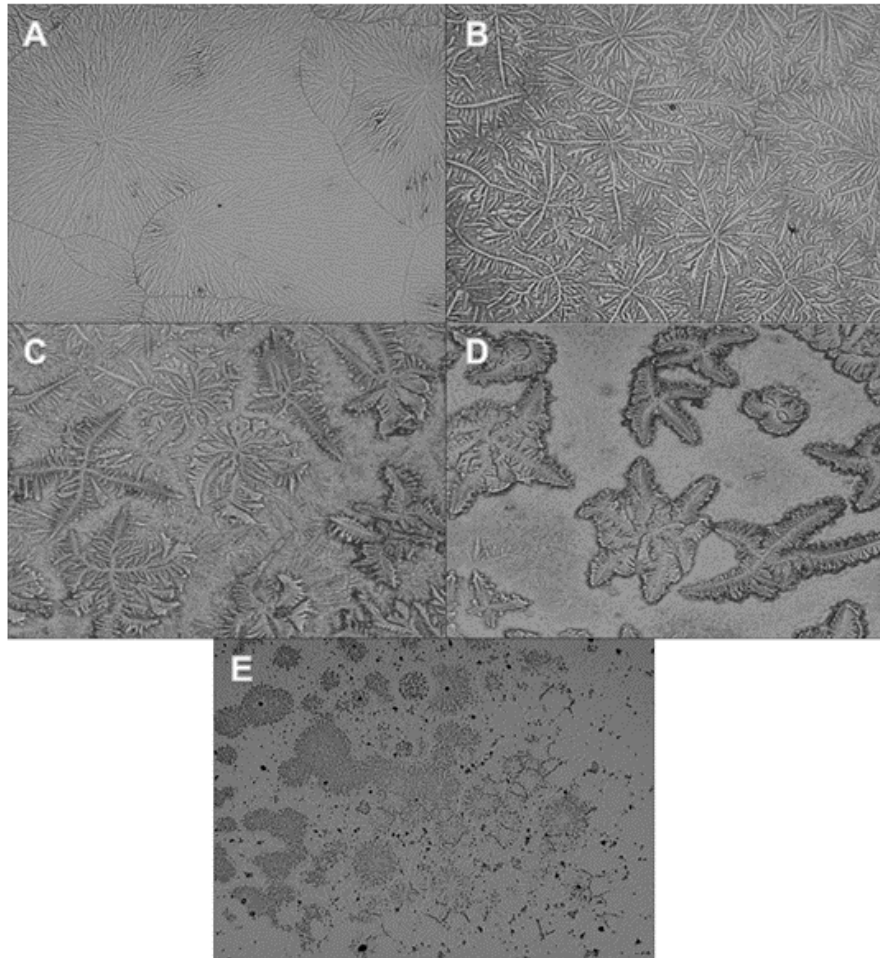


Notar em A – padrão tipo I; B – padrão tipo II; C – padrão tipo III; D – padrão tipo IV.

Fonte: **Rolando (1984)**

Masmali, Murphy e Purslow (2014) após desenvolverem sua escala em cinco graus, descrevem os padrões da seguinte forma: No grau zero, o fenômeno de cristalização é cheio, sem espaços ou lacunas entre as samambaias (Figura 9-A); no grau um, a densidade dos ramos da samambaia diminui com o aparecimento de pequenos espaços e lacunas entre os galhos (Figura 9-B); já no grau dois, os ramos da samambaia são reduzidos e podem se tornar grossos e grandes, com a presença de espaços claros e lacunas (Figura 9-C); no grau três, os espaços e as lacunas estão aumentados e bem visíveis, sem formação de samambaias claras, e com a presença de grandes cristais (Figura 9-D); por fim no grau quatro, observa-se que o fenômeno da cristalização está totalmente ausente (Figura 9-E).

Figura 9 - Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo classificação de Masmali, Murphy e Purslow (2014)



Notar em A grau 0; B – grau 1; C – grau 2; D – grau 3; E – grau 4.

Fonte: **Masmali, Murphy e Purslow (2014)**.

O TCL, amplamente estudado na medicina, tem seu resultado influenciado por diversas condições como variação sexual e hormonal (SRINIVASAN et al., 2007), doenças oculares e cicatrização conjuntival (LI et al., 2007), doenças sistêmicas com repercussão oftálmica (VERSURA et al., 2007) e doenças sistêmicas sem repercussão oftálmica (FILIPELLO et al., 1992).

2.3.2.3.4 Metodologias de colheita de lágrima

Metodologias diversas são descritas na literatura como factíveis para obtenção de lágrima. Posa e colaboradores (2013) compararam o uso da tira de Schirmer e do tubo microcapilar para obtenção de lágrima e avaliação proteômica em humanos, e concluiu que

não há diferença em relação a quantidade de proteína independente da metodologia aplicada, e ainda observou que a tira de Schirmer por ser uma metodologia aplicada na semiótica oftálmica de rotina pode trazer vantagens em relação a conforto e praticidade. Em coalas e cães a utilização de microcapilar para avaliação proteômica também já foi reportada (HEMSLEY et al. 2000), já em um estudo em camelos utilizaram a micropipeta para obtenção de lágrima e avaliação proteômica (CHEN et al. 2011; AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014).

A micropipeta foi descrita ainda como metodologia de colheita de lágrima para utilização no teste de cristalização (NORN, 1988), assim como o microcapilar (NORN, 1988; HORWATH et al. 2001). Norn (1988) conclui que a depender da metodologia utilizada, da manipulação do paciente e da quantidade de lágrima obtida, pode haver interferência na formação dos cristais. Não há relatos na literatura da utilização da tira de Schirmer para obtenção de lágrima para o teste de cristalização.

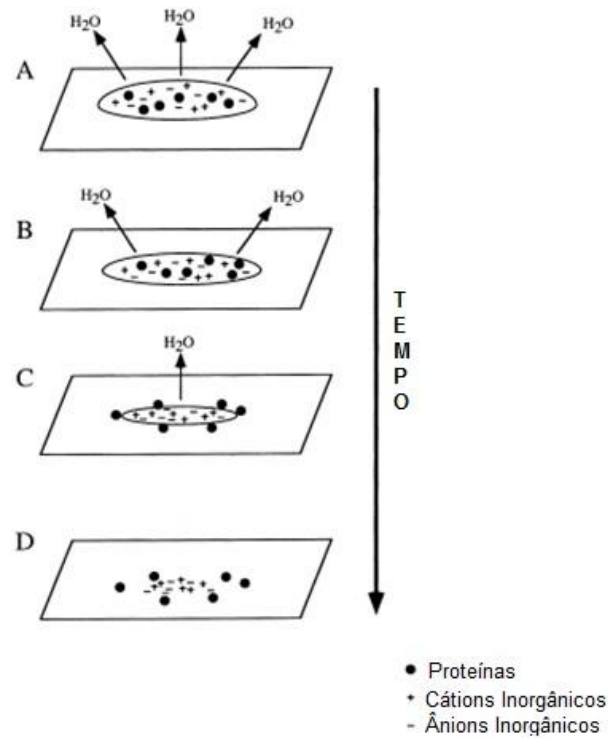
2.3.2.3.4 O fenômeno da cristalização

A cristalização inicia-se com a formação de um núcleo que é denominado núcleo cristalino, com uma disposição regular de íons. Este é formado por agregação, quando as concentrações de solutos dissolvidos na película lacrimal atingem a supersaturação por evaporação do solvente que é a água. A formação dos cristais começa da borda da gota onde a espessura é mais fina, portanto a supersaturação é alcançada de forma mais rápida, a partir destes cristais periféricos mais a agregação dos íons começa a acontecer formando os cristais normais. Uma cristalização ideal requer uma taxa de crescimento lenta, baixa viscosidade e baixos níveis de impureza para permitir a difusão dos solutos livres. Nestas condições o crescimento é regular e contínuo e uniforme (GOLDING; BRENAN, 1989; BUCKLEY, 1951).

Por tratar-se de solução complexa, a lágrima é repleta de componentes orgânicos e inorgânicos onde os padrões de cristalização assumidos após sua secagem dependem de sua composição. Quando a gota da lagrima é deixada secar, as proteínas são conduzidas à margem da gota e o centro fica repleto de íons que formam os padrões de cristalização (Figura 10). Dessa forma, sugere-se que macromoléculas tais como as mucinas e proteínas não estão presentes na formação do padrão de cristalização observado. A hiperosmolaridade, então, vem sido relatada como o fator que afeta os padrões de cristalização, de modo que este teste vem

sido utilizado para detecção de filme lacrimal hiperosmótico (PEARCE; TOMLINSON, 2000).

Figura 10 - Diagrama esquemático do modelo proposto da cristalização da lágrima.



Notar que à medida que o tempo passa, a tensão superficial se perde e provoca a evaporação da água e há concentração de eletrólitos e promove a deposição seletiva de macromoléculas (proteínas) na borda da gota. Em seguida, ocorre a cristalização dos sais inorgânicos no centro da gota quando a supersaturação é atingida.

Fonte: **Modificado de Pearce e Tomlinson (2000, p.312).**

A evaporação da água leva a concentração crescente de soluto, em que os sais inorgânicos, à medida que a água evapora, aumentam sua concentração até atingir um ponto no qual as proteínas não podem mais ficar dissolvidas. Trata-se de fenômeno bem conhecido e estudado durante o processo de cristalização descrito anteriormente. Dessa forma, a proteína é depositada na margem à medida que a frente líquida se desfaz, a evaporação e concentração dos sais continuam a aumentar. Contudo, por existir solubilidade limite destes sais inorgânicos, ao atingir esse ponto, ocorre a formação espontânea dos cristais. Dessa forma, a ausência de macromoléculas como proteínas e mucinas, que foram depositadas na margem,

garante que não haja impedimento para o crescimento dos cristais (PEARCE; TOMLINSON, 2000).

Alguns autores descreveram o fenômeno de cristalização e do padrão de ramificação como dependentes da concentração de eletrólitos, em particular a proporção de íons de sódio e potássio monovalentes, de cálcio divalente e íons de magnésio, e a razão entre os íons e proteínas (GOLDING et al. 1994). Esses autores realizaram raios-X e a microscopia eletrônica de varredura da composição estrutural das figuras semelhantes a folhas de samambaias, demonstrando que os cristais são compostos de sódio e cloreto de potássio com material proteico, que podem controlar cristalização indiretamente por revestimento das faces do cristal e bloquear a extensão das ramificações (KOGBE et al., 1991; GOLDING et al. 1994). Portanto a mudança na proporção de sal e macromoléculas é a teoria mais convincente para explicar a redução na formação de cristais em *ferning test* de olho seco, onde a osmolaridade está aumentada combinada com baixa quantidade de proteínas e mucinas (KOGBE; LIOTET; TIFFANY, 1991; GOLDING et al., 1994; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

3 CONCLUSÃO

Em medicina veterinária trata-se de um teste pouco explorado, e pouco se sabe sobre os padrões que podem ser considerados normais da cristalização da lágrima das diferentes espécies animais, assim como quais condições individuais podem interferir no processo. A literatura da oftalmologia veterinária carece de informações sobre o teste e sua aplicabilidade em medicina veterinária.

Nota-se, entretanto, através dos estudos conduzidos na medicina que o teste de cristalização pode trazer importantes informações sobre a composição bioquímica e qualidade do filme lacrimal, é um teste de baixo custo e fácil exequibilidade que pode ser importante ferramenta complementar na rotina oftálmica.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHABANAH, E.H.; PLOTZ, E.J. A biochemical study of the cervical and nasal mucus fern phenomenon. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, n.74, p.559-568, 1957.
- AKHATAR, S.; MASMALI, A.; KHAN, A. Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears and refresh plus. **Acta Ophthalmologica-special issue: abstracts from the 2014 European Association for VISION and Eye Research Conference**, n.92, p.0, 2014.
- BAUDOIN, C. The vicious circle in dry eye syndrome: a mechanistic approach. **Journal of French Ophthalmology**, n.3, p.239-246, 2007.
- BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M.R. Tear film and ocular surface testes in animal models of dry eye: uses and limitations. **Experimental eye research**, London, n.79, p.613-621, 2004.
- BEECH, J.; ZAPPALA, R.A.; SMITH, G.; LINDBROG, S. Schirmer tear test results in normal horses and ponies: effect of age, season, environment, sex, time of Day and placement of trips. **Veterinary Ophthalmology**, v.6, n.3, p.251-254, 2003.
- BEST, L.J.; HENDRIX, D.V.H.; WARD, D.A. Tear film osmolality and electrolyte composition in healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, n.76, n.12, p.1066-1069, 2015.
- BUCKLEY, H.E. Crystal growth. **London: Chapman & Hall Ltd**; 1951.
- CHEN, Z; SHAMSI, F.A.; LI, K; HUANG, Q; AL-RAJHI, A.A.; CHAUDHRY, I.A.; WU, K. Comparison of camel tear proteins between summer and winter. **Molecular Vision** n.17, p.323-331, 2011.
- COASSIN, M; LAMBIASE, A; COSTA, N; DE GREGORIO, A; SGRULLETTA, R; SCCHETTI, M; ALOE, L; BONINI, S. Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. **Grafe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, n 253, p.151-155, 2005.
- DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.2, p.71-77, 2004.
- DAVIS, K.; TOWNSEND, W. Tear-film osmolarity in normal cats and cats with conjunctivitis. **Veterinary Ophthalmology**, n.14, Supplement 1, p. 54-59, 2011.
- FELBERG, S.; CORDEIRO, H.; SATO, E.H.; MARTINI FILHO, D.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; ENDO, R.M.; DANTAS, P.E.C. Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjögren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, n.71, p.228-233, 2008.
- FILIPELLO, M.; SCIMONE, G.; CASCONI, G.; ZAGAMI, A., PANTALEONI, G. Ferning test in Down's syndrome. **Acta Ophthalmologica**, n.70, p 274-277, 1992.

FOURCROY, A.F.; VAUQUELIN, L.N. Examen chimique des larmes et de l'humeur des narines (Chemical examination of tears and nasal humor). **Annales Chimie (Paris)**, n.10, p.113-30, 1791.

GELLAT, K.N. Doenças e cirurgia dos sistemas lacrimal e nasolacrimal do cão. In:____. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2013. cap.4, p.73-94.

GIPSON, I.K.; HORI, Y.; ARGUESO, P. Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. **The Ocular Surface**, n.2, p.131-148, 2004.

GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. v.2, cap.13, p.633-611.

GOLDING, T.R.; BAKER, A.T.; RECHBERGER, J.; BRENNAN, N.A. X-Ray and scanning electron microscopic analysis of the structural composition of tear ferns. **Cornea**, v.13, n.1, p.58-66, 1994.

GOLDING, T.R.; BRENNAN, N.A. The basis of tear ferning. **Clinical and Experimental Optometry**, n.72, p.102-12, 1989.

GOUVEIA AF, REIS LS, FALCÃO MS, GALERA PD. Ferning test in health dogs. *American College of Veterinary Ophthalmologists 44th Annual Conference*, Porto Rico. **Veterinary Ophthalmology**. n.6, p. E34; 2013.

GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.739-753, 2004.

HAMOR, R.E.; ROBERTS, S.M.; SEVERIN, G.A.; CHAVKIN, M.J. Evaluation of results for Schirmer tear testes conducted with and without application of topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds. **American Journal of Veterinary Research**, n.61, p.1422-1425, 2000.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.1, p.53-57, 2006.

HEMSLEY, S; COLE, N; CANFIELD, P; WILLCOX, M.D.P. Protein microanalysis of animal tears. **Research in Veterinary Science**, n.68, p.207-209, 2000.

HENDRIX, D.V.H. Eye examination techniques in horses. **Clinical Techniques in Equine Practice**, n. 4, p. 2-10, 2005.

HERRERAS, J.M.; PASTOR, C.; CALONGE, M.; ASENSIO, V.M. Ocular surface alteration after long-term treatment with na antiglaucomatous drug. **Ophthalmology**, v.99, n.7, p.00-00, 1992.

HORWATH, J.; ETTINGER, K.; BACHERNEGG, M.; BODNER, E.; SCHMUT, O. Ocular ferning test: Effect of temperature and humidity on tear ferning patterns. **Ophthalmologica**, n.215, p.102-107, 2001.

HOLT, E.; ROSENTHAL, K.; SHOFER, F.S. The phenol red thread tear test in large Psittaciformes. **Veterinary Ophthalmology**, n.9, p.109-113, 2006.

KIM, J. The use of vital dyes in corneal disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, n.11, p.241-247, 2000.

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

KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A.; WARD, D.A. Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca. A useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with cyclosporine eye drops. **Archives of Ophthalmology**, n.107, p.1210-1216, 1989.

KOBASHIGAWA, K.K.; LIMA, T.B.; PADUA, I.R.M.; BARROS SOBRINHO, A.A.F.; MARINHO, F.A.; ORTÊNCIO, P.K.; LAUS, J.L. Ophthalmic parameters in adult shih tzu dogs. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p.1280-1285, 2015.

KOGBE, O.; LIOTET, S. An interesting use of the study of the tear ferning patterns in contactology. **Ophthalmologica**. n. 194, p. 150-153, 1987.

KOGBE, O.; LIOTET, S.; TIFFANY, J.M. Factors responsible for tear ferning. **Cornea**, n.10, p.433-444, 1991.

KRENZER, K.L.; DANA, M.R.; ULLMAN, M.D.; CERMAK, J.M.; TOLLS, D.B.; EVANS, J.E.; LAMBERT, D.W. Physiology of the tear film. In: SMOLIN, G; THOFT, RA. **The Cornea**. 3rd ed. Noida, India: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p.439.

LAMBERTS, D.W. Physiology of the tear film. In: *The Cornea*. **Smolin and Thoft's The Cornea**, Little Brown & Co, New York, p.439-455, 1994.

LANGE, R.R.; LIMA, L.; MONTIANI-FERREIRA, F. Measurement of tear production in black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) using three different methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and standardized endodontic absorbent paper points. **Veterinary Ophthalmology**, n.15, p.376-82, 2012.

LI, M.; ZHANG1, M.; LIN, Y.; XIAO, Q.; ZHU, X.; SONG, S.; LIN, J.; CHEN, J.; LIU, Z. Tear function and goblet cell density after pterygium excision. **Eye**, n. 21, p. 224-228, 2007.

LIM, C.C.; REILLY, C.M.; THOMASY, S.M.; KASS, P.H.; MAGGS, D.J. Effects of Feline Herpes Virus type 1 on tear film break-up time, Schirmer tear test results, and conjunctival goblet cell density in experimentally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, n.70, p.394-403, 2009.

MANNING, F.J.; WEHRLY, S.R.; FOULKS, G.N. Patient tolerance and ocular surface staining characteristics of lissamine green versus rose bengal. **Ophthalmology**, n.102, p.1953-1957, 1995.

MARAGOU, M.; VAIKOUSIS, E.; NTRE, A.; KORONIS, N.; GEORGIU, P.; HATZIDIMITRIOU, E.; SOTSIOU, F. Tear and saliva ferning tests in Sjögren's syndrome (SS). **Clinical Rheumatology**, v.15, n.2, p.125-132, 1996.

MASMALI, A.M.; AL-QHTANI, S.; AL-GASHAM, T.M.; EL-HITI, G.A.; PURSLOW, C.; MURPHY, P.J. Application of a new grading scale for tear ferning in non-dry eye and dry eye subjects. **Contact Lens & Anterior Eye**, n. 38, p. 39-43, 2015.

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

MASMALI, A.M.; PURSLOW, C.; MURPHY, P.J. The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. **Clinical and Experimental Optometry**, n.97, p.399-406, 2014.

McGINNIGLE, S.; NAROO, A.S.; EPERJESI, F. Evaluation of dry eye. **Survey of Ophthalmology**, n.57, p.293-316, 2012

MOORE, C.P.; MCHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. Effect of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.42, n.3, p.653-659, 2001

MURUBE, J. Tear crystallization test: two centuries of history. **The Ocular Surface**, n.2, p.7-9, 2004.

MURUBE, J. Tear osmolarity. **The Ocular Surface**, n.4, p.62-73, 2006.

NORN, M. Ferning in conjunctival-cytologic preparations crystallization in stained semiquantitative pipette samples of conjunctival fluid. **Acta Ophthalmologica**, n.65, p.118-122, 1987.

NORN, M. Quantitative tear ferning: Methodologic and experimental investigations. **Acta Ophthalmologica**, n.66, p.201-205, 1988.

OHASHI, Y.; DOGRU, M.; TSUBOTA, K. Laboratory findings in tear fluid analysis. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical and Chemistry**, n.369, p.17-28, 2006.

ORIÁ, A.P.; MARTINS FILHO, E.F.; RAPOSO, A.C.S.; ARAUJO, N.L.L.C.; GOMES JUNIOR, D.C. Lacrimal production of cats: Schirmer tear test, phenol red thread tear test and endodontic absorbent paper point. **Enciclopédia Biosfera**, n.11, p.2085-2091, 2015.

PAPANICOLAOU, G.N. A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, n.51, p.316-328, 1946.

PEARCE, E.I.; TOMLINSON, A. Spatial location studies on the chemical composition of human tear ferns. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v.20, n.4, p.306-313, 2000.

PEIFFER, J.R.; PETERSEN-JONES, S.N. **Ophthalmology: a problem-oriented approach**. 3.ed. Philadelphia: Sanders, 2000. cap.2, p.13-42.

POSA, A.; BRÄUER, L.; SCHICHT, M.; GARREIS, F.; BEILEK, S.; PAULSEN, F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. **Annals of Anatomy**, n.195, p.137-142, 2013.

RIBEIRO, A.P.; BRITO, F.L.C.; MARTINS, B.C.; MAMEDE, F.; LAUS, J.L. Anormalidades quali-quantitativas do filme lacrimal de cães. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.568-575, 2008.

ROLANDO, M; BALDI, F; CALABRIA, G. Tear mucus crystallization in children with cystic fibrosis. **Ophthalmologica**. n. 197, p. 202-206, 1988

ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret international journal of ophthalmology**, n.2, 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**, n.25, p.763-773, 2008.

SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n.1, p.7-11, 2001.

SAITO, A; KOTANI, T. Tear production in dogs with epiphora and corneal epitheliopathy. **Veterinary Ophthalmology**. n.2, p.173-178, 1999.

SCHAUMBERG, D.A.; BURING, J.E.; SULLIVAN, D.A.; DANA, M.R. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. **Journal of the American Medical Association**, n.286, p.2114-2119, 2001.

SILVA, L.R.; GOUVEIA, A.F.; FÁTIMA, C.J.T.; OLIVEIRA, L.B.; REIS, J.R.; FERREIRA, R.F.; PIMENTEL; C.M.; GALERA; P.D. Tear ferning test in horses and its correlation with ocular surface evaluation. **Veterinary Ophthalmology**, v.19, n.2, p. 117-123, 2016.

SKALOVA, I; FEDOROVA, T; BRANDLOVA, K. Saliva Crystallization in Cattle: New Possibility for Early Pregnancy Diagnosis?. **Agricultura Trópica et Subtrópica**. v.46, n.3, p.102-104, 2013.

SRINIVASAN, S.; JOYCE, E.; JONES, L.W. Tear osmolality and ferning patterns in post-menopausal women. **Optometry and Vision Science**, n.84, p.588-592, 2007.

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

TABBARA, K.F.; OKUMOTO, M. Ocular ferning test. A qualitative test for mucus deficiency. **Ophthalmology**, n.89, p.712-714, 1982.

UNCU, G.; AVCI, R.; UNCU, Y.; KAYMAZ, C.; DEVELIÓGLU, O. The effects of different hormone replacement therapy regimens on tear function, intraocular pressure and lens opacity. **Gynecological Endocrinology**, n.22, p.501-550, 2006.

VAIKOUSSIS, E.; GEORGIU, P.; NOMICARIOS, D. Tear mucus ferning in patients with Sjogren's syndrome. **Documenta Ophthalmologica**, n.87, p.145-51, 1994.

VAN KAMPEN, K.R.; JAMES, L.F. Ophthalmic lesions in locoweed poisoning of cattle, sheep, and horses. **American Journal of Veterinary Research**, n.32, p.1293-1295, 1971.

VERSURA, P.; FRIGATO, M.; CELLINI, M.; MULE, R.; MALAVOLTA, N.; CAMPOS, E.C. Diagnostic performance of tear function tests in Sjogren's syndrome patients. **Eye Journal**, n.21, p.229-237, 2007.

WEICHSLER, N. Exame do olho e anexos. In: HERRERA, D. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. São Paulo: MedVet, 2008. cap.2, p.31-48.

WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. **Veterinary clinics small animal practice**, n.38, p.251-268, 2008.

WOLFF, E. The muco-cutaneous junction of the lid margin and the distribution of tear fluid. **Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom**, n.66, p.291-308, 1946.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE CÃES: TRÊS MÉTODOS DE COLHEITA E COMPARAÇÃO ENTRE DUAS ESCALAS DE CLASSIFICAÇÃO.

(SUBMETIDO AO PERIÓDICO 'VETERINARY OPHTHALMOLOGY')

RESUMO

Proposta: Comparar a micropipeta, o microcapilar e a tira de Schirmer como métodos de colheita de lágrima para o teste de cristalização (TCL) em cães hígidos e classificar pelas escalas propostas por Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014).

Métodos: Foram avaliados 180 olhos (90 cães), submetidos a colheita de lágrima por meio da tira de papel milimetrada, reaproveitada do teste da lágrima de Schirmer (TLS-I), compondo o grupo SG. Após, os 90 animais foram subdivididos em três grupos, com 30 animais cada; quanto a metodologia de colheita: grupo micropipeta (MPG), grupo microcapilar (MCG) e grupo Schirmer segunda colheita (S2G). As lágrimas colhidas foram depositadas sobre lâmina de microscopia e deixadas secar, ato contínuo, foram fotografadas em microscópio de luz polarizada e classificadas por três avaliadores, segundo os critérios propostos por Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014). Temperatura, umidade e tempo de cristalização foram monitorizados.

Resultados: Não houve diferença estatística entre os valores de mediana de TLS-I, que independente dos tipos ou graus correspondentes do animal, mantiveram-se dentro do parâmetro de normalidade. A comparação dos olhos direito e esquerdo de um mesmo animal, obtiveram classificações semelhantes. Os olhos que compuseram o SG e MPG, simultaneamente, tiveram diferença estatística quando comparado seus tipos e graus obtidos. Houve diferença estatística quando comparadas as frequências dos graus e tipos pelos diferentes grupos, com destaque para o tipo I e grau 1 que foram os mais observados entre os grupos.

Conclusão: O teste de cristalização para cães é aplicável e possível de ser realizado pelos três métodos de colheita sugeridos, com obtenção de maior frequência o tipo I (Rolando, 1984) e grau 1 (Masmali, Murphy e Purslow, 2014), desta forma, é factível a utilização de ambas escalas na classificação do fenômeno de cristalização em cães.

ABSTRACT

Purpose: To compare micro-pipette, microcapillary and Schirmer tear test as tear sampling method for the ferning test in healthy dogs and to classify the grading proposed by Rolando (1984) and Masmali, Murphy e Purslow (2014).

Methods: A hundred and eighty eyes (90 dogs) were submitted to tear sampling using the millimetered strips, reutilized after Schirmer tear test (STT-1), Goup SG. Then, the 90 animals were subdivided into three groups, with 30 animals each, according to the sampling methodology: micropipette group (MPG), microcapillary group (MCG) and Schirmer group (S2G). The collected tears were deposited on a microscope slide and allowed to dry. They were photographed under a polarized light microscope and classified by three evaluators according to the criteria proposed by Rolando and Masmali, Murphy and Purslow. Temperature, humidity and tear ferning time were monitored.

Results: There was no statistical difference between the median STT values, which independently of the corresponding types or grades of the animal, remained within the normality parameter. The comparison of the right and left eyes of the same animal, obtained similar classifications. The eyes that composed the SG and MPG, simultaneously, had statistical difference when compared their types and degrees obtained. There was statistical difference when comparing the frequencies of grades and types by the different groups, especially type I and grade 1, which were the most observed among groups.

Conclusion: The tear ferning test for dogs is applicable and can be performed by the three suggested sampling methods with a higher frequency of type I (Rolando, 1984) and grade 1 (Masmali, Murphy and Purslow, 2014). Thus, it is possible to use both grading scales in the classification of the tear ferning in dogs.

1 OBJETIVOS

1.1 GERAIS

Avaliar e descrever o teste de cristalização da lágrima (TCL) em cães hígidos, sob diferentes métodos de colheita, e fazer essa avaliação por duas escalas de classificação.

1.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar e classificar o padrão de cristalização em lágrima de cães hígidos, segundo critérios propostos por Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014);
- b) Avaliar diferentes metodologias de colheita de lágrima para a realização do TCL;
- c) Comparar os padrões de cristalização quanto ao método de colheita;
- d) Comparar os padrões de cristalização quanto à produção lacrimal.

2 INTRODUÇÃO

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) é uma estrutura complexa, dinâmica, e possui função primordial na saúde da superfície ocular (GRAHN; STOREY, 2004; ROYLE et al., 2008). Sua avaliação quantitativa é rotineira, entretanto a qualitativa possui diversos desafios para aplicação clínica, porquanto os baixos volumes presentes no lago lacrimal dificultam a colheita da amostra e, além disso, testes e equipamentos disponíveis para avaliação proteômica, densidade de células caliciformes e osmolaridade, por vezes são onerosos ou de difícil adequação às condições clínicas de rotina (KOGBE; LIOTET; TIFFANY, 1991).

Existem diversas propostas de avaliação da superfície ocular, que atuam de forma complementar a semiotécnica oftálmica, dentre estas citam-se a utilização de corantes como o rosa bengala, a lisamina verde e a fluoresceína; o tempo de quebra do filme lacrimal e a avaliação de osmolaridade (SLATTER, 2013; SEBBAG, KASS & MAGGS, 2015). O teste de cristalização da lágrima é descrito como simples, rápido e barato, que traz informações úteis sobre a composição do FLCP (MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014) e já é utilizado como auxílio no diagnóstico de doença da superfície como a ceratoconjuntivite seca (NORN, 1994; VAIKOUSSIS; GIORGIUO; NOMINCARIOS, 1994). Trata-se de teste clínico-laboratorial que consiste em deixar secar, sobre uma lâmina de microscopia, alíquota de lágrima colhida com micropipeta ou microcapilar (ROLANDO, 1984; MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014). Após secagem faz-se a avaliação do padrão de cristalização identificado na amostra, com auxílio de microscópio. Fatores externos como umidade, temperatura, sujidades e excesso de muco, podem interferir na formação dos cristais, portanto devem ser monitorizados e controlados (HORWATH et al. 2001; MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014).

A primeira documentação de que se tem notícia sobre o fenômeno de cristalização é de 1791, relatada por Facuory e Vauquelin, entretanto, só em 1946, Papanicolau descreveu o fenômeno e sua aplicação, quando o utilizou em fluidos corporais como muco cervical e vaginal, a fim de determinar ciclo menstrual, ovulação e período fértil em mulheres. A cristalização da saliva também já foi utilizada para diagnóstico de período fértil e monitorização de doenças sistêmicas como síndrome de Sörgjen (MARAGOU et al., 1996). Rolando, em 1984, trouxe os primeiros conceitos para aplicação da cristalização à lágrima e atribuiu uma escala de quatro tipos, e os determinou de tipos I e II, para lágrimas normais e tipos III e IV, para lágrimas com alteração. Norn (1988), partindo dos conceitos de Rolando

(1984), desenvolveu estudo para verificar a repetibilidade e a aplicabilidade do teste e propôs nova metodologia de classificação balizada nas angulações assumidas pelos cristais, entretanto, não foi bem aceito na comunidade científica por sua dificuldade de interpretação (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014). Em seguida, Vaikoussis, Giorgiou e Nomincarios (1994) propuseram uma escala de cinco tipos de cristalização, também derivados da escala de classificação de Rolando (1984). Em estudo mais recente, Masmali, Murphy e Purslow (2014), a fim de diminuir as lacunas e dificuldades das classificações anteriores, desenvolveram nova escala com cinco graus e atestaram sua aplicabilidade em estudo posterior em que definiram os graus zero, um e dois para olhos normais (MASMALI, MURPHY, PURSLOW, 2014).

Na medicina veterinária, a escala de classificação de Rolando (1984) já foi consignada para equinos (SILVA et al., 2016) e cães (COASSIN et al. 2005; GOUVEIA et al. 2013; HUS, SHEEHAN GAERIG, SISLER, 2015), enquanto a escala proposta por Masmali, Murphy e Purslow (2014) foi aplicada a camelos (AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014). Cabe salientar que apesar de ainda não haver uniformidade na metodologia empregada para a colheita de lágrima, a literatura registra a utilização de espátulas (ROLANDO, 1984) para cristalização, tiras de Schirmer para avaliação proteômica (POSA et al. 2013) e micropipeta e microcapilar para cristalização e avaliação proteômica (HEMSLEY et al. 2000; POSA et al. 2013, AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014).

O presente estudo tem por objetivo avaliar três metodologias de colheita de lágrima e a aplicação de duas escalas de classificação, para o teste de cristalização da lágrima em cães hígidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Os protocolos da pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (71/2016). Além disso, seguiram orientações bioéticas preconizados pela ARVO – *Association for Research in Vision and Ophthalmology (National Institutes of Health Publications, N^o 85-23: Revised, 1985)* e em consoante com o Código de Nüremberg (GOLDIN, 1995).

3.2 Animais

Foram utilizados 90 cães, 44 machos (48,89%) e 46 fêmeas (51,11%), com idades entre 1 e 13 anos (média: $5,35 \pm 3,65$ anos), de 2 a 35 kg (média: $13,0 \pm 9,96$ kg), provenientes do Hospital Veterinário Renato Rodenburg de Medeiros Neto, da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os animais passaram por anamnese e exame físico e, quando sem alterações, procedeu-se à semiotécnica oftálmica de rotina, com realização do TLS-I como método de triagem para mensuração da produção lacrimal; animais com produção dentro dos parâmetros de normalidade foram admitidos no estudo. A avaliação dos anexos oftálmicos, segmento anterior e posterior e higidez da superfície ocular pelos corantes de fluoresceína (Fluoresceína Strips – Ophthalmos®, São Paulo, Brasil) e lissamina verde (Lissamine Green™ sterile strips – ContaCare®, Gujarat, India), só foram consignados após as colheitas de lágrima para evitar quaisquer interferências nas cristalizações. Como critério de inclusão os animais não poderiam possuir quaisquer alterações na anamnese, exame físico ou oftálmico.

3.3 Grupos Experimentais

O Grupo Schirmer (SG) foi composto por todos os 90 animais (180 olhos), que foram submetidos à colheita de lágrima por tira de Schirmer. Para isso, a mesma permaneceu inserida no saco conjuntival ventral e, após o tempo de 60 segundos para a avaliação quantitativa da lágrima, a tira foi mantida no fórnix até que a porção umedecida alcançasse 30 mm. Ato contínuo, as tiras foram acondicionadas em microtubo de centrifugação de 0,5 mL (Eppendorf Protein LoBind Tubes®, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) com extremidade cortada e o mesmo foi inserido em outro microtubo de centrifugação de 2,0 mL (Eppendorf Tubes®, 3810X, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 25830g, a 4°C, durante 10 minutos (Megafuge 16R – ThermoFisher Scientific® – Germany) para a obtenção de alíquota de lágrima, que foi recuperada com auxílio de micropipeta e depositada sobre uma lâmina de microscopia dentro de um círculo previamente marcado com caneta permanente e deixada para secar.

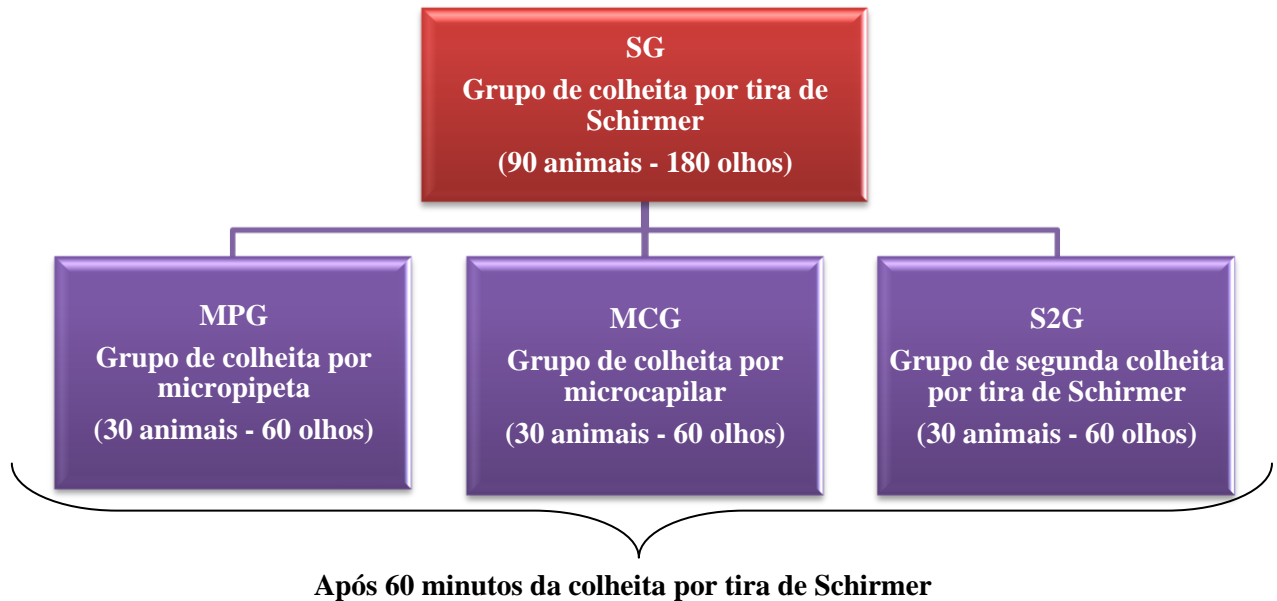
A partir do SG, os animais foram subdivididos em três grupos, de forma aleatória, de acordo com o método de colheita quais sejam: Grupo MPG, micropipeta; Grupo MCG, microcapilar e Grupo S2G, Schirmer (segunda colheita) conforme pode ser observado na figura 11.

Compuseram o MPG 30 animais, 15 fêmeas (50%) e 15 machos (50%) – com idades entre 1 e 13 anos (média: $5,35 \pm 3,65$ anos), de 2 a 35 kg (média: $13,01 \pm 9,96$ kg) e foram submetidos a colheita, em ambos olhos através de micropipeta (Micropipeta basic monocanal volume variável 10-100 μ l – KASVI®, Curitiba, PR, Brasil) com a ponteira (tipo Gilson Amarela vol. 0-200 μ l – Cralplast, Cotia, SP, Brasil) inserida no fórnix conjuntival inferior, próximo ao canto medial, sem utilização prévia de colírio anestésico. Em seguida, a alíquota de lágrima recuperada foi depositada delicadamente sobre uma lâmina de microscopia limpa dentro de um círculo previamente marcado com caneta permanente e deixada para secar.

O grupo MCG foi composto por 30 animais, 16 fêmeas (53,33%) e 14 machos (46,67%), com idades entre 1 e 10 anos (média: $4,30 \pm 2,87$ anos), de 2 a 33 kg (média: $7,77 \pm 7,19$ kg), que foram submetidos a colheita de lágrima recuperada do canto medial com auxílio de microcapilar, nos dois olhos. O microcapilar, ao entrar em contato com o lago lacrimal, por capilaridade e gravidade, recolheu alíquota de lágrima que foi depositada sobre uma lâmina de microscopia limpa, dentro de um círculo previamente marcado, com caneta permanente, e deixada para secar.

O grupo S2G foi constituído por 15 fêmeas (50%) e 15 machos (50%) – com idades entre 1 e 10 anos (média: $4,83 \pm 2,24$ anos), de 2 a 32 kg (média: $9,35 \pm 7,64$ kg). A lágrima foi colhida com tira de Schirmer posicionada em saco conjuntival ventral até umedecer a marca de 30mm. Ato contínuo, a tira umedecida foi acondicionada em microtubo e centrifugada para obtenção da alíquota de lágrima, à similitude do que fora descrito para o SG. A alíquota de lágrima foi depositada sobre a lâmina de microscopia e deixada para secar. Os procedimentos de colheita dos grupos MPG, MCG e S2G foram realizados após 60 minutos do TLS-I da semiotécnica oftálmica.

Figura 11 - Diagrama representativo da divisão dos grupos experimentais



3.4 Processamento e avaliação das amostras

A temperatura e a umidade foram monitorizadas com termo-higrômetro digital (Termo-Higrômetro Digital com Sensor Externo, INCONTERMINAS®, Contagem, MG, Brasil), durante a colheita e processamento das amostras, assim como o tempo de cristalização (momento de depósito da lágrima até a sua secagem), foi verificado através de cronômetro digital.

Após secagem completa, as lâminas foram submetidas à avaliação, com microscópio de luz polarizada em aumento de 10x, com câmera acoplada para captura das imagens (Microscópio Zeiss, Scope A.1/AX10 Axion Cam ICc5, Oberkochen, Alemanha). As imagens da cristalização foram classificadas por três avaliadores, com conhecimento das escalas e treinamento prévio. As escalas de cristalização, deram-se segundo Rolando (1984), em tipos I, II, III e IV e, conforme Masmali, Murphy e Purslow (2014), em graus 0, 1, 2, 3 e 4. Os critérios obedecidos para classificação encontram-se arrolados na Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios para a avaliação e classificação dos padrões de cristalização da lágrima segundo Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014).

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA	
ROLANDO (1984)	MASMALI, MURPHY E PURSLOW (2014)
Tipo I –Cristalização da lágrima origina árvores de cristais multiramificados, sem espaços vazios entre as arborificações.	Grau 0 –O fenômeno de cristalização é cheio, sem espaços ou lacunas entre as samambaias.
Tipo II –Os ramos são mais curtos e as arborificações são menores, com a aparição de espaços entre elas.	Grau 1 –A densidade dos ramos da samambaia diminui com o aparecimento de pequenos espaços e lacunas entre os galhos.
Tipo III –Os espaços entre as arborificações são amplos, e as ramificações são raras, com presença de cristais grosseiros.	Grau 2 –Os ramos da samambaia são reduzidos e podem se tornar grossos e grandes, com a presença de espaços claros e lacunas.
Tipo IV –É caracterizado por grumos de cristais que raramente formam pequenas arborificações, ou pela ausência total de cristalização.	Grau 3 –Os espaços e as lacunas estão aumentados e bem visíveis no grau 3, sem formação de samambaias, mas com a presença de grandes cristais.
	Grau 4 –O fenômeno da cristalização neste padrão está totalmente ausente.

Fonte: **Adaptado de Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014).**

3.5 Análise Estatística

O teste de Shapiro-wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o olho direito e esquerdo quanto ao valor TLS-1 e as classificações obtidas, bem como avaliar a diferença dessas classificações no mesmo olho submetido a dois diferentes métodos de colheita. Utilizou-se Mann-Whitney U para comparar

os valores de TLS-1 para machos e fêmeas. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparar os valores de TLS-1 com as classificações intra-grupo. Para a comparação da frequência entre os diferentes métodos de colheita, utilizou-se o teste qui-quadrado. O nível de significância considerado para estes testes foi de 5%.

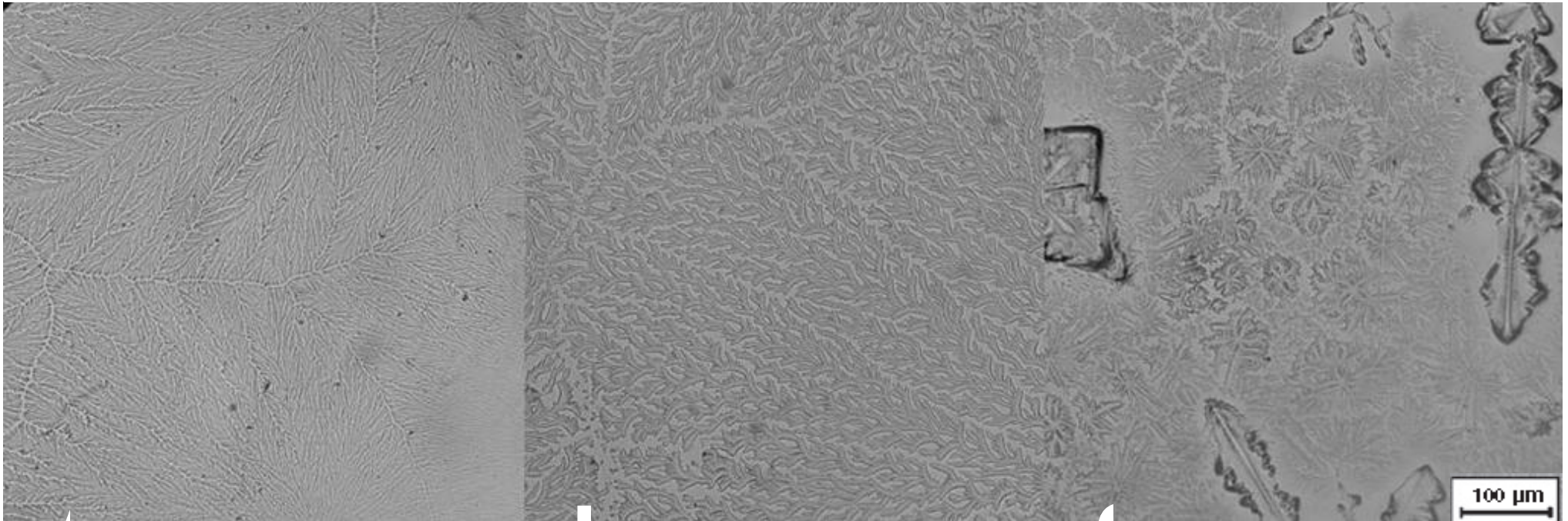
4 RESULTADOS

O valor da mediana (\pm S-IQR) para TLS-I foi de $21,08 \pm 4$ mm/min para os 180 olhos avaliados, com o intervalo de confiança entre 20,7 – 21,7mm/min, não sendo encontrada distribuição normal para esta variável ($P < 0,001$). Houve diferença significativa em relação a produção lacrimal quando comparados olho direito e esquerdo apenas para o grupo GMP ($P = 0,034$), o mesmo não foi encontrado para SG, MCG e S2G ($P = 0,171$; $P = 0,756$; $P = 0,678$). Estatisticamente, não houve diferença para os valores de TLS-I quando comparados machos e fêmeas ($P = 0,364$). O tempo de cristalização variou de 5min30s a 18min9s, com média de $10\text{min}55\text{s} \pm 3\text{min}14\text{s}$.

As médias (\pm desvio-padrão) da temperatura e umidade ambiental foram de $23 \pm 1,4^\circ\text{C}$ e $48,03 \pm 2,0\%$, com mínimas e máximas de 21 a 25°C e 44 a 51%, respectivamente. O tempo de cristalização variou de 5min30s a 18min9s, com média de 10min55s. As imagens obtidas através do microscópio de luz polarizada foram classificadas a partir do consenso de três avaliadores, como observado nas figuras 12 e 13.

Ao comparar os valores de TLS-I para cada tipo e grau de cristalização correspondente, foi verificado que independente da classificação, não há diferença quanto a produção lacrimal ($P > 0,05$).

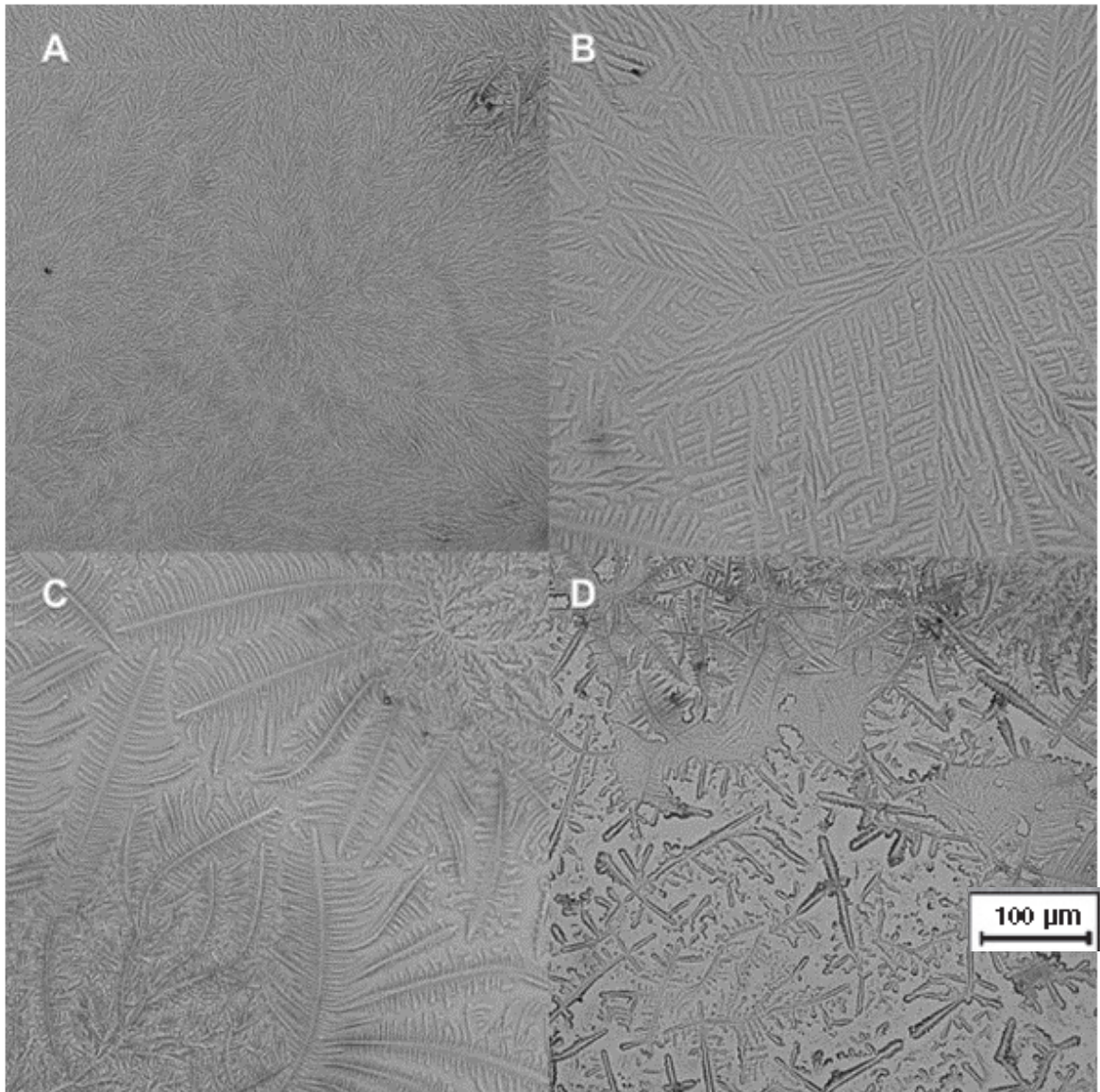
Figura 12 - Padrões de cristalização da lágrima em cães sadios de acordo com classificação de Rolando (1984).



Notar em A representação do tipo I, arborificações são uniformes e não há espaços entre as ramificações, em B, pequenos espaços vazios começam a aparecer entre as arborizações, em C, as cristalizações são formações incompletas únicas e pequenas e as ramificações são raras ou inexistem.

FONTE: Serviço de Oftalmologia da UFBA

Figura 13 - Padrões de cristalização da lágrima de cães saudáveis de acordo com classificação segundo Masmali, Murphy e Purslow (2014).



Notar em A representação do grau 0, percebe-se a cristalização cheia sem lacunas entre as formações das arborificações, em B, representação do grau 1, diminuição da densidade dos ramos da cristalização e aparecimento de pequenos espaços entre os galhos, em C, aparecem ramos reduzidos e por vezes grossos e grandes, com presença de espaços claros de lacunas entre as arborificações e em D, características do grau 3 os espaços e as lacunas estão aumentados e há formação de cristais grosseiros.

FONTE: Serviço de Oftalmologia da UFBA

Através do teste de Wilcoxon foi observado que não existem diferenças quanto ao tipo e grau quando comparado olho direito e esquerdo de um mesmo animal, para os diferentes grupos ($P > 0,05$).

Da mesma forma, não foi observado tipos e graus distintos para um mesmo olho submetido a dois diferentes métodos de colheita, com exceção dos olhos que foram submetidos a colheita por Schirmer (SG) e posteriormente por micropipeta (MPG), onde obteve-se nível de significância de 0,01 para a classificação de Rolando (1984) e 0,019 para Masmali, Murphy e Purslow (2014). Estas comparações estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2- Descrição das frequências de tipo (Rolando, 1984) e grau (Masmali, Murphy e Purslow, 2014) em relação a um mesmo olho submetido a dois diferentes métodos de colheita.

	ROLANDO (1984)			MASMALI, MURPHY e PURSLOW (2014)		
	SG=*G	SG<*G	SG>*G	SG=*G	SG<*G	SG>*G
MPG	39	19	2	28	22	10
MCG	29	17	14	28	18	14
S2G	43	11	6	43	11	6

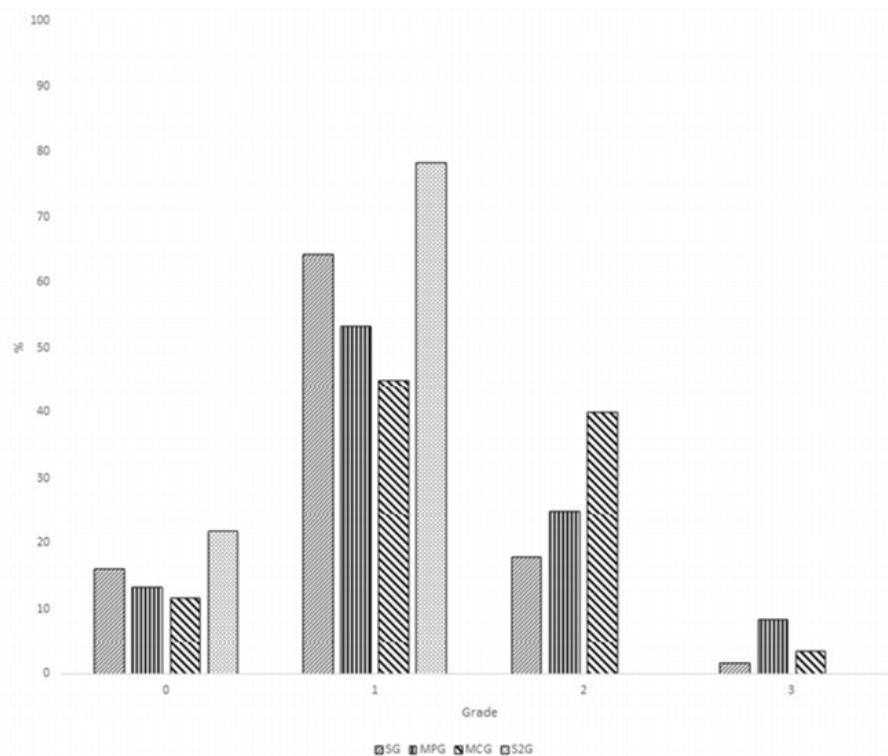
SG- grupo Schirmer; MPG -grupo micropipeta; MCG - grupo microcapilar; S2G - grupo Schirmer (segunda colheita); *Usado para designar os grupos variáveis (MPG, MCG e S2G). Quando o SG=*G as classificações foram iguais para ambas as amostras colhidas de um mesmo olho; quando o SG<*G, o grupo Schirmer obteve classificação menor comparativamente ao *G; quando o SG>*G, o grupo Schirmer obteve classificação maior do que o *G.

As amostras colhidas foram avaliadas quanto a frequência alcançada (Tabela 3; Figuras 14 e 15), e encontrou-se diferença para esta variável quando comparada entre os grupos ($P < 0,001$). Houve diferença estatística em grupos quando foi avaliada a frequência do tipo ou grau obtido ($P < 0,001$). Não houve diferença estatística na associação de frequências obtidas para o mesmo tipo ou grau nos diferentes grupos ($P > 0,05$) (Figuras 14 e 15)

Tabela 3 - Frequências das classificações para Rolando (1984) e Masmali, Murphy e Purslow (2014) para cristalização da lagrima em cães.

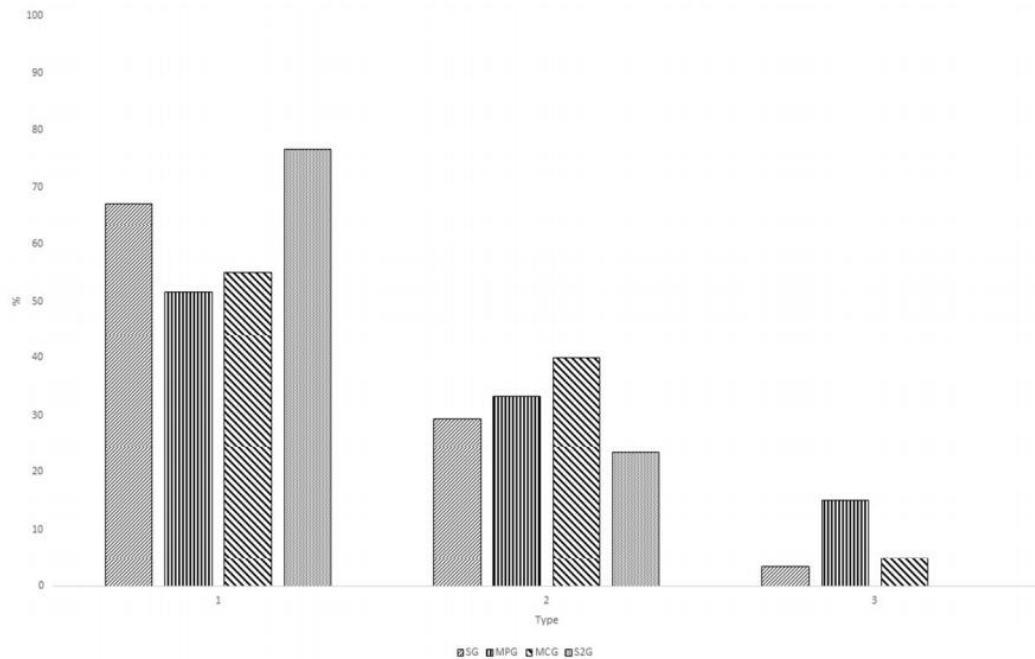
	SG	MPG	MCG	S2G
Rolando (1984)				
Tipo I	121 (67,2%)	31 (51,7%)	33 (55%)	46 (76,7%)
Tipo II	53 (29,4%)	20 (33,3%)	24 (40%)	14 (23,3%)
Tipo III	6 (3,33%)	9 (15%)	3 (5%)	
Masmali, Murphy e Purslow (2014)				
Grau 0	29 (16,1%)	8 (13,3%)	7 (11,7%)	13 (21,7%)
Grau 1	116 (64,4%)	32 (53,3%)	27 (45%)	47 (78,3%)
Grau 2	32 (17,8%)	15 (25%)	24 (40%)	
Grau 3	3 (1,7%)	5 (8,4%)	2 (3,3%)	
Total	180 (100%)	60 (100%)	60 (100%)	60 (100%)

Figura 14- Distribuição da frequência das classificações de acordo a escala de Rolando (1984).



No eixo y valores em porcentagem de olhos, e no eixo x tipos obtidos de acordo com os grupos experimentais.

Figura 15 - Distribuição da frequência das classificações de acordo a escala de Masmali, Murphy e Purslow (2014).



No eixo y valores em porcentagem de olhos, e no eixo x graus obtidos de acordo com os grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

As afecções da superfície ocular em cães são rotineiras, a exemplo da ceratoconjuntivite seca, que necessitam de metodologias diagnósticas para sua completa compreensão. Dentre outros, o teste de cristalização traz informações importantes a respeito da composição bioquímica bruta do filme lacrimal e pode identificar alterações sutis na qualidade da lágrima que ainda não repercutiram clinicamente (PEARCE & TOMLINSON, 2000; SLATTER, 2013; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014). O TCL é abordado no presente estudo de forma pioneira em cães inclusive no que tange os métodos de colheita para obtenção da lágrima e a avaliação do fenômeno de cristalização.

O TLS-I foi utilizado como metodologia de inclusão por tratar-se de método padrão da semiotécnica oftálmica para avaliação quantitativa do filme lacrimal (WILLIAMS, 2005; SLATTER, 2013), devido a isto os animais deste estudo apresentaram valores de mediana dentro dos parâmetros de normalidade. Entretanto, complementar a esta avaliação outras ferramentas podem ser elencadas para caracterização da superfície ocular de cães

(WILLIAMS, 2005). O TCL é comumente utilizado em humanos para o diagnóstico de disfunções oculares (ROLANDO, BALDI & ZINGIRIAN, 1986; MARAGOU et al., 1996; BITTON, 2007) ou em estudos para possíveis modificações dos padrões de cristalização secundárias a alterações endógenas (TATLIPINAR et al., 2001). Desta forma a homogeneidade e os critérios de inclusão adotados para os animais contribuíram para a redução de possíveis variáveis para padronização do TCL na espécie canina.

Horwath e colaboradores (2001) descreveram que o fenômeno de cristalização da lágrima sofre interferência direta de fatores ambientais e concluíram que a umidade superior a 50% e a temperatura, que não esteja entre 20 – 26°C, não permitem o fenômeno de cristalização. Desta forma, estes fatores foram monitorizados para evitar influências ambientais na cristalização. Foram encontrados tempos de cristalização semelhantes aos descritos em equinos, com média de cristalização de 10 minutos (SILVA et al., 2016). Todavia, não há consenso na literatura quanto ao tempo ideal de cristalização, mas relata-se variação de 7 a 10 minutos (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

Por existir desconhecimento dos reais fatores que interferem no processo de cristalização, foram consignadas três metodologias de colheita, uma vez que, em estudo com camelos, os autores utilizaram micropipeta para recuperar alíquota (CHEN et al., 2011; AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014) e, em equinos (SILVA et al. 2016) e humanos (HORWATH et al., 2001; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014) foram utilizados o microcapilar. O Schirmer foi adotado como modalidade de colheita por compor a semiótica oftálmica rotineira em cães (SLATTER, 2013) e por tratar-se de método consagrado para obtenção do filme lacrimal para avaliação de perfil proteico (SMALL; HEVY; TANG-LIU, 2000; POSA et al. 2013).

Os diferentes métodos de colheita são discutidos na literatura quanto às suas propriedades físicas e mecânicas e possíveis interferências destes, nas formas de avaliação do TCL. Foram descritos, em estudos prévios, aspectos como dificuldade na reprodutibilidade do teste (NORN, 1988) e possíveis iatrogenias como irritações mecânicas ou injúrias que podem ser causadas pelas diferentes modalidades de colheita da lágrima (POSA et al., 2013).

Segundo Norm (1988) os métodos de aspiração, como a micropipeta, podem carrear muco do saco conjuntival, o que pode justificar o grupo micropipeta (MPG) ter apresentado maior quantidade de amostras com elevação da classificação da cristalização quando comparado ao grupo Schirmer (SG). Observamos que este fato reforça a possibilidade que a presença de sujidades podem obstar o processo de cristalização. Este autor, refere, ainda, que um maior volume de lágrima depositado na lâmina, como por exemplo com a utilização de

haste de vidro pode, também, interferir no fenômeno de cristalização. Entretanto, o microcapilar e a micropipeta figuram na literatura como os métodos mais rotineiros de colheita de lágrima para teste de cristalização até o presente momento, inclusive em animais (CHEN et al., 2011; AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014; SILVA et al., 2016).

A tira de Schirmer, como método de colheita mostrou-se exequível e por tratar-se de técnica adotada no dia a dia da oftalmologia clínica (POSA et al., 2013), possibilitou a avaliação do TLS-I e TCL, desta forma, pode ser consignada sem promover manipulação adicional ao olho. Entretanto, alguns autores afirmaram que as propriedades de adsorção e absorção do Schirmer podem dificultar o resgate de proteínas em soluções salinas ou tampão, assim como a permanência do papel filtro em constante contato com a mucosa pode induzir a esfoliação (HAERINGEN, 1981).

Cabe salientar que, ainda não há consenso sobre o método empregado para colheita de lágrima e que os maiores ou menores tipos e graus obtidos por diferentes métodos podem estar dentro do intervalo do que é considerado como normal pelas escalas, o que é evidenciado pela maior frequência de achados do tipo I e do grau 1, no presente estudo. Porém merece ser destacado que tal comparação de metodologias nunca fora antes descrita para o TCL.

Não foi observada diferença estatística entre a mediana do TLS-I e as classificações obtidas. Em estudo da qualidade da lágrima de crianças pré-maturas, Beden e colaboradores (2015) concluíram que mesmo com o TLS moderadamente abaixo do normal, os recém-nascidos secretam lágrimas de boa qualidade, o que sugere que olhos hígidos podem variar o seu TLS-I por diversos fatores como idade, hora do dia, sexo, entretanto mantém a qualidade da lágrima. Neste sentido, pode ser extrapolado que olhos com produção lacrimal normal e sem alterações ao exame oftálmico, como os dos animais estudados, devem apresentar padrão de cristalização tidos como normais dentro das escalas propostas.

Foi observado diferença estatística das frequências entre os grupos avaliados, contudo houve predomínio do tipo I (ROLANDO, 1984) e grau 1 (MASMALI, MURPHY e PURSLOW, 2014). Em 95% dos animais avaliados, observou-se os tipos Rolando I ou II, e 77,5%, assumiram Masmali, Murphy e Purslow grau 0 ou 1, resultados estes similares aos descritos para equinos (SILVA et al., 2016), camelos (CHEN et al., 2011; AKHATAR; MASMALI; KHAN, 2014) e humanos hígidos (MASMALI, MURPHY E PURSLOW, 2014). Todavia, em estudo conduzido com cães portadores de ceratoconjuntivite seca que receberam tratamento com fator de crescimento neural, por via tópica, durante um mês, foram observados melhoria da cristalização do tipo IV, para tipo II, segundo escala proposta por

Rolando (COASSIN et al., 2005). Cabendo ressaltar que o tipo II também foi considerado como padrão para cães saudáveis por outros autores (GOUVEIA et al., 2013; HSU et al., 2015).

Como o teste de cristalização trata-se de estudo complementar da saúde da superfície ocular, a ocorrência de classificação tipo III e grau 3 nos animais hígidos, não evidencia necessariamente doença da superfície ocular porquanto fatores endógenos e exógenos, não estudados neste trabalho, podem ter interferido no achado.

6 CONCLUSÃO

O teste de cristalização da lágrima para cães é aplicável e possível de ser realizado pelos três métodos de colheita sugeridos, com obtenção de maior frequência do tipo I (ROLANDO, 1984) e grau 1 (MASMALI, MURPHY E PURSLOW, 2014). Desta forma, é factível a utilização de ambas escalas na classificação do fenômeno de cristalização em cães. Sugere-se que a tira de Schimer passe a ser adotada como método de colheita da lágrima para realização do teste de cristalização. E por tratar-se de método laboratorial simples e de baixo custo, o TCL poderá ser adotado na rotina oftálmica de cães, sequencialmente a avaliação quantitativa da lágrima pelo TLS-I, para figurar como avaliação complementar da superfície ocular.

REFERÊNCIAS

- AKHATAR, S.; MASMALI, A.; KHAN, A. Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears and refresh plus. **Acta Ophthalmologica-special issue: abstracts from the 2014 European Association for VISION and Eye Research Conference**, n.92, p.0, 2014.
- BEDEN, U.; TURGUT-COBAN, D.; AYGUN, C.; ULU-GUNGOR, I.; SULLU, Y.; ERKAN, D.; KÜÇÜKÖDÜK, S. Tear secretion and ferning patterns among premature and fullterm newborns. **The Turkish Journal of Pediatrics**, n.50, p.155-159, 2008.
- BITTON, E. Tear ferning: a valuable tool in determining dry eye. **Optician: Continuing education**. n.1, p.32-35, 2007
- CHEN, Z; SHAMSI, F.A.; LI, K; HUANG, Q; AL-RAJHI, A.A.; CHAUDHRY, I.A.; WU, K. Comparison of camel tear proteins between summer and winter. **Molecular Vision** n.17, p.323-331, 2011.
- COASSIN M, LAMBIASE A, COSTA N, DE GREGORIO A, SGRULLETTA R, SACCHETTI M, ALOE L, BONINI S. Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** 2005; **253**: 151-155.
- FOURCROY, A.F.; VAUQUELIN, L.N. Examen chimique des larmes et de l'humeur des narines (Chemical examination of tears and nasal humor). **Annales Chimie (Paris)**, n.10, p.113-30, 1791.
- GOLDIN, J. R. **Pesquisa em saúde e direito dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.
- GOUVEIA AF, REIS LS, FALCÃO MS, GALERA PD. Ferning test in health dogs. **American College of Veterinary Ophthalmologists 44th Annual Conference 2013**; Porto Rico. p. E26-E50.
- GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.739-753, 2004.
- KOGBE, O.; LIOTET, S.; TIFFANY, J.M. Factors responsible for tear ferning. **Cornea**, n.10, p.433-444, 1991.
- HAERINGEN, N.J.V. Clinical biochemistry of tears. **Survey of Ophthalmology**. v.26, n.2, 1981.
- HEMSLEY, S; COLE, N; CANFIELD, P; WILLCOX, M.D.P. Protein microanalysis of animal tears. **Research in Veterinary Science**, n.68, p.207-209, 2000.
- HORWATH, J.; ETTINGER, K.; BACHERNEGG, M.; BODNER, E.; SCHMUT, O. Ocular ferning test: Effect of temperature and humidity on tear ferning patterns. **Ophthalmologica**, n.215, p.102-107, 2001.

HSU KK, SHEEHAN GAERIG AM, SISLER SG. Utility of tear ferning as an adjunctive measure of tear film quality in brachycephalic dogs. **American College of Veterinary Ophthalmologists 46th Annual Conference 2015**. Coeur d'Alene. p. E17-E34.

MARAGOU, M.; VAIKOUSIS, E.; NTRE, A.; KORONIS, N.; GEORGIU, P.; HATZIDIMITRIOU, E.; SOTSIU, F. Tear and saliva ferning tests in Sjögren's syndrome (SS). **Clinical Rheumatology**, v.15, n.2, p.125-132, 1996.

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

MASMALI, A.M.; PURSLOW, C.; MURPHY, P.J. The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. **Clinical and Experimental Optometry**, n.97, p.399-406, 2014b.

NORN, M. Quantitative tear ferning: Methodologic and experimental investigations. **Acta Ophthalmologica**, n.66, p.201-205, 1988.

NORN, M. Quantitative tear ferning: clinical investigations. **Acta Ophthalmologica**, n.72, p.369-372, 1994.

PAPANICOLAOU, G.N. A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, n.51, p.316-328, 1946.

PEARCE, E.I.; TOMLINSON, A. Spatial location studies on the chemical composition of human tear ferns. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v.20, n.4, p.306-313, 2000.

POSA, A.; BRÄUER, L.; SCHICHT, M.; GARREIS, F.; BEILEK, S.; PAULSEN, F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. **Annals of Anatomy**, n.195, p.137-142, 2013.

ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret international journal of ophthalmology**, n.2, 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**, n.25, p.763-773, 2008.

SEBBAG, L., KASS, P.H., MAGGS, D.J. Reference values, intertest correlations, and test-retest repeatability of selected tear film tests in healthy cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.246, n. 4, p.426-435, 2015.

SILVA, L.R.; GOUVEIA, A.F.; FÁTIMA, C.J.T.; OLIVEIRA, L.B.; REIS, J.R.; FERREIRA, R.F.; PIMENTEL; C.M.; GALERA; P.D. Tear ferning test in horses and its correlation with ocular surface evaluation. **Veterinary Ophthalmology**, v.19, n.2, p. 117-123, 2016.

SLATTER, D. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 5ed. Philadelphia: W.B. Saunders company, 2013.

SMALL, D, HEVY, J, TANG-LIU, D. Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetics analysis: ofloxacin concentrations in rabbit tears after sampling with Schirmer tear strips, capillary tubes, or surgical sponges. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. n.16, p.439–446, 2000.

TATLIPINAR, S; GEDIK,S; IRKEÇ, M; ORHAN, M; ERDENER, U. Ocular ferning during the menstrual cycle in healthy women. **European Journal of Ophthalmology**. v.11, n.1, p.15-18, 2001.

VAIKOUSSIS, E.; GEORGIU, P.; NOMICARIOS, D. Tear mucus ferning in patients with Sjogren's syndrome. **Documenta Ophthalmologica**, n.87, p.145–51, 1994.

WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. **Veterinary clinics small animal practice**, n.38, p.251-268, 2008.

ANEXO I – ARTIGO SUBMETIDO

Veterinary Ophthalmology



Tear ferning test in healthy dogs

Journal:	<i>Veterinary Ophthalmology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oriá, Arianne; Federal University of Bahia, Anatomy, Pathology and veterinary Clinics Raposo, Ana Cláudia; Federal University of Bahia, Anatomy, Pathology and veterinary Clinics Araújo, Nayone; Federal University of Bahia, Anatomy, Pathology and veterinary Clinics Lima, Felipe; Federal University of Bahia, Anatomy, Pathology and veterinary Clinics Masmali, Ali; King Saud University, Department of Optometry
Keywords:	ocular surface, tear film, Schirmer test, micropipette, microcapillary, grading scale