



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

**PERFIL DE ELETRÓLITOS E PADRÕES DE
CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE AVES, RÉPTEIS E
HUMANOS**

ARIANE DE JESUS LACERDA
MÉDICA VETERINÁRIA

Salvador - BA
2019
ARIANE DE JESUS LACERDA

PERFIL DE ELETRÓLITOS E PADRÕES DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE AVES, RÉPTEIS E HUMANOS

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

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador (a): Prof^a Dr^a Arianne Pontes Oriá

**Salvador - BA
FEVEREIRO, 2019**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ARIANE DE JESUS LACERDA – Mestranda em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia, no departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas

Veterinárias, com ênfase em oftalmologia veterinária e superfície ocular de animais silvestres e domésticos, sob a orientação da professora Arianne Pontes Oriá. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia (2016). Áreas de atuação e experiência: Clínica médica de carnívoros domésticos. Oftalmologia de carnívoros domésticos.

Ficha catalográfica elaborada pelo sistema Universitário de
Bibliotecas (SIBI – UFBA)

L131p Lacerda, Ariane de Jesus

Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lágrima de aves, répteis e humanos / Ariane de Jesus Lacerda. — Salvador, 2019.

75 f. : il

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

(Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2019.

1. Oftalmologia veterinária. 2. Cristalização da lágrima. 3. Perfil eletrolítico da lágrima. 4. Animais selvagens. I. Pontes Oriá, Arianne.

CDU: 591.4

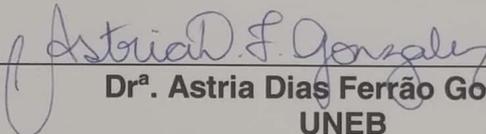
Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lágrima de aves, répteis e humanos

Ariane de Jesus Lacerda

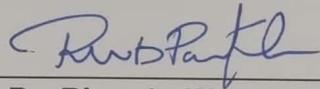
Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador, 19 de fevereiro de 2019

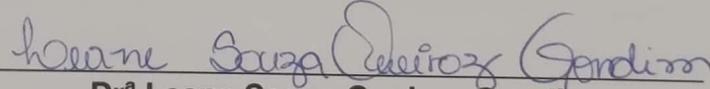
Comissão examinadora:



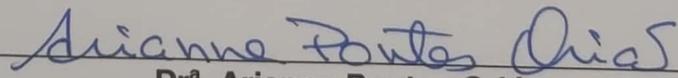
Dr^a. Astria Dias Ferrão Gonzales
UNEB



Dr. Ricardo Wagner Dias Portela
UFBA



Dr^a Leane Souza Queiroz Gondim
UFBA



Dr^a. Arianne Pontes Oriá
Orientadora
EMEVZ / UFBA

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela grandiosidade da sua obra, sem Ele nada é possível.

A minha família e meu amor, em especial a minha mãe (Jussiara Lacerda), meu pai (Ayres Lacerda *in memoriam*) e minha irmã (Alessandra Lacerda) que me apoiaram incentivaram e nunca me desampararam em nenhum momento e escolha da minha vida.

A minha orientadora prof. Dr^a Arianne Oriá, por sempre acreditar em meu potencial, me encorajar, pelo acolhimento como família, dando bronca, reclamando, por abrir as portas da sua casa e do seu coração, além de abdicar dos finais de semana, de tarde e de noite, para me orientar. E por sempre ressaltar o meu melhor e por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida.

A família Oftalmo (Ana Cláudia, Ana Paula, prof. Dr. Francisco Dórea, Hellen Bolzanni, Madalena Oliveira, Nayone Araújo, Vinícius José), por auxiliarem no conhecimento e construção deste trabalho. Cada um contribuiu de maneira muito significativa. Em especial a Ana Cláudia, prof. Dr. Francisco Dórea, Nayone Araújo e Vinícius José, por terem vivenciado e dividido as todas as tensões e incentivado para o êxito e conclusão deste trabalho.

A toda a equipe do CETAS, Myster Cayman e Projeto Tamar por terem contribuído para a pesquisa concedendo os animais do presente estudo. Em especial a Victor Curvelo, Thaís Pires, Fernanda Libório, Josiano Torezani e Eduardo Votta por viabilizarem todo esse projeto.

Ao professor Dr^o Ricardo Portela e ao seu orientado, o médico veterinário Marcos Mendonça, pelo auxílio no processamento das amostras e contribuição com este trabalho.

Aos professores, funcionários, coordenadores da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, por ter me ofertado subsídios para a aprendizagem e experiência profissional. Ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA pelo apoio e subsídio fornecido.

Aos professores, funcionários, coordenadores e residentes do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, pelo aprendizado e experiência profissional.

Aos animais que são instrumentos dos nosso aprendizado e nos correspondem com seu amor e atenção.

Por fim, a FAPESB que subsidiou grande parte deste estudo através do auxílio financeiro via bolsa de estudos.

“Tem gente que espera por uma luz, mas não levanta para acender o interruptor”

(Autor desconhecido)

RESUMO

LACERDA, A. J. Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lágrima de aves, répteis e humanos. 2019. p.76 . Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

Objetivou –se com o presente estudo, descrever os eletrólitos presentes na lágrima de aves e répteis e associar estes valores a cristalização do filme lacrimal. Dez animais de cada espécie: *Ara ararauna*, *Amazona aestiva*, *Tyto alba*, *Rupornis magnirostris*, *Chelonoidis carbonaria* e *Caiman latirostris*, 5 *Caretta caretta* e 10 humanos foram submetidos a colheita de lágrima por meio do teste lacrimal de Schirmer. Aliquota foi posta em *pool* para avaliação das concentrações de proteínas totais, cloreto, fósforo, ferro, sódio, potássio, cálcio e ureia. Para o teste de cristalização da lágrima, amostras de cerca de 2 μ L de cada espécie fora colocadas em lâmina de vidro até completa secagem à temperatura e umidade controladas e observadas em microscópio de luz polarizada. Os padrões de cristalização foram classificados de acordo com as escalas de Rolando e Masmali. Houve maior quantidade de proteínas totais em humanos, seguido de coruja e jacaré. Relativamente a ureia lacrimal, foi obtido maior concentração na tartaruga-marinha, seguida do jacaré e da coruja. Os valores obtidos dos eletrólitos mostraram balanço eletrolítico similar entre as espécies com valores elevados de sódio, cloreto e ferro. A classificação dos padrões de cristalização da lágrima na escala de Rolando variaram de I a II e de 0 a 2 para a escala de Masmali para aves; e de II a IV (Rolando) e 2 a 4 (Masmali) para répteis. Arranjos da cristalização de algumas espécies tiveram classificações maiores, todavia tal condição não pode ser atribuída a doenças, e possivelmente sejam derivadas da composição da lágrima. Não houveram semelhanças nos padrões de cristalização entre espécies filogeneticamente próximas ou expostas ao mesmo ambiente. No entanto, espécies marinhas e lacustres apresentaram maiores valores de classificação. O equilíbrio iônico do fluido lacrimal de aves e répteis possui um balanço semelhante ao descrito para humanos com maior presença de sódio e cloreto, contudo os cristais da lágrima apresentaram diferenças nos arranjos entre as espécies comparativamente aos humanos. As classificações da cristalização revelaram que graus e tipos maiores não necessariamente estão relacionados a quadros de enfermidade do filme lacrimal em animais silvestres.

Palavras-chave: Animais silvestres, Composição da lágrima, Dosagem de eletrólitos na lágrima, Escala de classificação, *Tear Ferning Test*

ABSTRACT

LACERDA, A. J. Electrolytes profile and crystallization patterns of the birds, reptiles and humans tears. 2019. p.76. Dissertation (Masters in Animal Science in the Tropics) - School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia, UFBA, Salvador, 2019.

To describe the electrolytes presented in tears of some species of birds and reptiles, and associate these values to the tear film crystallization pattern. Ten animals of each species: *Ara ararauna*, *Amazona aestiva*, *Tyto alba*, *Rupornis magnirostris*, *Chelonoidis carbonaria* and *Caiman latirostris*; five *Caretta caretta* and 10 human subjects were submitted to tear sampling using the Schirmer tear test. Aliquot were put in a pool to assess concentrations of total proteins, chloride, phosphorus, iron, sodium, potassium, calcium and urea. To the tear ferning test, samples of about 2 μ L of each species were dried on a clean microscope glass slide at room temperature and humidity, and observed under a polarized light microscope. Crystallization patterns were classified according Rolando and Masmali scales. There was higher amount of total proteins in humans, followed by owls and caimans. Regarding tear urea, higher values were obtained for sea turtles, followed by caimans and owls. The electrolyte values showed similar electrolytic balance between species, with higher results of sodium, chloride and iron. The grading of tear crystallization patterns using Rolando scale ranged from I to II and ranged from 0 to 2 using Masmali scale in birds; and from II to IV (Rolando) and 2 to 4 (Masmali) in reptiles. Crystallization arrangements of some species had higher scores; however this condition could not be attributed to disease states, possibly being derived from the tear composition. There were no similarities in the tear crystallization patterns between phylogenetically-related species or exposed to the same environment. However, marine and lacustrine species presented increased grading scales. The lacrimal fluid ionic balance in birds and reptiles possess a similar balance to described for humans, with increased presence of sodium and chloride. However, the tear crystals had different arrangements between species, when compared to humans. Crystallization classification revealed that higher grades and types were not necessarily related to tear film disease states in wild animals.

Keywords: Grading scales, Tear composition, Tear electrolyte dosage, Tear ferning test, Wild animals

LISTA DE FIGURAS

		Página
REVISÃO DE LITERATURA GERAL		
Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lágrima de aves, répteis e humanos.		
Figura 1	Ilustração esquemática das camadas da lágrima de humanos e os componentes presentes.....	15
Figura 2	Desenho representativo do novo modelo secreção do fluido das glândulas lacrimais.....	17
Figura 3	Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo classificação de Rolando (1984).....	21
Figura 4	Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo classificação de Masmali et al. (2014).....	22
Figura 5	Diagrama esquemático do modelo proposto da cristalização da lágrima.	24
Figura 6	Imagem da arara canindé (<i>Ara ararauna</i>).....	28
Figura 7	Imagem do papagaio verdadeiro (<i>Amazonas aestiva</i>).....	29
Figura 8	Imagem da coruja suindara (<i>Tyto alba</i>).....	30
Figura 9	Imagem do gavião carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>).....	31
Figura 10	Imagem do jabuti piranga (<i>Chelonoidis carbonarius</i>).....	32
Figura 11	Imagem da tartaruga cabeçuda (<i>Caretta caretta</i>).....	34
Figura 12	Imagem do jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostrus</i>).....	35
Figura 13	Imagens dos testes de avaliação da produção lacrimal.....	36
 CAPÍTULO 1		
Figura 1	Representação das dosagens de proteínas totais nas lágrimas de aves, répteis e homem.....	47
Figura 2	Representação das dosagens de uréia nas lágrimas de aves, répteis e homem.....	48
Figura 3	Representação das dosagens de eletrólitos nas lágrimas de aves, répteis e homem.....	49
Figura 4	Exemplos dos padrões de cristalização da lágrima em animais silvestres de acordo com as escalas de classificação de Rolando e Masmali.....	53

LISTA DE TABELAS

		Página
REVISÃO DE LITERATURA		
Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lágrima de aves, répteis e humanos.		
Tabela 1	Descrição dos parâmetros considerados para classificação dos padrões de cristalização da lágrima segundo Rolando (1984) e Masmali et al. (2014).....	20
 CAPÍTULO 1		
Tabela 2	Mediana \pm intervalo semi-interquartil para teste de cristalização da lágrima (TCL) de aves e répteis.....	51
Tabela 3	Frequência das classificações do teste de cristalização da lágrima de aves e répteis pelas escalas de Rolando e Masmali.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCL	Teste de cristalização da lágrima
TLS	Teste lacrimal de Schirmer
Mm	Milímetro
TLVF	Teste da lágrima do vermelho de fenol
TEPA	Teste da tira endodôntica de papel absorvente
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
°C	Graus Celsius
%	Por cento
FLPC	Filme lacrimal pré-corneano
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
MUC	Mucina
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente
mm/min	Milímetros/minuto
mm/15s	Milímetros/15 segundos
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia
Na	Sódio
P	Fósforo
K	Potássio
Fe	Ferro
Ca	Cálcio

SUMÁRIO

PERFIL DE ELETRÓLITOS E PADRÕES DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA DE AVES, RÉPTEIS E HUMANOS

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 SUPERFÍCIE OCULAR E DESCRIÇÃO DA LÁGRIMA.....	13
2.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DA LÁGRIMA.....	15
2.3 AVALIAÇÃO DA LÁGRIMA.....	18
2.3.1 Avaliação quantitativa	18
2.3.2 Avaliação qualitativa	19
2.3.2.1 Teste de cristalização da lágrima ou <i>Tear Ferning Test</i>	20
3 PARTICULARIDADES DA SUPERFÍCIE OCULAR DE AVES E RÉPTEIS..	24
4 ESPÉCIES PESQUISADAS	27
4.1 <i>Ara ararauna</i> (Arara canindé).....	27
4.2 <i>Amazona aestiva</i> (papagaio verdadeiro).....	28
4.3 <i>Tyto alba</i> (coruja suindara).....	29
4.4 <i>Rupornis magnirostris</i> (gavião carijó).....	30
4.5 <i>Chelonoidis carbonarius</i> (jabuti piranga).....	31
4.6 <i>Caretta caretta</i> (tartaruga marinha cabeçuda).....	33
4.7 <i>Caiman latirostris</i> (jacaré-de-papo-amarelo).....	34
5 OBJETIVOS	38
5.1 OBJETIVO GERAL.....	38
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
6 HIPÓTESES	38
CAPÍTULO 1	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1 Considerações éticas	43
2.2 Espécies	44
2.3 Colheita da amostra e dosagem de eletrólitos da lágrima	44
2.4 Teste de cristalização da lágrima	45
2.5 Análise estatística	45
3 RESULTADOS.....	46
4 DISCUSSÃO.....	54
5 CONCLUSÃO.....	56
6 FINANCIAMENTO.....	57
7 AGRADECIMENTOS.....	57
8 REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS (MATERIAL SUPLEMENTAR)	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERENCIAS	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui grande biodiversidade de espécies animais, em diferentes biomas, e estudos sobre estes animais são de notória importância na preservação das espécies (ICMBio, 2016). O tráfico de animais é considerado um dos fatores mais agravantes para a ocorrência de lesões oftálmicas, principalmente em aves de vida livre, porém não significa que não ocorra em outras espécies (WILLIAMS et al., 2006). Desta forma, existe a necessidade de referências que possam orientar de maneira mais detalhada parâmetros fisiológicos para cada espécie e modelos de protocolos oftálmicos mais eficientes para auxiliar o médico veterinário e, paralelamente, explorar melhor as opções diagnósticas disponíveis. Desta forma, as descrições literárias que possam abranger estes aspectos tendem a potencializar e valorizar a medicina de conservação.

A adequada semiotécnica oftálmica propicia a identificação de influências ambientais ou individuais, sejam por alterações infecciosas, traumáticas, metabólicas ou iatrogênicas, nos parâmetros estudados (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008ab; SWINGER et al., 2009; LANGE et al., 2012; GELATT, 2013). Contudo, devido a sua ampla variação entre as espécies e dificuldades como a indisponibilidade de equipamentos e estruturas adequadas a campo, existe a necessidade de estabelecer intervalos de normalidade para cada espécie, sempre que possível (MONTIANI-FERREIRA, 2007; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008ab; LANGE et al., 2012).

Dentre os parâmetros estabelecidos, o teste de cristalização da lágrima (TCL) consiste de avaliação quali-quantitativa da superfície ocular e é empregado na medicina humana em pacientes hígidos e doentes (ROLANDO 1984, MASMALI et al., 2014). O fenômeno da cristalização ocorre através da evaporação da lágrima em virtude da sua composição (proteínas, muco e eletrólitos) e do equilíbrio soluto-solvente, que ao secar forma um cristal a partir da supersaturação do fluído (GOLDING e BRENNAN, 1989). Segundo Masmali (2014) um dos principais componentes que interferem no padrão de cristalização da lágrima são os eletrólitos componentes. Juntamente a isto, sabe-se que pacientes portadores de alterações no filme lacrimal que cursam com quadros de hiperosmolaridade, possuem padrão de cristalização do filme lacrimal correspondente a quadros de enfermidade. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos eletrólitos presentes na lágrima dos animais e adição de informações como estas podem permitir uma avaliação qualitativa com menor subjetividade, além de sugerir as diferenças encontradas entre os padrões de cristalização entre as diferentes espécies.

Rolando (1984) e Masmali et al. (2014) propuseram escalas para padronização dos cristais (*ferns*) formados, que possibilita classificar este fenômeno e caracterizá-lo de

acordo com o estado de normalidade ou enfermidade (MASMALI et al., 2014; ORIÁ et al., 2018), porém descrições para espécies de outras classes ou condições distintas de enfermidades oculares não foram encontradas. Estudos anteriores na medicina veterinária descreveram parâmetros oftálmicos de aves e répteis, e relataram diferenças no aparato lacrimal, na produção da lágrima e no número de incursões palpebrais (CARDOSO-BRITO et al., 2018; ORIÁ et al., 2015a; ORIÁ et al., 2015b). Todavia, o teste de cristalização da lágrima foi somente reportado em cães, equinos, macacos e camelos saudáveis e cães portadores de ceratoconjuntivite seca (MASMALI et al., 2018; ORIÁ et al., 2018a; RAPOSO et al., 2018; SILVA et al., 2016; WILLIAMS e HEWITT, 2017).

A compreensão e adoção de avaliações qualitativas da lágrima para aves e répteis podem suprir carências do conhecimento dos componentes presentes neste fluido, tal como, ser utilizado como parâmetro de normalidade para eles. Ressalta-se que seu entendimento é fundamental para a manutenção da integridade da superfície ocular, com intuito de montar estratégias de conservação adequadas para sua manutenção. Este trabalho irá permitir uma avaliação qualitativa menos invasiva da superfície ocular desses animais, além de auxiliar no entendimento dos padrões de cristais formados através do teste da cristalização e da composição da lágrima, presentes em termos de eletrólitos. Objetivou-se, desta forma, descrever o teste de cristalização da lágrima para determinar seu possível uso e melhor entendimento da superfície ocular de aves e répteis e correlacionar os padrões obtidos com o perfil dos eletrólitos estudados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Superfície ocular e descrição da lágrima

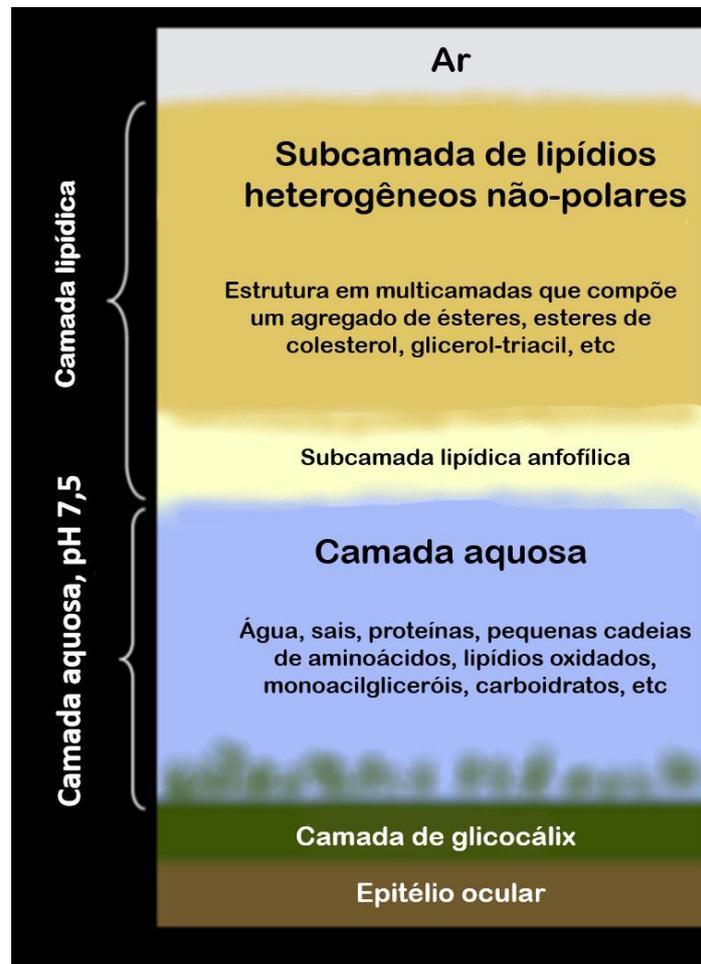
A superfície ocular é constituída pelos epitélios corneano e conjuntival, limbo, e seus anexos compostos pelas glândulas lacrimais e acessórias, além das glândulas de meibômio, ducto nasolacrimal e as glândulas de Moll e Zeis localizadas nos cílios (região das pálpebras, que são estimuladas através das incisões) e o filme lacrimal que compõem sistema denominado de Unidade Lacrimal Funcional juntamente com uma rede de reflexos neuronais em humanos (GIPSON, 2007). O olho quando aberto, expõe a superfície da córnea e da esclera e estas são protegidas pelo filme lacrimal que recobre a superfície (ZHOU e BEUERMAN, 2012).

A lágrima é uma estrutura complexa constituída por líquido dividida didaticamente em três camadas: a mais superficial é a lipídica; sua camada intermediária, a fase aquosa; e a camada mais interna e intimamente ligada a córnea, é composta por mucina, para humanos e outras espécies de mamíferos (WILLIAMS, 2017). Alguns autores preconizaram que a fase aquosa e a mucoide figuram como única camada denominada de gel-mucina entretanto, acredita-se que seus componentes possuem íntima interação (Figura 1) (ROYLE, 2008; WILLIAMS, 2008).

Juntamente com as pálpebras, o filme lacrimal, possui como função principal a manutenção da saúde da superfície ocular por proteção mecânica, física e microbiológica que impede a presença de corpos estranhos e a mantém sempre lubrificada e hidratada (AL-SAEDI et al., 2016). Outrossim, promove a oxigenação, o transporte de nutrientes e de células de defesa para a região da córnea que, por ser avascular, necessita deste aporte externo para manutenção da sua higidez (RIBEIRO et al., 2008; WILLIAMS, 2008).

Vários são os fatores que podem alterar a composição e a dinâmica do filme lacrimal, tais como modificações na conformação anatômica das pálpebras, processos inflamatórios conjuntivais, idade, ciclo estral e sexo (UNCU et al., 2006), fatores estes já avaliados em humanos que tornam complexo o estudo deste fluido. Além disso, o pequeno volume apresentado no momento das colheitas e a limitação nas metodologias de avaliações disponíveis dificultam a sua utilização na rotina clínica (MASMALI et al., 2014).

Figura 1. Ilustração esquemática das camadas da lágrima de humanos e os componentes presentes. Nota-se que na interface entre as camadas da lágrima substâncias com características químicas que permite o contato e a dinâmica harmônica. **Fonte:** Adaptado de BUTOVICH et al., 2012.



2.1.1 Produção e composição da lágrima

A fase mais externa do filme lacrimal é composta por lipídeos que são secretados por estruturas tubulares acinares situadas nos tarsos palpebrais superior e inferior denominadas glândulas de meibômio (BUTOVICH et al., 2012). Tal aparato glandular é acionado de maneira física e, a cada incursão palpebral são estimuladas a secretar lipídeos que compõem a lágrima, juntamente com estímulos neurais e hormonais, ainda não bem elucidados (SCHIRRA et al., 2006). Esta camada possui cerca de $0,1\mu\text{m}$ de espessura e é composta por uma mistura de ácidos graxos, triglicerídeos e ésteres (BUTIVICH et al., 2012).

Na sua porção mais externa, são encontrados lipídeos não-polares e na mais interna lipídeos polares. A principal função da camada lipídica da lágrima é evitar a evaporação do componente intermediário aquoso, condição esta importante na patogênese do olho seco, além de impedir a contaminação por glândulas sebáceas da pele

e evitar que a lágrima escape da superfície ocular (AL-SAEDI et al., 2016; MASMALI et al., 2014; WILLIANS, 2008).

A fase aquosa, com aproximadamente 6 a 10µm de espessura em interface com a fase lipídica externamente e mucinosa na porção interna do filme lacrimal, é produzida na glândula lacrimal principal, localizada dorsolateralmente à pálpebra superior e também, pela glândula da membrana nictitante, na maioria das espécies animais (CABRAL et al., 2005; TIFFANY, 2003; TIFFANY, 2008). A secreção pela glândula lacrimal principal está sob o controle neural e hormonal e pelas glândulas lacrimais acessórias encontradas na conjuntiva. Possui inervação parassimpática e simpática, com arco-reflexo identificado a partir dos 15 nervos sensoriais na córnea, de ativação parassimpática eferente e nervos simpáticos que se originam do núcleo motor parassimpático do nervo facial, que passam através do nervo trigêmeo para a glândula lacrimal (KRENZER et al., 2001; WILLIANS, 2008).

Em adição, é possível encontrar na composição do filme lacrimal citocinas, proteínas, vitaminas, fatores de crescimento, peptídeos, hormônios, antimicrobianos e imunoglobulinas (MASMALI et al., 2014) que, em conjunto, fornecem proteção para a superfície ocular, manutenção da estrutura do filme lacrimal e da pressão osmótica, além de atuar como tampão para conservação do pH (STERN et al., 2004; TIFFANY, 2008).

Hormônios andrógenos são potentes estimuladores da produção lacrimal, desta forma efeitos de gênero e relacionados com a idade são fatores a serem considerados relativamente à produção da lágrima (KRENZER et al., 2001; SCHAUMBERG et al., 2001; UNCU et al., 2006).

As principais proteínas encontradas na porção aquosa são as lisozimas, lactoferrinas, lipocalinas e imunoglobulina A (IgA). A albumina, a imunoglobulina G (IgG), a ceruloplasmina e a transferrina também já foram descritas para humanos (AL-SAEDI et al., 2016; DAVIDSON & KUONENT, 2004; SHAMSI et al., 2011).

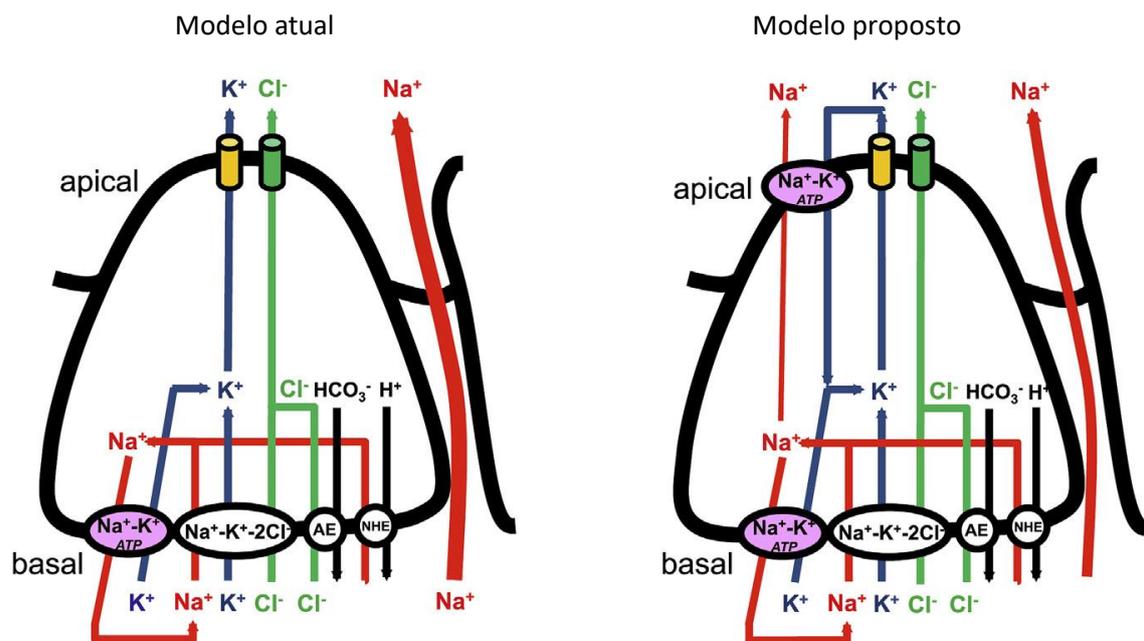
Nesta porção é possível avaliar a quantidade de eletrólitos presentes no filme lacrimal onde são encontradas ampla miríade de íons secretados pelo epitélio acinar e ductal, como o sódio, o potássio, o magnésio, o cálcio, o cloreto, o bicarbonato e o fosfato, que estão diretamente ligados a osmolaridade do filme lacrimal. A quantidade de proteínas presentes na lágrima de humanos é relativamente baixa quando comparada aos demais componentes. Logo, são partícipes na manutenção da saúde e integridade da superfície ocular e alterações nas concentrações destes íons, podem estar associadas com olho seco (MASMALI et al., 2014; TIFFANY, 2008).

Anormalidades no componente aquoso do filme lacrimal podem estar diretamente relacionadas as alterações quantitativas na lágrima e são diagnosticadas pelo do teste

lacrimal de Schimer (TLS-I), (SWINGER et al., 2009), porém alterações bioquímicas da lágrima ocasionam deficiências qualitativas que são de difícil diagnóstico em virtude das alterações sutis que são causadas. A dosagem de eletrólitos na lágrima possibilita auxiliar no diagnóstico precoce de alterações qualitativas do filme lacrimal (BEST, HENDRIX e WARD, 2015).

A fisiologia das células acinares da glândula lacrimal foi descrita em 1986 por WHOOD e MIRCHEFF, propunham que um transporte unidirecional de íon e água através das células epiteliais. Em 2019 um novo modelo foi proposto (ALMÁSSY et al., 2019) que supõe que o gradiente elétrico do sódio estimula a produção lacrimal através do funcionamento das bombas de sódio e potássio. Desta forma de acordo com o modelo proposto, o potássio e o cálcio são íons mais presentes no meio intracelular e o sódio e o cloreto mais presentes no fluido extracelular, sendo estes os maiores mais abundantes eletrólitos encontrados no fluido lacrimal (Figura 2).

Figura 2. Desenho representativo do novo modelo secreção do fluido das glândulas lacrimais. Notar que no modelo atual existe um transporte unidirecional de íons e água através das células epiteliais, enquanto no modelo proposto supõe-se que ocorre o estímulo das bombas de sódio e potássio, onde, o potássio e o cálcio seriam os íons mais presentes no meio intracelular enquanto que o sódio e cloreto seriam encontrados no meio extracelular. **Fonte:** Modificado de Almássy et al., 2019.



A fase mucosa do filme lacrimal 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 filme lacrimal ao epitélio corneano hidrofóbico, além de inibir a aderência de bactérias (MASMALI et al., 2014; ROYLE et al., 2008; WILLIAMS, 2008).

Estudos mais recentes mostraram que a distinção entre as camadas aquosa e de mucina não é completa. O epitélio corneano possui superfície de glicocálix composta de mucinas (MUC), como MUC 1, 3, 4, 12, 15, 16, 17 e 20 que atravessam a membrana e preenchem a camada aquosa com pequenas mucinas solúveis (MUC 7 e 9), com formação de gel-mucoso ou gel-mucina onde também se encontram as mucinas MUC 2, 5, 6, e 19 (AL-SAEDI et al., 2016, GIPSON et al., 2004; ROYLE et al., 2008; WILLIANS, 2008).

2.2 Avaliação da lágrima

2.2.1 Avaliação quantitativa

O teste lacrimal de Schirmer (TLS) atua na avaliação quantitativa da produção lacrimal, importante ferramenta para o diagnóstico de doenças associadas à produção do fluxo da lágrima, principalmente aquelas que envolvem a córnea e a conjuntiva. Na oftalmologia veterinária é considerado teste padrão ouro para a avaliação quantitativa (SWINGER et al., 2009). Porém deve ser considerado a espécie em virtude das diferenças do tamanho da fenda palpebral e do saco conjuntival no momento da interpretação dos resultados (SWINGER et al., 2009; MOORE & BONAGURA, 2000; WILLIANS, 2008).

O TLS consiste de tira de papel padronizada (milimetrada de 5 a 35mm), que deve ser inserida no saco conjuntival inferior por um minuto, e o comprimento de papel umedecido é lido imediatamente pela escala milimétrica contida na tira (WIESER et al., 2013). 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 tópica de anestésico (BARSOTTI et al., 2013; HIDA et al., 2005; ORIÁ et al., 2015). O teste lacrimal de Schirmer também é frequentemente utilizado como método de colheita da lágrima, que sobrepõe-se a outros métodos por já ser empregado como semiotécnica obrigatória na oftalmologia veterinária (ORIÁ et al., 2018). A capacidade absorviva do papel filtro, possibilita que após a centrifugação haja volume de amostra que poderá ser utilizado para diferentes avaliações qualitativas da lágrima (SAAD e MASMALI, 2018).

O teste da lágrima do vermelho de fenol (TLVF) é usado como alternativa prática principalmente em animais silvestres (HOLT et al., 2006; SEBBAG et al., 2015), em virtude do tamanho da tira de Schirmer não se adequar a todas as espécies. A extremidade de um fio de algodão, impregnado com vermelho de fenol é colocado no fórnice conjuntival durante 15 segundos e um paquímetro digital é utilizado para mensurar a

porção umedecida (BECKWITH-COHEN et al., 2013; HOLT et al., 2006; LIMA et al., 2015).

O teste da tira endodôntica de papel absorvente (TEPA) foi adotado como alternativa ao teste de Schirmer e o vermelho fenol. Consiste da inserção da ponta de papel no fórnice conjuntival e é realizada a leitura após o período de 15 (porquinho-da-índia) ou 60 segundos (sagui-de-tufo-preto) por exemplo, a depender da espécie animal em avaliação, a porção umedecida é mensurada também com o auxílio de paquímetro digital (LANGE, et al., 2012; ORIÁ et al., 2015; YOSHINO et al., 2013).

2.3.2 Avaliação qualitativa

Inúmeros são os testes descritos para avaliação qualitativa da superfície ocular, principalmente em pacientes com suspeita de ceratoconjuntivite seca, os quais incluem a utilização de corantes vitais (rosa de bengala, lissamina verde e fluoresceína), que auxiliam no diagnóstico durante avaliação da superfície ocular tanto em humanos quanto em animais (WILLIAMS, 2017). Outros exemplos são o teste de osmolaridade e avaliações citológicas conjuntivais por impressão, além de análise de perfil proteico do filme lacrimal. Porém estes exames demandam equipamentos mais sofisticados e análise laboratorial, o que aumenta o custo dos testes (FELBERG et al., 2008; RAPOSO et al., 2018).

A instabilidade do filme lacrimal não está associada apenas a alterações na porção aquosa, uma vez que alterações nas glândulas de meibômio também cursam com evaporação do filme, visto que, alterações na secreção de mucina também se relacionam com instabilidade do mesmo. Nestes casos, alguns testes clínicos e/ou laboratoriais devem ser consignados para assegurar a qualidade da lágrima (testes estes mencionados acima) (WILLIAMS, 2017).

2.3.2.1 Teste de cristalização da lágrima ou *Tear Ferning Test*

Fourcroy e Vauquelin (1791) foram os primeiros estudiosos a analisarem o fenômeno da cristalização, porém na época o teste não logrou amplo período de utilização. Somente em 1946, Papanicolau avaliou a cristalização através do muco cervical em mulheres. Este evento só foi novamente estudado em 1984, quando Rolando criou uma escala de classificação para os padrões de cristalização da lágrima, para utilização na rotina clínica para diagnóstico de pacientes portadores de CCS e o resultados das classificações foram divididos em quatro categorias de acordo com as alterações observadas. Masmali et al. (2014) rediscutiram este entendimento e atribuíram a

cristalização à osmolaridade do filme lacrimal, devido sua composição iônica e reformularam a escala proposta por Rolando (1984) (Tabela 1, Figuras 3 e 4).

Tabela 1 – Descrição dos parâmetros considerados para classificação dos padrões de cristalização da lágrima segundo Rolando (1984) e Masmali et al. (2014).

ROLANDO (1984)	MASMALI et al. (2014)
Tipo I – Formação de cristais repleto de ramos sem espaço entre os núcleos.	Grau 0 – Formação completa de cristais sem nenhum espaço entre eles.
Tipo II – Apresenta ramos menores, com pequenos espaços entre eles.	Grau 1 – Ocorre diminuição da densidade dos ramos com aparecimento de pequenos espaços.
Tipo III – Apresenta poucos ramos com formação de cristais grosseiros, curtos e sem ramificações, além de amplo espaço entre eles.	Grau 2 – Ramos são menores, mais grosseiros e com presença de espaços maiores.
Tipo IV – Ausência total de cristais ou raros cristais com poucas ramificações.	Grau 3 – Espaço entre os núcleos são grandes, tem formação dos cristais, porém estes são maiores, mais grosseiros e espaçados.
	Grau 4 – Não existe a formação dos cristais. Ausência total.

Figura 3. Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo classificação de Rolando (1984). Nota-se em (A): padrão tipo I, em (B): padrão tipo II, em (C): padrão tipo III e em (D) padrão tipo IV. Fonte: Adaptado de Rolando, 1984.

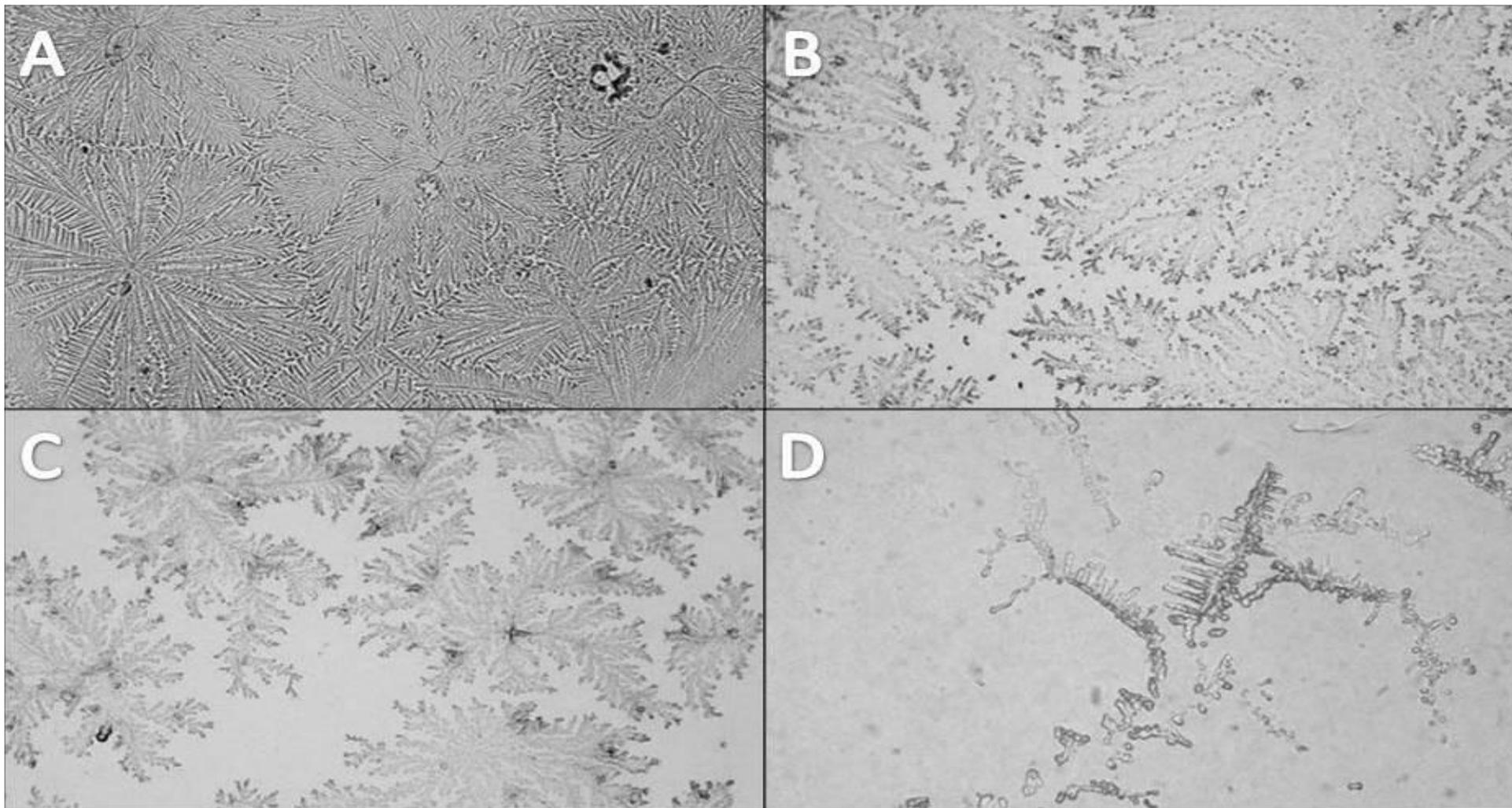
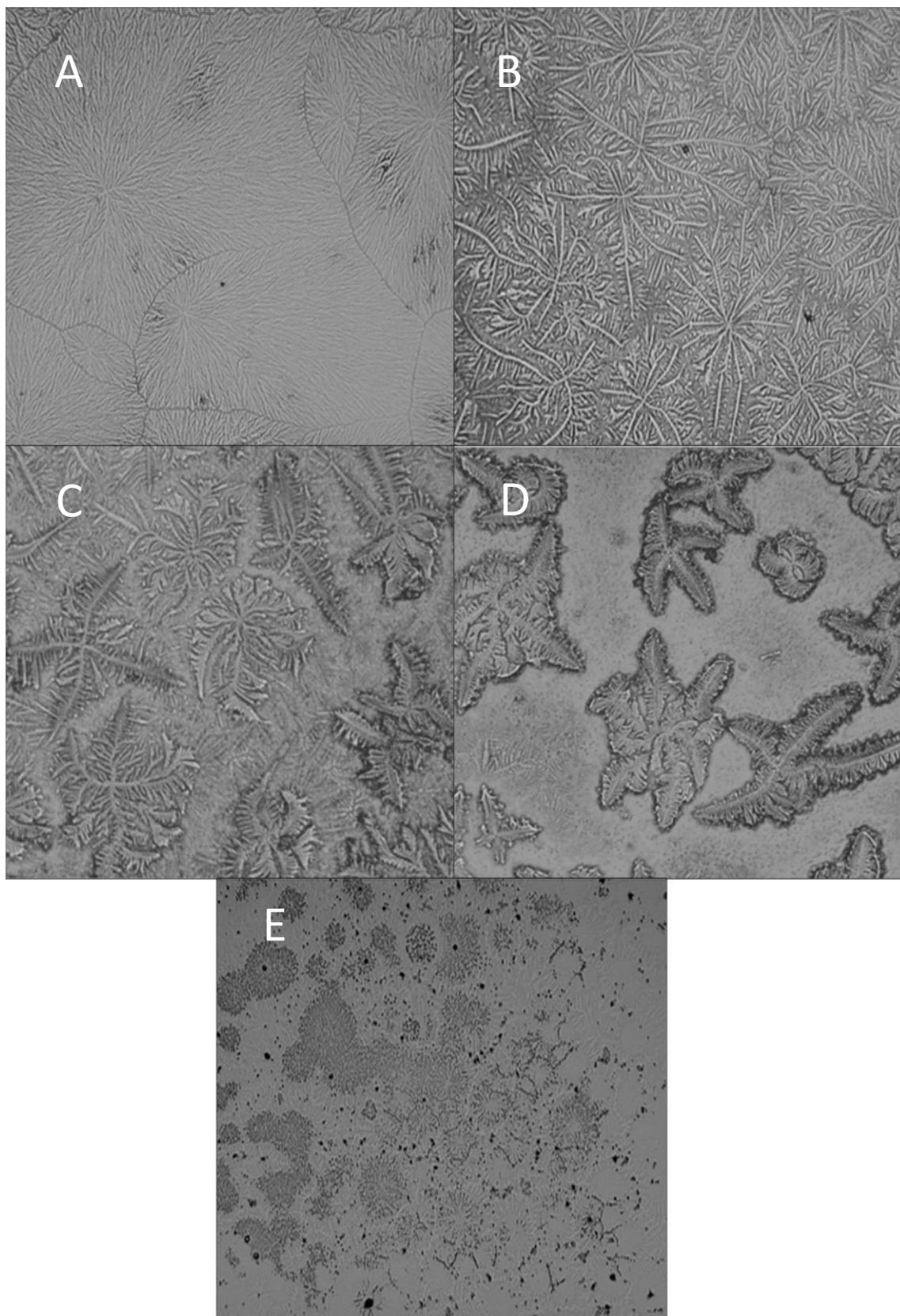


Figura 4. Padrão de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 10x segundo classificação de Masmali et al. (2014). Notar-se em (A): grau 0, em (B): grau, em (C): grau 2, em (D): grau 3 e em (E): grau 4. Objetiva de 10x. Fonte: Adaptado de Masmali et al., 2014.

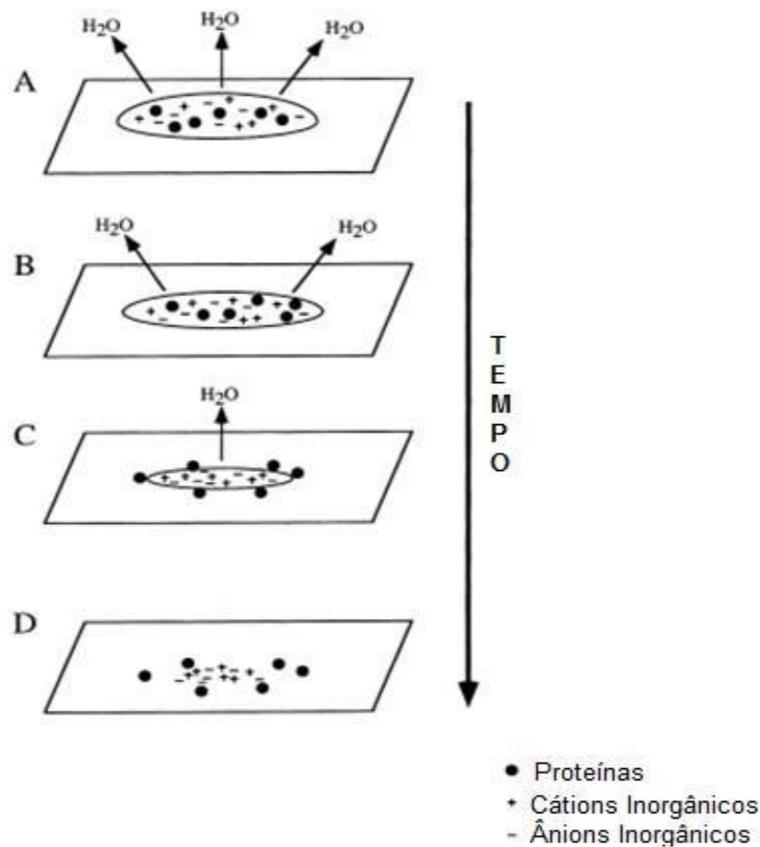


Na oftalmologia humana, o TCL é amplamente estudado e já foi descrito em várias condições sistêmicas e alterações oculares dos pacientes, além de ser verificada a sua aplicabilidade e reprodutibilidade (LI et al., 2007; MASMALI et al., 2014). A técnica consiste em depositar uma gota de lágrima em lâmina de vidro de microscopia, deixá-la secar em temperatura e umidade relativa do ar controladas, com variação entre 21–26°C e 50–60% de umidade e aguardar completa secagem para identificação do padrão de cristalização formado que deverá ser avaliado e classificado de acordo com as escalas pré-determinadas (HORWATH et al., 2001; MURUBE et al., 2004; ORÍA et al., 2018).

É importante ressaltar que a temperatura e a umidade, assim como sujidades, teor de muco e taxa de evaporação podem atrapalhar na formação dos cristais e devem ser minimizados ou evitados (HORWATH et al., 2001; MASMALI et al., 2014). Para a colheita da lágrima, diversos estudos já foram realizados e alguns diferentes materiais de colheita já foram consignados, tais como tubos capilares de vidro, espátulas, pipetas e tiras de Schirmer (MASMALI et al., 2015; ORÍA et al., 2017).

Quando a gota de lágrima é deixada secar, as proteínas são conduzidas a margem da gota e o centro fica repleto de íons que formam os padrões de cristalização (Figura 4). Desta forma, sugere-se que micromoléculas tais como as mucinas e proteínas estão presentes na formação do padrão de cristalização observado (KULICHIKLIN et al., 2012). A hiperosmolaridade então tem sido relatada como o fator que afeta os padrões do TCL de maneira que este passou a ser indicado para detecção de filme lacrimal hiperosmótico (PEARCE e TOMLINSON, 2000).

Figura 5. Diagrama esquemático do modelo proposto da cristalização da lágrima. Nota-se, que ao decorrer do tempo, ocorre a evaporação da água e resulta na concentração de eletrólitos para provocar a deposição seletiva de macromoléculas (proteínas) na borda gota. Em seguida, ocorre a cristalização dos sais inorgânicos no centro da gota quando a super-saturação é atingida. **Fonte:** Adaptado de Pearce e Tomlinson (2000).



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

3.1.1 Particularidades da superfície ocular de aves e répteis

A oftalmologia veterinária tem avançado na compreensão das particularidades anatômicas, fisiológicas e de enfermidades entre animais silvestres e exóticos, o que é refletido em diferenças no manejo e adaptações no controle sanitário para cada espécie (GALERA et al., 2002; GELATT, 2013; LAWTON, 2006; SELMI et al., 2003).

A adequada semiotécnica oftálmica propicia a identificação de influências ambientais ou individuais, sejam por alterações infecciosas, traumáticas, metabólicas ou iatrogênicas, sobre os parâmetros estudados (GELATT, 2013; LANGE et al., 2012;

MONTIANI-FERREIRA et al., 2008; SWINGER et al., 2009). Contudo, devido a sua ampla variação entre as espécies e dificuldades tais como a indisponibilidade de equipamentos e estruturas adequadas a campo, existe a necessidade de estabelecer intervalos e parâmetros de normalidade para cada espécie, sempre que possível (LANGE et al., 2012; MONTIANI-FERREIRA, 2007; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008).

O olho e a função visual destas espécies são de grande importância para seu estilo de vida e interação ao ambiente. A lágrima é o fluido corpóreo de mais intrínseco contato com o meio e é vital para a manutenção da superfície ocular e, conseqüentemente, da visão de aves e répteis (COLLIN E COLLIN, 2006). Ao ser observado que existem diferenças para estas classes relativas às propriedades e mecanismos da superfície lacrimal, aventa-se a presença de distintos componentes na lágrima desses animais e quais interferências poderiam ocasionar em avaliações qualitativas, como o teste de cristalização.

As aves destacam-se por possuir função visual bem desenvolvida e esta alta acuidade é determinante para sua sobrevivência (JONES, PIERCE e WARD, 2007; LABELLE et al., 2012; WILLIAMS et al., 2006). O bulbo do olho é bem desenvolvido quando comparado ao tamanho do corpo. As pálpebras são estruturas responsáveis pela proteção mecânica do bulbo do olho, que através das incursões palpebrais realizam importante reflexo protetor, principalmente se considerarmos a extensa superfície ocular desnuda em momentos como a caça e o voo (JOCHEMS e PHILLIPS, 2015). Além disto, ao deslizarem sobre a superfície do bulbo do olho, espraíam a lágrima, função primordial para a sanidade ocular (WILLIAMS, 1994). Em geral, a pálpebra inferior das aves recobre a maior porção da superfície ocular ao ser projetada, e a pálpebra superior, por sua vez, possui menor motilidade (BAYÓN, ALMELA E TALAVERA, 2007; KORBEL, 2011).

Segundo Murphy et al. (1995) a curvatura da córnea das aves está diretamente relacionada a acomodação visual a qual lhe permite foco no momento da execução das tarefas. A membrana nictitante é bem desenvolvida, de maneira que recobre toda a superfície ocular, possui boa motilidade, com aparência fina e translúcida o que também contribui para o espraíamento da lágrima sobre a superfície ocular (BAYÓN, ALMELA E TALAVERA, 2007). Possui funcionalidade na proteção da córnea e na compensação pela ausência da capacidade refratora durante a visão subaquática (KORBEL, 2011; WILLIAMS, 1994).

As glândulas meibomianas, presentes em mamíferos, são ausentes nas aves (JOCHEMS e PHILLIPS, 2015). Em contrapartida, a glândula harderiana, localizada próxima a base da membrana nictitante, é a principal responsável pela produção lacrimal,

localiza-se na região inferior temporal, posterior a esclera e próximo a base da membrana nictitante porém não faz parte dela (BARSOTTI et al., 2013; KORBEL, 2011; WILLIAMS, 1994). Dois pontos lacrimais drenam as secreções através dos ductos que desembocam na cavidade nasal (JOCHEMS e PHILLIPS, 2015).

A classe Reptília apresenta semelhanças anatômicas com as aves com reduzidas diferenças entre espécies (JACOBSON, 2007; LAWTON, 2005). Em estudos filogenéticos, observam-se semelhanças entre a anatomia ocular de répteis e aves, como a presença de cartilagem e ossículos esclerais, fibras musculares ciliares estriadas, cristalino mais friável quando comparado ao dos mamíferos e retina avascularizada (JACOBSON, 2007; LAWTON, 2005; MONTIANI-FERREIRA, 2007). Outras caracterizações pertencentes a este grupo é a presença de pálpebras bastante desenvolvidas e móveis, sendo que a inferior tem maior mobilidade (LAWTON, 2005; MONTIANI-FERREIRA, 2007).

Crocodilianos e quelônios possuem similaridades anatômicas oftálmicas. A superfície ocular dos répteis é banhada por fluidos secretados por glândulas lacrimais (exceto cobras) e glândulas de sal. Estas últimas são bem desenvolvidas em quelônios, especialmente em espécies marinhas, que funciona como um local extrarrenal de excreção de sal (DUNSON, 1976). Estudos refrativos e anatômicos de crocodilianos sugerem que eles focam muito bem imagens no ambiente terrestre, porém estas tornam-se desfocadas debaixo d'água por conta da 3ª pálpebra, onde outros sistemas sensoriais devem estar operando para a localização das presas (FLEISCHMAN et al., 1988). Os répteis possuem as glândulas harderianas bem desenvolvidas juntamente com as células mucíparas conjuntivais. Os ductos lacrimais não estão presentes em alguns gêneros de répteis, como as tartarugas, logo, podem dar a impressão de chorar, uma vez que o fluído da superfície ocular transborda as pálpebras (ATKINSON, 1992).

Metodologias de rápida execução e pouco invasivas são atrativas para animais silvestres, onde fatores estressantes como o tempo de contenção podem desencadear alterações fisiológicas e até levar ao óbito. O teste lacrimal de Schirmer, a tira endodôntica de papel absorvente e o teste lacrimal vermelho de fenol são formas de avaliação da produção lacrimal descritas para diversas espécies de animais silvestres (Figura 13) (FALCÃO et al., 2017; MONÇÃO-SILVA et al., 2016a,b ORIÁ et al., 2013). Todos estes testes têm em comum a inserção no saco conjuntival para mensuração da lágrima basal e reflexa (TROST et al., 2007), que já fora descrito nesta revisão para mamíferos.

4 Espécies pesquisadas

4.1 *Ara ararauna* (Arara canindé)

Pertencentes a família Psittacidae, as araras canindé são encontradas em florestas, savanas e matas de galeria em todo território brasileiro. Porém segundo a IUCN (2019) seu risco de extinção é considerado como menos preocupante em virtude da sua ampla distribuição, mesmo que não se saiba a quantificação dos exemplares. Em virtude da ação antropogênica, seja através da caça ilegal, ou desmatamento com redução do seu habitat natural, esta espécie sofre com o declínio com o passar dos anos, uma vez que ocorre influência direta na nidificação e alimentação desses animais (MONÇÃO-SILVA et al., 2016; WILLIS e ONIKI, 2003).

Parâmetros oftálmicos descritos para a espécie estão relacionados aos psitacíformes, onde, o TLVF possui valores de $25,8 \pm 5,3$ mm/15 segundos e $19,7 \pm 4,0$ mm/15 segundos e TLFV $19,12 \pm 3,14$ mm/15 segundos (MONÇÃO et al. 2016). A média de TLS para a espécie foi de $7,11 \pm 0,76$ mm/minuto (FALCÃO et al., 2017).

Figura 6. Imagem da arara canindé (*Ara ararauna*). Notar realização do teste lacrimal de vermelho de fenol. Fonte: Serviço de oftalmologia veterinária da UFBA.



4.2 *Amazona aestiva* (papagaio verdadeiro)

Estes animais pertencem a família Psittacidae e habitam as regiões Nordeste, Sudeste, Centro-oeste e Sul do país, porém quando comparados as araras são bem menores, medem cerca de 40cm e pesam em torno de 500 gramas. Despertam interesse humano por conseguirem reproduzir palavras, pela facilidade de interação e aprendizado e pela ampla captura para tráfico desses animais, também não considerados ameaçados de extinção segundo a IUCN (2019) (MONÇÃO-SILVA et al., 2016).

Alimentam-se de castanhas, sementes e frutas, além de folhagens e brotos e, quando em cativeiro a ração passa a ser o seu alimento principal. A espécie está em declínio em virtude da captura de ovos e filhotes e degradação do seu habitat natural (GRESPLAN e RASO, 2014; MONÇÃO-SILVA et al., 2016).

Para avaliações oftálmicas, foi descrito para papagaios valor de TLFV $12,6 \pm 2,6$ mm / 15 s, TLPP foi $13,1 \pm 1,4$ mm / min, e a PIO de $9,7 \pm 1,7$ mmHg (MONÇÃO et al., 2016).

Figura 7. Imagem do papagaio verdadeiro (*Amazonas aestiva*). Notar realização do teste lacrimal de Schirmer (TLS). Fonte: Serviço de oftalmologia veterinária.



4.3 *Tyto alba* (coruja suindara)

São subdividas em duas famílias: Strigidae e Tytonidae, tem ampla distribuição mundial (exceto na Antártida) e na América do Sul, são encontradas cerca de 30 espécies, sendo uma delas da família Tytonidae, (*Tyto alba*) e as outras pertencentes a Strigidae, diferindo entre si pelas estruturas de siringe e formato das penas (AGILLAR, 2003).

A *Tyto alba* possui muitas subespécies e diversidade de habitats, onde dão preferência a áreas abertas, naturais e antrópicas. Apresentam hábitos crepuscular-noturno e a visão para a espécie é um órgão de grande importância, possuem excelente acuidade visual, que lhe permite a caça de presas até imóveis (SANTOS, 1979; SICK, 1993). Alimentam-se principalmente de roedores, porém podem incluir na dieta marsupiais, morcegos, répteis, outras aves e mamíferos, sua presa varia com a disponibilidade de alimento e são consideradas animais oportunistas (PEREIRA, 2007). Tem importância mundial no controle de roedores, sendo excelentes controladores de pragas urbanas e são facilmente encontradas em construções urbanas (forros de telhados),

porém não devem ser introduzidas de maneira aleatória com tal finalidade para que não ocorra um desequilíbrio ambiental.

Parâmetros oftálmicos descritos trazem que o TLS das corujas variam entre $3,6 \pm 2,2$ mm/min, e o TLVF $19,5 \pm 7,2$ mm/15 seg (BECKWITH-COHEN et al. 2015).

Figura 8. Imagem da coruja suindara (*Tyto alba*). Fonte: Serviço de oftalmologia veterinária UFBA.



4.4 *Rupornis magnirostris* (gavião carijó)

Pertencentes a família Accipitridae, são subdivididos em 12 subespécies. São comumente encontrados no Brasil exceto nas áreas com florestas densas e podem ser observados em grandes centros urbanos ou em margens de rodovias.

Segundo a IUCN (2019) por ser de ampla distribuição também não é considerada espécie ameaçada de extinção. São estritamente carnívoros, alimentam-se de artrópodes (mariposas, besouros, gafanhotos, cigarras), pequenos répteis (lagartos, lagartixas e

cobras), outras aves e roedores. Podem, eventualmente, se alimentar de morcegos em poleiros. Em virtude do seu hábito alimentar a espécie sofre com a caça nas grandes cidades o que futuramente pode vir a causar desequilíbrios ecológicos.

Parâmetros oftálmicos descritos para falconiformes referem que o TLS não foi descrito para a espécie todavia, o TLVF equivalem a $30,2 \pm 4,6$ mm/15 seg e $0,6 \pm 4,2$ mm/15 seg (SMITH et al., 2015).

Figura 9. Imagem do gavião carijó (*Rupornis magnirostris*). Fonte: Serviço de oftalmologia veterinária UFBA.



4.5 *Chelonoidis carbonarius* (jabuti piranga)

No Brasil a espécie pode ser encontrada em florestas tropicais e no Brasil central. Existem poucos estudos relacionados aos aspectos ecológicos sobre o *Chelonoidis carbonarius*. O jabuti de pés vermelhos é considerado um animal onívoro e sua alimentação inclui frutas, flores, folhas, animais invertebrados (a exemplo de formigas, caracóis, cupins e insetos diplópodes), vertebrados (normalmente são carniças) e fungos e outras sujidades. São considerados animais de alimentação oportunista e sua

dieta sofre ação direta da sazonalidade em virtude da disponibilidade local de alimentos, porém são considerados excelentes dispersores de sementes, o que auxilia na conservação de várias espécies. Foram descritos para a espécie parâmetros oftálmicos relacionados ao TLS ($12,0 \pm 3,5$ mm/min), o TEPA-1 ($15,9 \pm 0,7$ mm/15s) e o TEPA-2 ($15,4 \pm 0,4$ mm / min (olho direito) e $17,8 \pm 1,0$ mm / min (olho esquerdo) (ORÍÁ et al., 2014).

Figura 10. Imagem do jabuti piranga (*Chelonoidis carbonarius*). Notar realização do teste lacrimal de Schirmer (TLS) **Fonte:** Serviço de oftalmologia veterinária UFBA.



4.6 *Caretta caretta* (tartaruga marinha cabeçuda)

Existem no Brasil, cinco espécies de tartarugas marinhas distribuídas pela costa a tartaruga verde (*Chelonia mydas*), a tartaruga de couro (*Dermochelys coriácea*), a tartaruga de pente (*Eretmochelys imbricata*), a oliva (*Lepidochelys olivácea*), a cabeçuda (*Caretta caretta*), que diferem por suas características morfológicas e alimentares e,

segundo a IUCN, são consideradas em perigo ou ameaçadas de extinção (ABREU-GROBOIS e PLOTKIN, 2008; CASALE e TUCKER, 2015; MORTIMER e DONNELLY, 2008; SEMINOFF, 2004; WALLACE et al., 2013).

A espécie em questão apresenta distribuição circungal, no Brasil são encontradas prioritariamente no norte da Bahia, Sergipe, Espírito Santo e norte do Rio de Janeiro áreas consideradas de desova, quando em outros estágios da vida, podem ser encontradas em outras regiões. A estimativa de vida para esta espécie é em torno de 100 anos e são carnívoras durante todas as fases da sua vida (MÁRQUEZ, 1990; PRITCHARD e MORTIMER, 1999).

Para manutenção da vida das tartarugas marinhas a visão exerce uma função primordial e a sua perda pode contribuir para um incremento da morbidade e mortalidade nas espécies, em virtude da vulnerabilidade a predadores, redes de pesca e dificuldade na apreensão de alimentos (CAMILLO et al., 2009; CASTILHOS et al., 2003; ORÓS et al., 2005).

Informações dos parâmetros oftálmicos de normalidade ou oftalmopatias em tartarugas-marinhas ainda são escassos, e são necessários estudos para contribuição da conservação in-situ e ex-situ das espécies para reduzir os riscos inerentes. Sabe-se que possuem alta sensibilidade corneana, secreções lacrimais mucoides, presença de ossículos episclerais e glândula orbital secretora de sal. Avaliações oftálmicas escritas para a espécie estão relacionadas a citologias conjuntivais, cultura com antibiograma da conjuntiva, ultrassonografia ocular, e determinação da pressão intraocular (PIO) (ALMEIDA NETO et al., 2006; ALLGAYER et al., 2009; İŞLER et al., 2014; ORIÁ, et al., 2018).

Figura 11. Imagem da tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*). Fonte: Serviço de oftalmologia veterinária UFBA.



4.7 *Caiman latirostris* (jacaré de papo amarelo)

Os crocodylianos surgiram há cerca de 200 milhões de anos, formam a classe Reptilia e a ordem Crocodylia e pertencem a subclasse Archeosauria (a mesma dos dinossauros e das aves). No Brasil, são encontradas três subfamílias: Crocodylinae, Alligatorinae e Gavallinae onde, todas são chamadas de jacarés sem distinção. São elas: o jacaré açú (*Melanosuchus niger*), o jacaré paguá (*Paleosuchus palpebrosus*), o jacaré-curoa (*Paleosuchus trigonatus*), jacaré-tinga e o jacaré-do-pantanal (*Caiman crocodilos crocodilus* e *Caiman crocodilos yacare* respectivamente) e o jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) (MENEZES et al. 2017; ORIÁ et al., 2014).

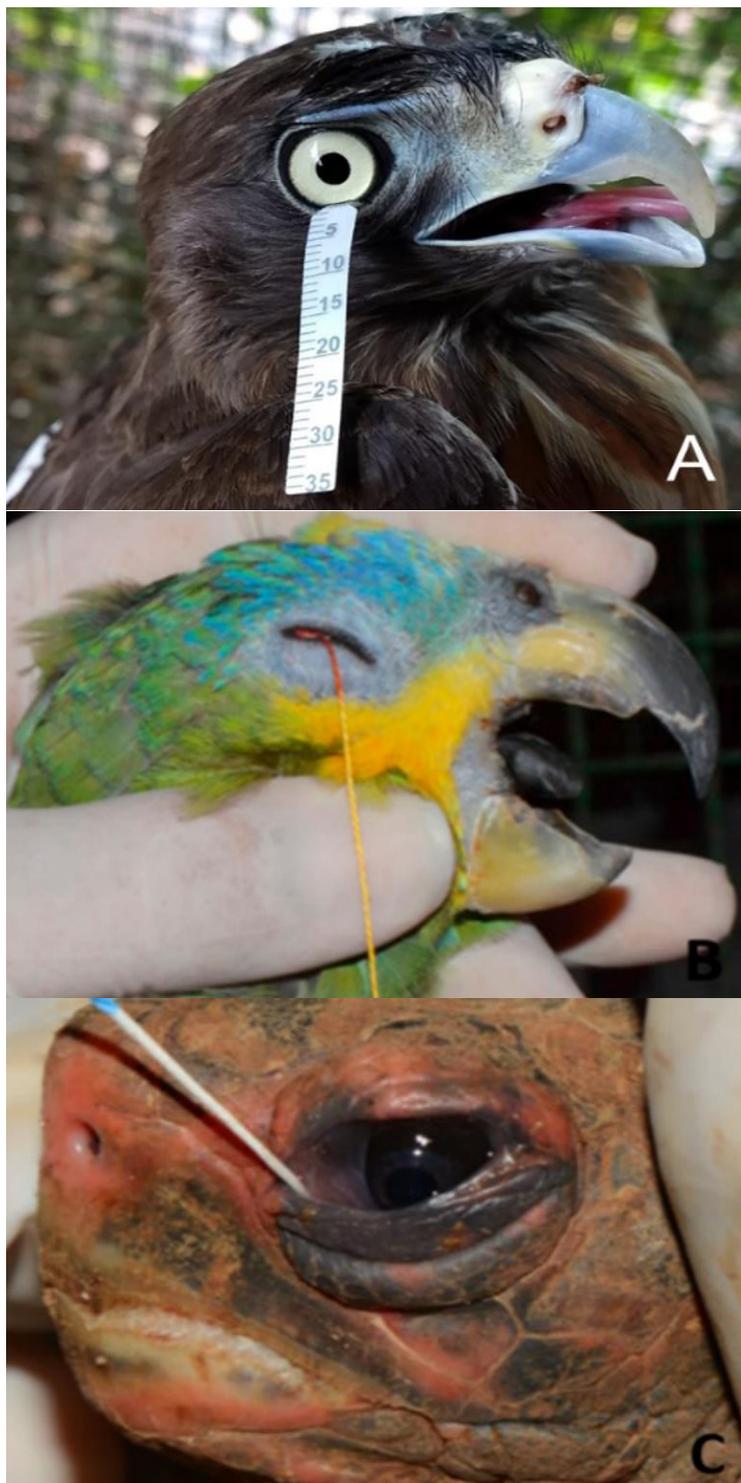
O jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) tem sua ampla distribuição pelo país, por ser de fácil adaptação e apesar de habitar ambientes aquáticos e de ampla margem vegetativa também consegue colonizar facilmente ambientes urbanos sendo, então, considerado pela IUCN com status pouco preocupante. Possuem hábito noturno, vivem em áreas alagadas (a exemplos de brejos, pântanos, mangues, rios e lagoas) e são carnívoros, alimentam-se de peixes, mamíferos, crustáceos, moluscos, aves e répteis de pequeno e médio porte (DICHOF, 2017, MENEZES et al. 2017). A produção lacrimal TLS 1, do *Caiman latirostris*, foi de $\pm 3\text{mm}$ (1.9-4.7 IC 95%) e o TEPA foi de $17,1 \pm 2,5\text{mm/min}$ (ORIÁ et al., 2014).

Por serem considerados animais perigosos, a sua manipulação deve ser realizada de maneira cautelosa todavia, sofrem com a ação antropogênica em virtude da caça para comércio ilegal de pele e carne.

Figura 11. Imagem fotográfica do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostrus*).
Fonte: Ana Druzian (Flickr imagens).



Figura 13. Imagens dos testes de avaliação da produção lacrimal. Notar em **A:** Teste Lacrimal de Schirmer I realizado gavião (*Rupirnos magnarostris*); **B:** Teste Lacrimal Vermelho de Fenol em papagaio-do-mangue (*Amazona aestiva*); **C:** Teste da Tira Endodôntica de Papel Absorvente em jabuti-piranga (*Cheloides carbonaria*). **Fonte:** Modificado de: ORIÁ et al., 2015; MONÇÃO-SILVA, 2016.



Sugere-se que a principal causa da redução na produção lacrimal em aves e répteis é neurogênica e secundária a traumas. Em contrapartida, o aumento parece estar relacionado à presença de corpos estranhos, doenças infecciosas na superfície ocular, uveítes, glaucoma e úlceras (BARSOTTI et al., 2013). Contudo, são escassos os estudos

para espécies não domésticas de métodos de avaliação qualitativa da lágrima e deficiências dos seus componentes.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Determinar os padrões de cristalização da lágrima de aves e répteis e descrever as diferenças encontradas entre elas correlacionando aos eletrólitos presentes.

5.2 Objetivos Específicos

Determinar o padrão de cristalização da lágrima em aves e répteis segundo critérios propostos por Rolando (1984) e Masmali et al. (2014);

Realizar avaliação dos padrões de cristalização por diferentes avaliadores;

Determinar os eletrólitos encontrados na lágrima de aves e répteis.

6 HIPÓTESE

O padrão de cristalização da lágrima em aves e répteis difere em virtude da composição dos eletrólitos encontrados no filme lacrimal das espécies.

____ Capítulo 1 ____

Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lagrima de aves, répteis e humanos

Perfil de eletrólitos e padrões de cristalização da lágrima de aves, répteis e humanos

RESUMO

Objetivo: Descrever os eletrólitos presentes na lágrima de aves e répteis e associar estes valores a cristalização do filme lacrimal.

Métodos: Dez animais de cada espécie: *Ara ararauna*, *Amazona aestiva*, *Tyto alba*, *Rupornis magnirostris*, *Chelonoidis carbonaria* e *Caiman latirostris*, 5 *Caretta caretta* e 10 humanos foram submetidos a colheita de lágrima por meio do teste lacrimal de Schirmer. Aliquota foi posta em pool para avaliação das concentrações de proteínas totais, cloreto, fósforo, ferro, sódio, potássio, cálcio e ureia. Para o teste de cristalização da lágrima, amostras de cerca de 2 μ L de cada espécie fora colocadas em lâmina de vidro até completa secagem à temperatura e umidade controladas e observadas em microscópio de luz polarizada. Os padrões de cristalização foram classificados de acordo com as escalas de Rolando e Masmali.

Resultados: Houve maior quantidade de proteínas totais em humanos, seguido de coruja e jacaré. Relativamente a ureia lacrimal, foi obtido maior concentração na tartaruga-marinha, seguida do jacaré e da coruja. Os valores obtidos dos eletrólitos mostraram balanço eletrolítico similar entre as espécies com valores elevados de sódio, cloreto e ferro. A classificação dos padrões de cristalização da lágrima na escala de Rolando variaram de I a II e de 0 a 2 para a escala de Masmali para aves; e de II a IV (Rolando) e 2 a 4 (Masmali) para répteis. Arranjos da cristalização de algumas espécies tiveram classificações maiores, todavia tal condição não pode ser atribuída a doenças, e possivelmente sejam derivadas da composição da lágrima. Não houveram semelhanças nos padrões de cristalização entre espécies filogeneticamente próximas ou expostas ao mesmo ambiente. No entanto, espécies marinhas e lacustres apresentaram maiores valores de classificação.

Conclusões: O equilíbrio iônico do fluido lacrimal de aves e répteis possui um balanço semelhante ao descrito para humanos com maior presença de sódio e cloreto, contudo os cristais da lágrima apresentaram diferenças nos arranjos entre as espécies comparativamente aos humanos. As classificações da cristalização revelaram que graus e tipos maiores não necessariamente estão relacionados a quadros de enfermidade do filme lacrimal em animais silvestres.

Palavras-chave: Animais silvestres, Composição da lágrima, Dosagem de eletrólitos na lágrima, Escala de classificação, *Tear Ferning Test*

Electrolytes profile and crystallization patterns of the birds, reptiles and humans tear

ABSTRACT

Objective: To describe the electrolytes presented in tears of some species of birds and reptiles, and associate these values to the tear film crystallization pattern.

Methods: Ten animals of each species: *Ara ararauna*, *Amazona aestiva*, *Tyto alba*, *Rupornis magnirostris*, *Chelonoidis carbonaria* and *Caiman latirostris*; five *Caretta caretta* and 10 human subjects were submitted to tear sampling using the Schirmer tear test. Aliquot were put in a pool to assess concentrations of total proteins, chloride, phosphorus, iron, sodium, potassium, calcium and urea. To the tear ferning test, samples of about 2 μ L of each species were dried on a clean microscope glass slide at room temperature and humidity, and observed under a polarized light microscope. Crystallization patterns were classified according Rolando and Masmali scales.

Results: There was higher amount of total proteins in humans, followed by owls and caimans. Regarding tear urea, higher values were obtained for sea turtles, followed by caimans and owls. The electrolyte values showed similar electrolytic balance between species, with higher results of sodium, chloride and iron. The grading of tear crystallization patterns using Rolando scale ranged from I to II and ranged from 0 to 2 using Masmali scale in birds; and from II to IV (Rolando) and 2 to 4 (Masmali) in reptiles. Crystallization arrangements of some species had higher scores; however this condition could not be attributed to disease states, possibly being derived from the tear composition. There were no similarities in the tear crystallization patterns between phylogenetically-related species or exposed to the same environment. However, marine and lacustrine species presented increased grading scales.

Conclusions: The lacrimal fluid ionic balance in birds and reptiles possess a similar balance to described for humans, with increased presence of sodium and chloride. However, the tear crystals had different arrangements between species, when compared to humans. Crystallization classification revealed that higher grades and types were not necessarily related to tear film disease states in wild animals.

Keywords: Grading scales, Tear composition, Tear electrolyte dosage, Tear ferning test, Wild animals,

1. Introdução

O filme lacrimal é um fluido complexo que recobre a superfície ocular e compõe a interface entre o olho e o ambiente (COLLIN e COLLIN, 2006). Suas principais funções são correlacionadas a sua interação com o epitélio corneano, tais quais: lubrificação, nutrição, remoção de metabólitos, proteção e manutenção da estabilidade (MASMALI et al., 2014; TIFFANY, 2008). A pluralidade de funções deste fluido é dada pela diversidade em seus componentes, e é caracterizada nos vertebrados pela presença de lipídios, água, proteínas e eletrólitos (GILLAN, 2010; TIFFANY, 2008), contudo devido a sua heterogenicidade existem, ainda, lacunas sobre a dinâmica dos seus componentes com o objetivo de manter a homeostase.

A lágrima é sintetizada a partir de glândulas lacrimais secretórias, células caliciformes e células epiteliais da córnea e conjuntiva (GIPSON, 2007). Os íons lacrimais secretados são descritos em mamíferos, como resultantes do transporte unidirecional de sal e água através da camada de células acinares (ALMÁSSY et al., 2019). Devido a lágrima não ser um produto direto do soro sanguíneo, como a urina, os seus componentes são estudados na busca de biomarcadores que possam elucidar condições derivadas da quebra da barreira sangue-glândula lacrimal, observada em condições de doenças. Outros componentes presentes na lágrima, como proteínas e ureia possuem sua síntese intrínseca às demandas advindas do epitélio adjacente e da resposta ao meio ambiente (KULICHICLIN et al., 2012). Desta forma, estudos que avaliem a composição deste fluido na interface com diferentes ambientes ou metabolismo espécie-específico são importantes para a compreensão deste equilíbrio, contudo pouco sabe-se sobre a composição da lágrima de animais selvagens.

Em continuidade ao estudo da composição dos eletrólitos da lágrima, a supersaturação de componentes da lágrima formam cristais cujo padrão, quando seco, pode ser usado para avaliação qualitativa, como descrito pela primeira vez por Tabbara e Okumoto (1982) como teste de cristalização da lágrima (TCL). Outros estudos relataram que o TCL pode ser utilizado para delinear a composição lacrimal em condições de higidez e em pacientes portadores de oftalmopatias (MASMALI et al., 2015; ROLANDO, 1984) tanto em humanos quanto em animais (MASMALI et al., 2014; ORIÁ et al., 2018; SILVA et al., 2016; RAPOSO et al., 2018). Os resultados mostraram que a densidade osmótica da lágrima é o principal gatilho para a modificação dos padrões de cristalizações (MASMALI et al., 2018).

O TLC foi descrito em espécies de mamíferos, como humanos, cães, cavalos, macacos e camelos (MASMALI et al., 2014; ORIÁ et al., 2018; SILVA et al., 2016;

RAPOSO et al., 2018), e as lágrimas foram classificadas em diferentes escalas, como a de Rolando (1984) e a escala de Masmali et al., (2014). Diferenças nos arranjos dos cristais, incluindo angulações e formações secundárias, tornam o TCL subjetivo (NORM, 2014). Desta forma, o uso de diferentes escalas para classificar os padrões de cristalização pode reduzir esta subjetividade.

Estudos dos componentes da superfície ocular de aves e répteis mostraram diferenças no aparelho lacrimal, na produção lacrimal e na frequência de incursões palpebrais entre as espécies (MURUBE, 2009; ORIÁ et al., 2015); no entanto, poucos são as descrições qualitativas da lágrima, principalmente, em se tratando dos seus microcomponentes (MURUBE, 2004). Informações adicionais relacionadas aos parâmetros qualitativos podem ajudar a entender as oftalmopatias que afetam estes animais e comprometem sua sobrevivência. Logo, objetiva-se com este estudo descrever os eletrólitos presentes na lágrima de aves e répteis comparativamente a humanos e associar estes valores a cristalização do filme lacrimal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente (SISBIO – número de autorização 27489) e Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN – número de cadastro A1F8C27) ambos pertencentes ao Ministério do Meio Ambiente da República Federativa do Brasil. Igualmente, obteve anuência do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (CEUA número 72/2016). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Declaração da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia Guia do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório.

A participação dos humanos foi voluntária e obedeceu as normativas da Declaração de Helsinki. A pesquisa em humanos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (número de autorização - 2.388.777). Dor e fatores estressantes foram minimizados durante todo o estudo.

2.2 Espécies

Foram examinadas 40 aves, 10 animais de cada espécie quais sejam: *Ara ararauna* (arara canindé), *Tyto alba* (coruja suindara), *Amazona aestiva* (papagaio verdadeiro),

Rupornis magnirostris (gavião carijó) e 25 répteis sendo 10 *Chelonoidis carbonaria* (jabuti piranga), 10 *Caiman latirostris* (jacaré-de-papo-amarelo), 5 *Caretta caretta* (tartaruga cabeçuda), todos adultos hígidos clinicamente (avaliação clínica e hematológica pela equipe técnica responsável), oriundos do centro de triagem de animais silvestres (CETAS, Salvador, Brasil), criação comercial (Mister Cayman®, Maceió, Brasil) e centro de conservação (Projeto TAMAR, Mata de São João, Brasil). O estudo foi realizado como parte de exame físico de rotina pela equipe técnica responsável pelos respectivos locais. Animais que apresentaram alterações sistêmicas e oftálmica não foram incluídos no estudo.

Para validar os dados obtidos nos animais silvestres, dez humanos voluntários (sete mulheres e três homens), com idades entre 25 a 45 anos, e sem histórico de alterações no filme lacrimal, foram incluídos. Em adição a isto, a superfície ocular dos indivíduos foi avaliada por biomicroscopia. O consentimento do uso de informações foi obtido de todos os participantes da pesquisa, após os procedimentos terem sido explicados.

2.3 Colheita de amostra e dosagem de eletrólitos da lágrima

Para aquisição de amostra, todos os animais foram submetidos a contenção física, sendo respeitado um período de 20 minutos entre a contenção e colheita para tartarugas-marinhas e jacarés, com o intuito de prevenir e evitar a contaminação por resíduo de água. As amostras foram colhidas entre março e outubro de 2017 pela manhã (08:00 h às 11:30 h), seguindo a sequência (1) olho direito e (2) olho esquerdo. Para a colheita da lágrima uma tira milimetrada do teste lacrimal de Schirmer (Tear-Flo™ Tiras de Diagnóstico, Tucson, Arizona) permaneceu inserida no saco conjuntival inferior, até a porção umedecida pela lágrima atingir 30 mm. As tiras foram então colocadas em microtubos de 0,5 mL (*Eppendorf Protein LoBind Tubes*, São Paulo, Brasil) com uma extremidade perfurada e então inserido em tubo de 2mL (*Eppendorf Tubes*) (Adaptado de Posa et al. 2013). Ato contínuo, os tubos foram centrifugados a 25830 g, 10 min, 4 °C, sendo obtida alíquota. As lágrimas de tartarugas-marinhas foram colhidas por meio de seringas descartáveis devido a sua alta viscosidade.

Para a avaliação dos eletrólitos, amostras de lágrima foram armazenadas em *pools* por espécie para garantir o volume necessário para o processamento e, em seguida, foram mantidas a -20°C até a dosagem por meio de kits comerciais para a quantificação de proteínas totais, cloreto, fósforo, ferro, sódio, potássio (Labtest®, Belo Horizonte, Brasil) e cálcio (Doles®, Goiânia, Brasil), sendo obedecidas as recomendações do manual para cada teste.

2.4 Teste de cristalização da lágrima

Após a centrifugação da tira de Schirmer, alíquota de 5,0µL de cada indivíduo foi recuperada com o auxílio de micropipeta e depositada em lâmina de vidro até a completa secagem sob temperatura e umidade controlada.

A temperatura e a umidade foram monitorizadas (Termo-Higrômetro Equitherm® Modelo Th-439, Minas Gerais, Brasil) durante a colheita e o processamento das amostras, mantido em torno de 21-23°C, com umidade em torno de 45-52% para todas as espécies.

Após a secagem completa, as lâminas foram avaliadas sob microscópio de luz polarizada em objetiva de 10x de ampliação acoplado a câmera para captura das imagens (Microscópio Zeiss, Scope A.1 / AX10 Axion Cam ICc5, Oberkochen, Alemanha). As imagens das cristalizações foram classificadas por três avaliadores que não tiveram contato no momento das avaliações, dois do Grupo de Pesquisa em Oftalmologia Veterinária da Universidade Federal da Bahia, e um da King Saud University, todos com conhecimento e experiência para utilizar as escalas. A classificação final foi atribuída ao resultado similar de pelo menos dois dos três avaliadores. Os padrões de cristalização da lágrima foram classificados de acordo com a escala de Rolando (tipos I, II, III e IV) e Masmali (graus 0, 1, 2, 3 e 4). Os avaliadores foram convidados a fazer comentários sobre as lâminas de cada espécie quanto às características encontradas, como espessura e o tamanho dos ramos principais e secundários, além do espaçamento entre os cristais (*ferns*).

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software SPSS versão 22.0 (IBM, Armonk, NY), e o nível de significância foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados para os valores de TCL. O teste de Wilcoxon foi empregado para comparação entre o olho direito e esquerdo.

3. Resultados

Os resultados das dosagens de proteína total, ureia e eletrólitos foram expressos em médias, que foram obtidas através de duplicatas, e os valores das concentrações de cada componente da lágrima foram comparados (Figuras 1, 2 e 3; Material suplementar tabela 1). Foi observado valores mais elevados de proteína total na lágrima dos humanos

comparativamente as demais espécies, seguido do jacaré e coruja. A ureia lacrimal foi mais elevada na tartaruga-marinha, seguida do jacaré e coruja. Os valores dos eletrólitos apresentaram diferenças entre as espécies, e semelhanças não foram vistas quando levado em consideração proximidade filogenética e nichos ecológicos próximos, contudo todas as lágrimas avaliadas apresentaram elevados valores de cloreto, ferro e sódio comparativamente ao humano.

Figura 1. Representação das dosagens de proteínas totais nas lágrimas de aves, répteis e homem. Notar grande quantidade de proteína presente na lágrima de humanos, seguida da *Tyto alba* e do *Caiman latirostris*.

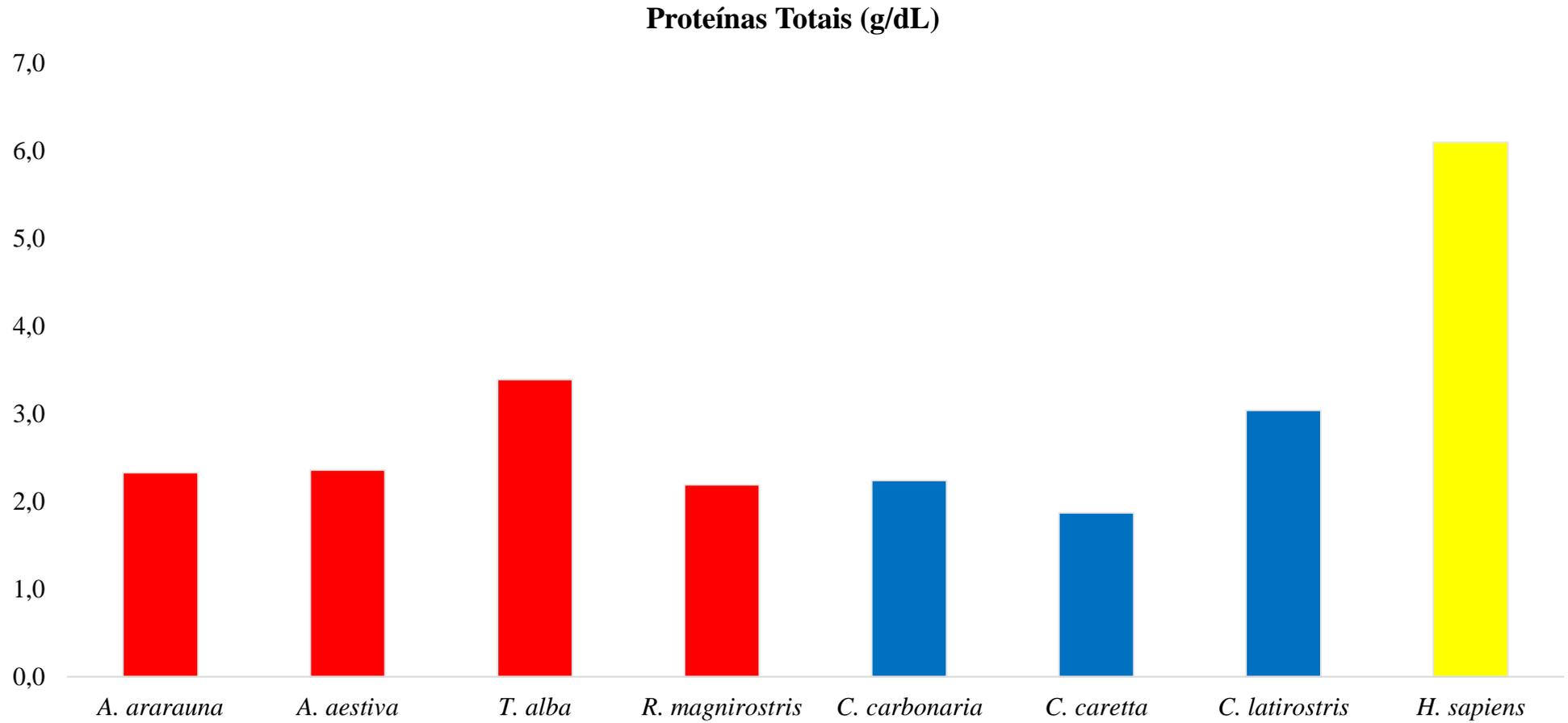


Figura 2. Representação das dosagens de uréia nas lágrimas de aves, répteis e homem. Notar grande quantidade de uréia presente na lágrima da *Caretta caretta* e menor quantidade em humanos.

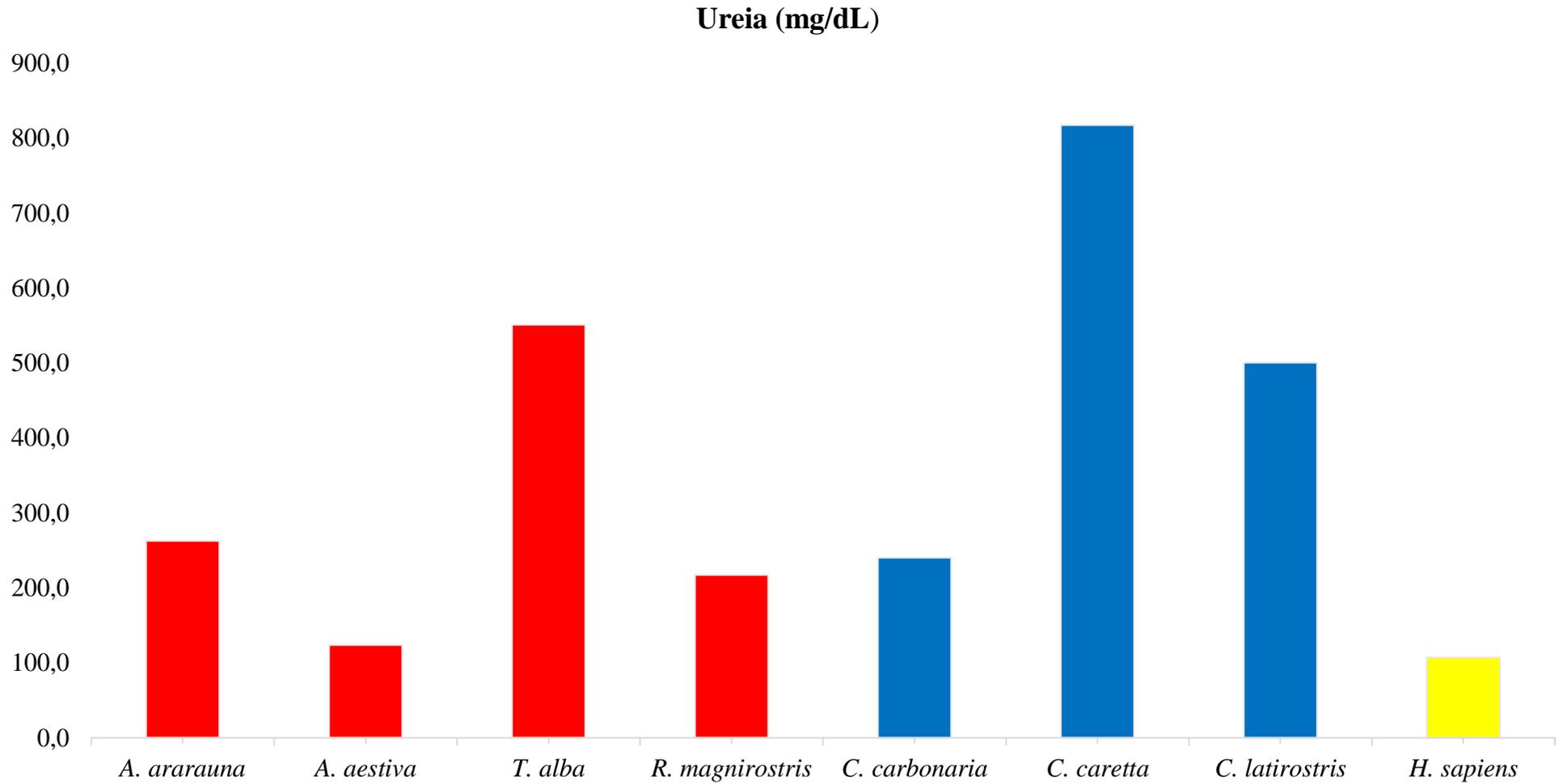
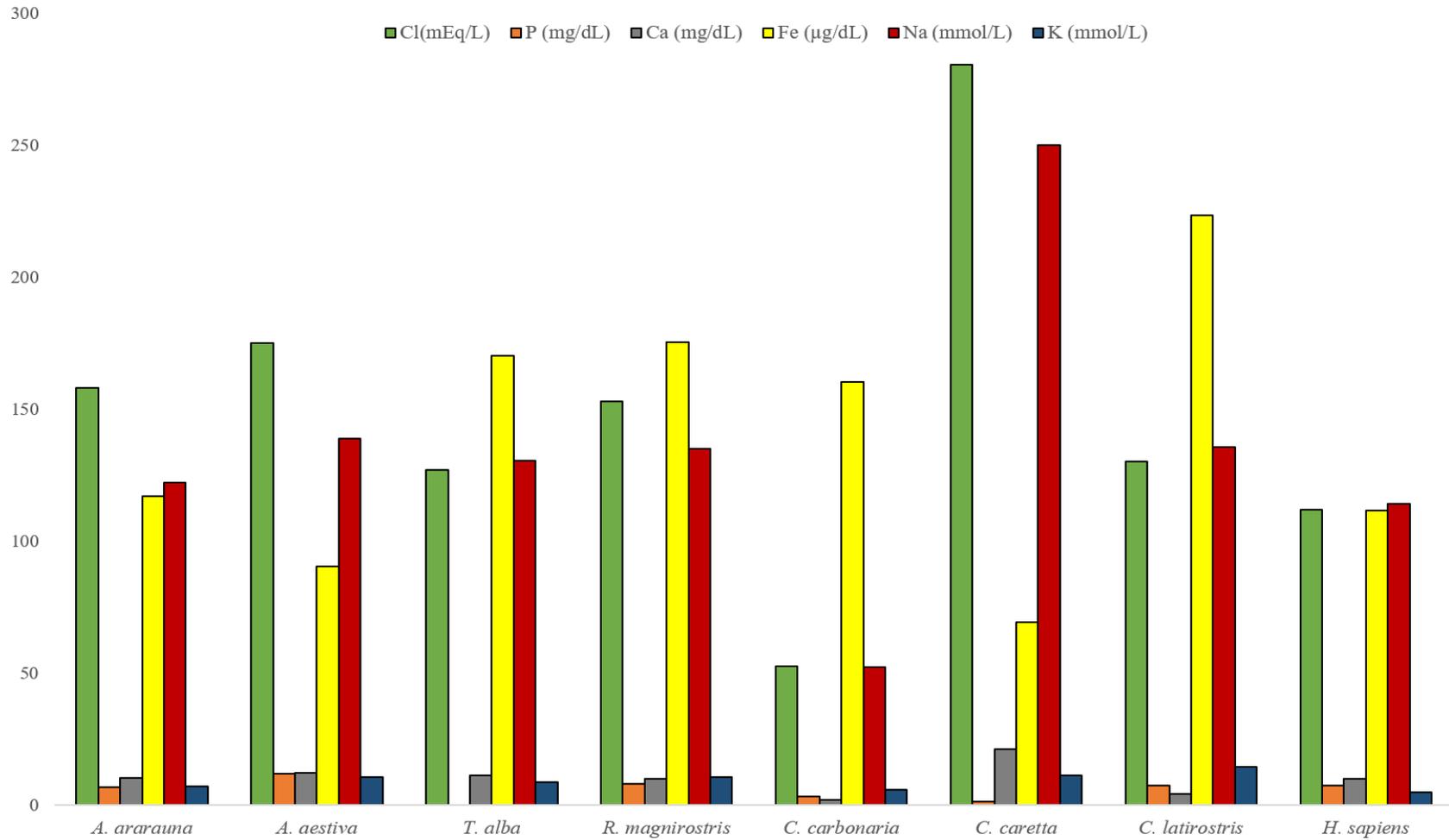


Figura 3. Representação das dosagens de eletrólitos nas lágrimas de aves, répteis e homem. Notar grande quantidade de cloreto, ferro e sódio presentes na lágrima de todas as espécies.



A média do tempo de cristalização da lágrima está expressa na tabela 1. De acordo com o teste de Shapiro-Wilk, os valores de classificação não apresentaram distribuição normal ($P < 0,05$) e não houve diferenças entre os olhos direito e esquerdo de acordo com o teste de Wilcoxon ($P \geq 0,083$). Os valores de mediana e intervalo-interquartil e as frequências para cada escala de classificação são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1 – Média do tempo de cristalização da lágrima das aves e répteis expressa em minutos.

<i>Ara ararauna</i>	<i>Amazona aestiva</i>	<i>Tyto alba</i>	<i>Rupornis magnirostris</i>	<i>Chelonoides carbonária</i>	<i>Caretta caretta</i>	<i>Caiman latirostris</i>
4.42 ± 2.00	10.15 ± 3.40	4.17 ± 3.46	11.41 ± 3.12	7.15 ± 3.30	15.03 ± 7.01	14.59 ± 5.47
(2.32 – 6.52)	(6.18-13.31)	(0.52 – 8.00)	(8.13-14.00)	(4.11 – 10.20)	(8.04 – 21.58)	(7.00 – 20.33)

Tabela 2 - Mediana \pm intervalo semi-interquartil para teste de cristalização da lágrima (TCL) de aves e répteis.

	TCL, Escala Rolando	TCL, Escala Masmali
<i>Ara ararauna</i>	1.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.37
<i>Amazona aestiva</i>	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
<i>Tyto alba</i>	1.0 \pm 0.37	0.5 \pm 0.5
<i>Rupornis magnirostris</i>	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.5
<i>Chelonoides carbonaria</i>	1.5 \pm 1.0	1.5 \pm 0.87
<i>Caretta caretta</i>	2.5 \pm 0.87	2.0 \pm 1.25
<i>Caiman latirostris</i>	3.0 \pm 0.87	2.0 \pm 0.87

Tabela 3 - Frequência das classificações do teste de cristalização da lágrima de aves e répteis pelas escalas de Rolando e Masmali.

	Escala de Rolando				Escala de Masmali				
	I	II	III	IV	0	1	2	3	4
<i>Ara ararauna</i>	100%	*	*	*	68%	32%	*	*	*
<i>Amazona aestiva</i>	5%	90%	5%	*	*	14%	86%	*	*
<i>Tyto alba</i>	73%	20%	7%	*	33%	53%	7%	7%	*
<i>Rupornis magnirostris</i>	15%	85%	*	*	*	55%	40%	5%	*
<i>Chelonoides carbonária</i>	40%	15%	30%	15%	10%	30%	30%	15%	15%
<i>Caretta caretta</i>	22%	22%	56%	*	22%	*	33%	45%	*
<i>Caiman latirostris</i>	5%	25%	50%	20%	5%	*	50%	25%	20%

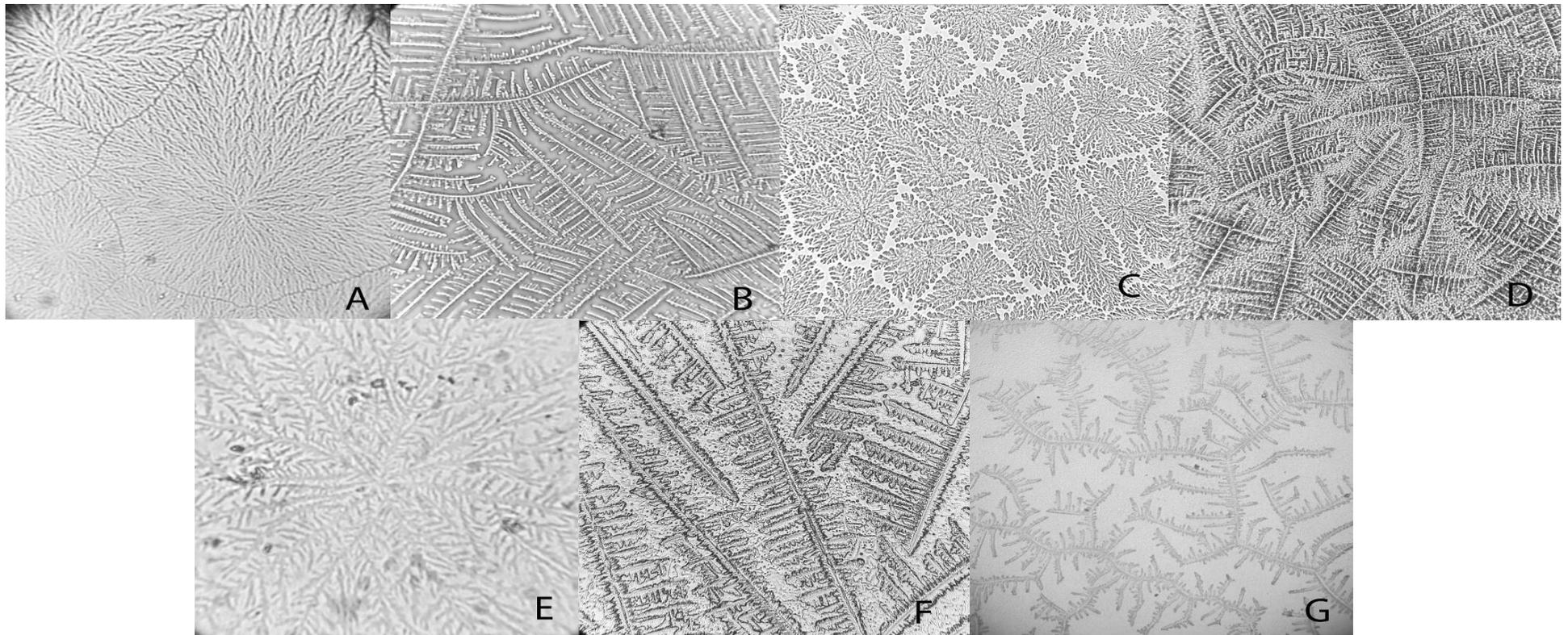
* Ausência de frequência

Os comentários a seguir foram fornecidos pelos avaliadores e estão ilustrados na figura 4:

"Diferenças foram observadas nos padrões de cristalização da lágrima que receberam as menores classificações: ramos finos, longos e delicados e espaço mínimo entre as cristalizações. *Ara ararauna* apresentou cristais curtos e grosseiros, com espaçamento entre cristais e padrão de cristalização formando vários núcleos, que foram facilmente distinguíveis. A lágrima de *T. alba* possuía cristais curtos e grosseiros, em *R. magnirostris* e *Chelonoidis carbonaria*, o padrão de cristalização foi composto por cristais mais grosseiros e menos delicados, com maior espaçamento e irregularidades. Em se tratando dos padrões de cristalizações das lágrimas que obtiveram classificações mais elevadas, o

Caiman latirostris apresentou maior espaçamento dos cristais comparativamente a *Caretta caretta*. O jacaré também obteve menor número de cristais por campo avaliado; as cristalizações de *Caretta caretta* foram mais grossas, e houve menos ramos em comparação com *Chelonoidis carbonaria*. O padrão de cristalização da *Amazona aestiva* recebeu classificação intermediária e exibiu cristais longos e grosseiros, quando confrontados com o *R. magnirostris*. "

Figura 4. Exemplos dos padrões de cristalização da lágrima em animais silvestres de acordo com as escalas de classificação de Rolando e Masmali. (A) *Ara ararauna* - tipo I (Rolando) e gradação 0 (Masmali) representação: o padrão de cristalização é uniforme e não há espaços entre os ramos. (B) Representação de *Amazona aestiva* - tipo II (Rolando) e classificação 2 (Masmali): os ramos principais são grossos e os ramos secundários estão distantes um do outro. Existem espaços entre os cristais. (C) *Tyto alba* - tipo I (Rolando) e gradação 0 (Masmali) representação: os ramos principais são mais grossos e curtos. Há cristalização densa composta de cristais ramificados, sem espaçamento entre eles. (D) *Rupornis magnirostris* - tipo II (Rolando) e gradação 2 (Masmali) representação: os principais braços são mais distantes e menos delicados. Existem espaços entre as cristalizações. (E) *Chelonoidis carbonaria* - tipo II (Rolando) e gradação 1 (Masmali) representação: os ramos principais são grosseiros e longos. Existem espaços entre os ramos secundários e sobreposição. (F) *Caretta caretta* - tipo II (Rolando) e gradação 2 (Masmali) representação: os ramos principais são longos e grossos e os ramos secundários são curtos. Existem espaços entre os cristais. (G) *Caiman latirostris* - tipo III (Rolando) e classificação 3 (Masmali) representação: as cristalizações são mais espessas e os cristais são mais distantes entre si em comparação com outras espécies.



4. Discussão

O filme lacrimal é um fluido heterogêneo formado por subunidades bioquímicas que interagem com a superfície ocular com função de lubrificação, proteção e manutenção da estabilidade (TIFFANY, 2008). A complexidade da lágrima tem estimulado o emprego de metodologias qualitativas, como a observação do fenômeno de cristalização, que visa entender a interação entre os seus componentes durante a mudança do seu estado físico. Perspectivas de comparação da lágrima podem fornecer informações sobre a adaptação da composição deste fluido entre as espécies, na tentativa de manutenção da homeostase. Apesar desta importante ferramenta, são escassas as descrições sobre a composição da lágrima de animais silvestres, sendo os resultados deste trabalho a primeira descrição dos componentes eletrolíticos e do teste de cristalização da lágrima em aves e répteis comparativamente ao homem.

Os fluidos extracelulares, como a lágrima, mantem-se em homeostase a partir do equilíbrio iônico e sua osmolaridade (MASMALI et al., 2015). Na lágrima de humanos, é descrito equilíbrio diretamente proporcional entre o sódio e o cloreto, e um influxo para o espaço intracelular do potássio, produto da fisiologia de células acinares (ALMÁSSY et al., 2019). Ao serem avaliadas as concentrações iônicas das espécies de aves e répteis observa-se que existe balanço iônico semelhante, com concentrações elevadas de sódio e cloreto e menores de potássio. Com relação as concentrações destes íons, estudos reportaram que existem diferenças entre a lágrima basal e reflexa contudo, informações relativas aos estímulos que podem induzir à produção lacrimal em animais silvestres são escassos (STUCHELL, FARRIS e MANDEL, 1981). Desta forma, apesar da ocorrência de possível equilíbrio iônico para manutenção da homeostase da superfície ocular, pesquisas adicionais são necessárias para melhor entendimento deste processo.

O cálcio produzido na glândula lacrimal é direcionado para mecanismos intracelulares, e este deve possuir baixas concentrações na lágrima (fluido extracelular). Entre os animais avaliados, os níveis de cálcio lacrimal foram reduzidos comparativamente ao sódio, que apresentou concentrações que se assemelharam às do potássio que, por sua vez exibe importante função intracelular em humanos (ALMÁSSY et al., 2019). Pesquisas relacionadas ao fósforo lacrimal são poucas e limitam-se a reportar as baixas concentrações de ânions fosfatados (BALÍK, 1960). Para todas as espécies estudadas foram encontradas baixas concentrações de fosfato, e dentre os eletrólitos avaliados, o ferro obteve valores elevados semelhante ao sódio e potássio. Tal resposta pode mostrar a importância deste eletrólito que está correlacionado a proteínas da lágrima

de mamíferos, como as lactoferrinas (TIFANNY 2008; GILLAN, 2010). Contudo, estudos que auxiliem no entendimento da função do ferro no equilíbrio iônico ainda devem ser conduzidos.

Segundo Masmali et al. (2014), a cristalização é fruto dos eletrólitos que compõem a lágrima, da migração de macromoléculas e proteínas para a periferia do cristal em humanos. Ao empregar esta avaliação em pacientes com doenças da superfície ocular, aventa-se que a hiperosmolaridade seja o fenômeno que produz classificações maiores em indivíduos doentes (ROLANDO, 1984; MASMALI et al., 2015). Apesar dos valores brutos das concentrações dos eletrólitos diferirem entre humanos e animais, houve semelhança no balanço dos íons, desta forma, possivelmente os outros componentes possuem importância semelhante no fenômeno de cristalização. Todavia, diferenças entre os arranjos juntamente com os valores dos eletrólitos revelam que o padrão dos cristais pode ser resultante da interação entre estas moléculas.

Outros componentes da lágrima, como proteínas e produtos nitrogenados, a exemplo da ureia, podem interagir com os eletrólitos (KULICHICKLIN, et al., 2012). A lágrima possui composição heterogênea de proteínas e presume-se que haja irrestrita passagem de ureia pela glândula lacrimal (KANG, FRIEDMAN e FULOP, 1988). Sabendo que tais elementos podem interferir na formação dos cristais, pode-se atribuir que as diferenças observadas entre as classificações, arranjos e impressão dos avaliadores podem ser justificadas pela complexidade da composição do filme lacrimal, uma vez que as variáveis exógenas, como temperatura e umidade foram mantidas monitorizadas, de acordo com metodologia proposta como adequada para o teste de cristalização da lágrima (HORWATH et al., 2001; MASMALI et al., 2014).

O tempo de cristalização é obtido entre a colocação da lágrima sobre a lâmina até a evaporação do solvente, resultando na composição do cristal. Diversas são as variáveis, inclusive temperatura e umidade, que podem interferir neste tempo (HORWATH et al., 2001). Entretanto, ao serem observadas as diferenças entre o tempo de cristalização, supõe-se que este parâmetro não tem proporcionalidade com a classificação obtida e, possivelmente, que ele seja resultante dos microcomponentes presentes na lágrima. O processo de cristalização requer uma taxa de formação lenta dos cristais, baixa viscosidade da solução e baixos níveis de impureza para permitir a difusão leve de solutos. A ausência de tais condições pode levar ao crescimento de cristais dentrícos (MASMALI et al., 2014).

Os arranjos das cristalizações da tartaruga-marinha e do jacaré foram mais espessos comparativamente as espécies aéreas e terrestres. Tal condição pode revelar que os animais que estão em contato com o meio aquático possuem composição específica da lágrima que visa sua manutenção e estabilidade, como a presença de muco, por exemplo. Na lágrima humana, os cristais mais espessos resultam principalmente, de alterações induzidas pela maior presença de muco ou macromoléculas (COLLIN e COLLIN, 2006; HORWATH et al., 2001; MASMALI et al., 2018; ORIÁ et al., 2018).

No presente estudo foram obtidos padrões de classificação do tipo III (escala de Rolando) para *C. latirostris* hígidos, o mesmo também foi observado para *A. ativa* e *R. magnirostris*. Raposo et al. (2018) encontraram em lágrimas de macacos-prego saudáveis cristalização do tipo III e atribuíram isto a particularidades da própria espécie, outrossim sugeriram o incremento de 0,1 ponto entre os graus e tipos de classificação, como também fora proposto em humanos para aumentar a sensibilidade e minimizar a subjetividade deste teste (MASMALI et al., 2015).

Embora a maioria dos resultados tenham sido similares e considerados normais para humanos, com classificações de I, 0 e 1 (escalas de Rolando e Masmali, respectivamente), a exemplo dos cristais obtidos para *Ara ararauna* e *T. alba* que foram classificados com graus e tipos semelhantes, o arranjo possuía conformação distinta. Outra condição que pode ser levada em consideração na composição da lágrima é a ingestão alimentar (MASMALI et al., 2017), desta forma ao comparar os cristais obtidos da lágrima de *T. alba* e *R. magnirostris* (aves predadoras carnívoras), foram observadas diferenças na classificação e nos padrões. A partir do que foi observado para as espécies silvestres, comparativamente ao humano, a formação dos ramos primários e secundários, e as áreas de transição, que são os critérios de avaliação propostos por Rolando (1984) e Masmali et al. (2014), aparentemente não se aplicam aos padrões de cristalização da lágrima para aves e répteis saudáveis.

5. Conclusão

O equilíbrio iônico do fluido lacrimal de aves e répteis possui equilíbrio semelhante ao descrito para humanos com maior presença de sódio e cloreto, porém os cristais da lágrima apresentaram diferenças nos arranjos entre as espécies comparativamente a humanos. As classificações obtidas revelaram que graus e tipos maiores não necessariamente estão relacionados a quadros de enfermidade do filme lacrimal de animais silvestres.

6. Financiamento

Nenhum financiamento foi recebido A.J. Lacerda tinha bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - ou de Educação - Pessoal).

7. Agradecimentos

Os autores agradecem a Maria Madalena Oliveira e Vinícius Cardoso-Brito, da Universidade Federal da Bahia, pela assistência técnica, a Fernanda de Azevedo Libório, Josiano Cordeiro Torezani, Thaís Torres Pires e Isaac Albuquerque, do Centro de Triagem de Animais Silvestres, Projeto TAMAR e Mister Cayman por fornecer avaliações de saúde dos animais.

8. Referências

- ALMÁSSY, J.; DISZHÁZIA, G.; SKALICZKI, M.; MÁRTON, I.; MAGYARA, Z.E.; PÉTER P. NÁNÁSI, YULE, D. Expression of BK channels and Na⁺-K⁺ pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *The Ocular Surface*. *In press*:
<https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.007>
- BALÍK, J. Secretion of Inorganic Phosphorus in Tears. *American Journal of Ophthalmology*. v.49, n.5, p.941-945, 1960.
- COLLIN, S.P.; COLLIN, H.B. The corneal epithelial surface in the eyes of vertebrates: environmental and evolutionary influences on structure and function. **J Morphol**, V. 267, n. 3 p.273–91, 2006.
- GILLAN, W.D.H. Tear biochemistry: a review. **S Afr Optom**. v.69, n.2, p.100-106, 2010.
- GIPSON, I.K. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 10, p. 4390–4398, 2007.
- HORWATH, J.; ETTINGER, K.; BACHERNEGG, M.; BODNER, E.; SCHMUT, O. Ocular Ferning Test – Effect of temperature and humidity on tear ferning patterns. **Ophthalmologica**, v. 215, p.102–107, 2001.
- KANG, J.; FRIEDMAN, A.H.; FULOP, G. Tear urea nitrogen and creatinine levels in renal patients. *ACTA Ophthalmologica*. v. 66, n. 4. p.407-12, 1988.
- KULICHIKHIN, V.G.; ELENSKII, A.A.; KHARLOV, A.E.; SHABANOV, M.P.; YAMPOL'SKAYA, G.P. **Colloid Journal**, v. 74, n. 2, p. 222–230, 2012.

- MASMALI, A.M.; MAENI, Y.A.; EL-HITI, G.A.; MURPHY, P.J.; ALMUBRAD, T. Investigation of Ocular Tear Ferning in Controlled and Uncontrolled Diabetic Subjects. **Eye & Contact Lens**. 2017
- MASMALI, A.M.; FAGEHI R.A.; EL-NAGGAR, A.H; ALMUBRAD, T.M.; AKHTAR, S. Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears, and Refresh Plus. **Molecular vision**, v. 24, p. 305–314, 2018.
- MASMALI, A.M.; AL-BAHLAL, J.M.; EL-HITI, G.A.; AKHTAR, S. Repeatability and diurnal variation of tear ferning test. *Eye Contact Lens*, v. 41, p. 262–267, 2015.
- MASMALI, A.M.; MURPHY, P.J.; PURSLOW, C. Development of a new grading scale for tear ferning. **Contact Lens & Anterior Eye**. v. 3, p. 178–184, 2014.
- MURUBE, J. Tear apparatus of animals: do they weep? **Ocul Surf**, v.7, p.121–7, 2009.
- MURUBE, J. Tear crystallization test: two centuries of history. **Ocul Surf**, v.4, n.2, p.7–9, 2004.
- NORN, M. Quantitative tear ferning: methodologic and experimental investigations. **Acta Ophthalmol**, v. 66, p. 201–5, 1988.
- ORIÁ, A.P.; MARTINS FILHO, E.F.; RAPOSO, A.C.S. ARAÚJO, N.L.L.C.; GOMES, D.C.G.JR. Lacrimal production of cats: schirmer tear test, phenol red thread tear test and endodontic absorbent paper point. **Enciclopédia Bioesfera**, v. 11, n. 22, p. 2085–2091, 2015.
- ORIÁ, A.P.; RAPOSO, A.C.S.; ARAÚJO, N.L.L.C.; LIMA, F.B.; MASMALI, A.M. Tear ferning test in healthy dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 21, n. 4, p. 391–398, 2018.
- POSA, A.; BRAUER, L.; SCHICHT, M.; GARREIS, F.; BEILEK, S.; PAULSEN, F. Schirmer strip vs, capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. **Ann Anat**, v. 195, p. 137–142, 2013.
- RAPOSO, A.C.; PORTELA, R.D.; MASMALI, A.; CARDOSO-BRITO, V.; BERNARDO, M.; OLIVEIRA, D.C.; ORIÁ, A. P. Evaluation of lacrimal production, osmolarity, crystallization, proteomic profile, and biochemistry of capuchin monkeys' tear film. **Journal of Medical Primatology**, p.1-8, 2018.
- ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret international journal of ophthalmology**, v. 2, p. 32–41, 1984.
- SILVA, L.R.; GOUVEIA, A.F.; DE FÁTIMA, C.J.; OLIVEIRA, L.B.; REIS, J.L.JR.; 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.

STUCHELL, R.N.; FARRIS, R.L.; MANDEL, I.D. Basal and reflex human tear analysis. II. Chemical analysis: lactoferrin and lysozyme. **Ophthalmology**. v.88, n.8, p.858-61, 1981.

TIFFANY, J. The normal tear film. **Developments in Ophthalmology**, v. 41, p. 1–20, 2008.

ANEXOS
(Material suplementar)

Tabela 1. Dosagem de eletrólitos nas lágrimas de aves, répteis e homem.

Espécies	Proteínas Totais (g/dL)	Cloreto (mEq/L)	Fósforo (mg/dL)	Cálcio (mg/dL)	Ferro (µg/dL)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Uréia (mg/dL)
<i>Ara ararauna</i>	2,33	158,05	6,58	10,31	117,12	122,07	7,14	262,72
<i>Amazona aestiva</i>	2,36	174,98	11,96	12,09	90,44	138,94	10,42	123,80
<i>Tyto alba</i>	3,39	126,99	-*	11,31	170,24	130,50	8,74	551,21
<i>Rupornis magnirostris</i>	2,19	152,99	8,09	9,99	175,56	135,00	10,47	217,27
<i>Chelonoides carbonária</i>	2,24	52,46	3,18	1,80	160,37	52,35	5,71	240,30
<i>Caretta caretta</i>	1,87	280,73	1,20	21,26	69,16	250,26	11,07	817,57
<i>Caiman latirostris</i>	3,04	130,04	7,23	4,26	223,44	135,56	14,37	500,60
<i>Homo sapiens</i>	6,1	111,82	7,19	9,81	111,72	114,20	4,89	107,27

*Teste não realizado devido à escassez da amostra.

Figura 1. Exemplos de padrões de cristalização em *Ara ararauna* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). Representação: (A) Tipo I (Rolando) e (B) Grau 0 (Masmali). Objetiva de 10x.

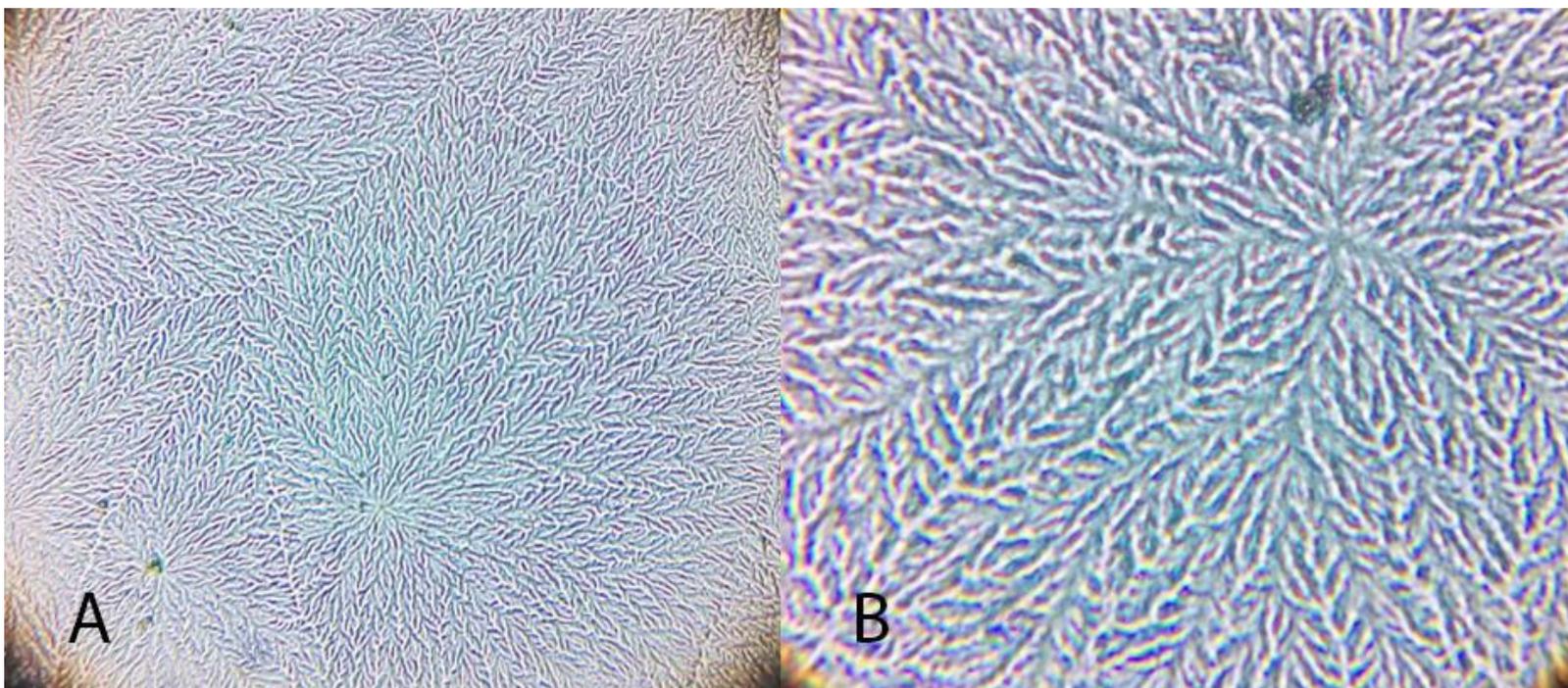


Figura 2. Exemplos de padrões de cristalização em *Amazonas aestiva* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). Representação: (A) tipo I (Rolando). (B): Tipo II (Rolando), grau 2 (Masmali). (C): grau 2 (Masmali). (D): tipo III (Rolando), grau 3 (Masmali). Objetiva de 10x.

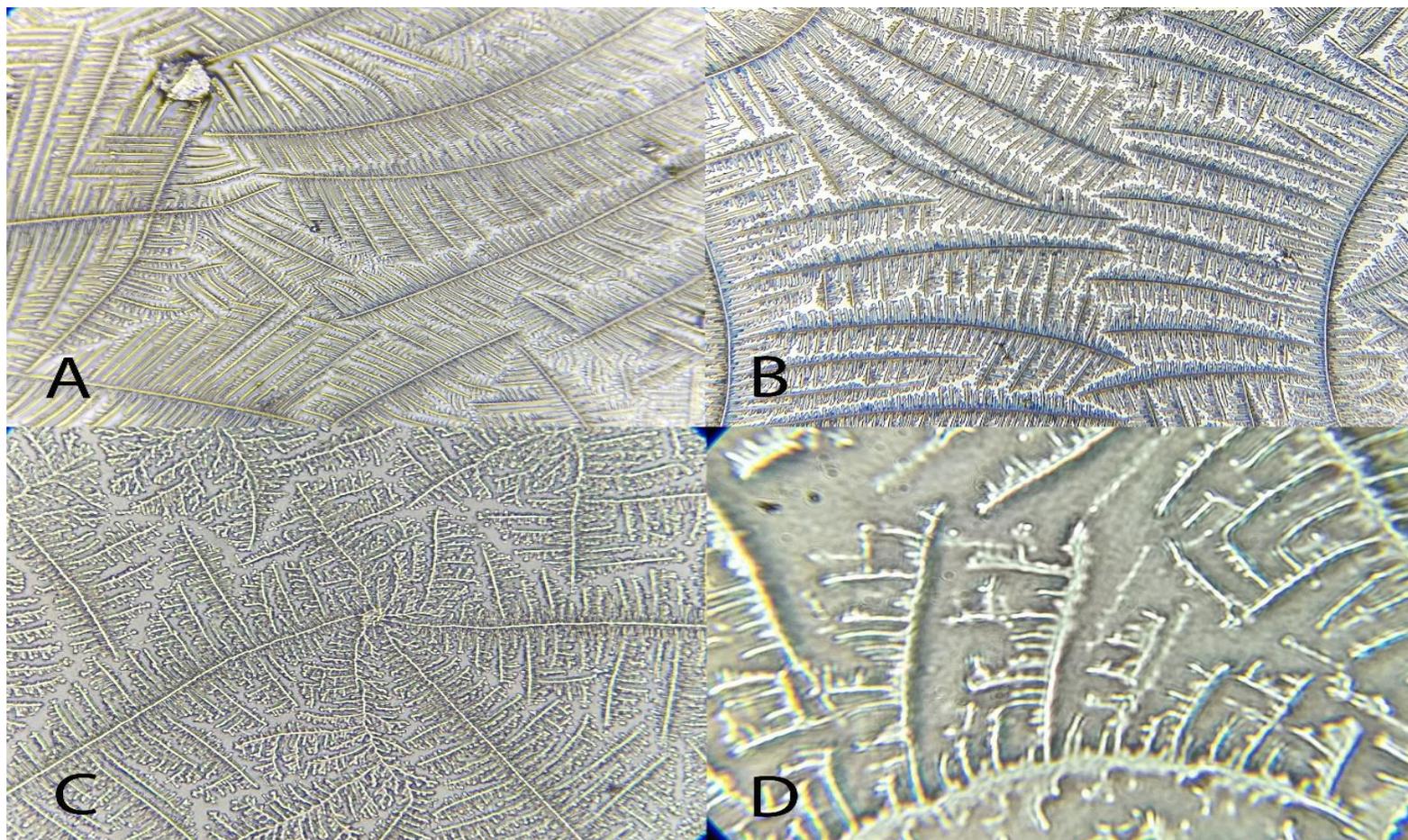


Figura 3. Exemplos de padrões de cristalização em *Tyto alba* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). Representação: (A): Tipo I (Rolando). (B): Tipo II (Rolando), grau 1 (Masmali). (C): Grau 1 (Masmali). (D): Tipo III (Rolando), grau 3 (Masmali). Objetiva 10x.

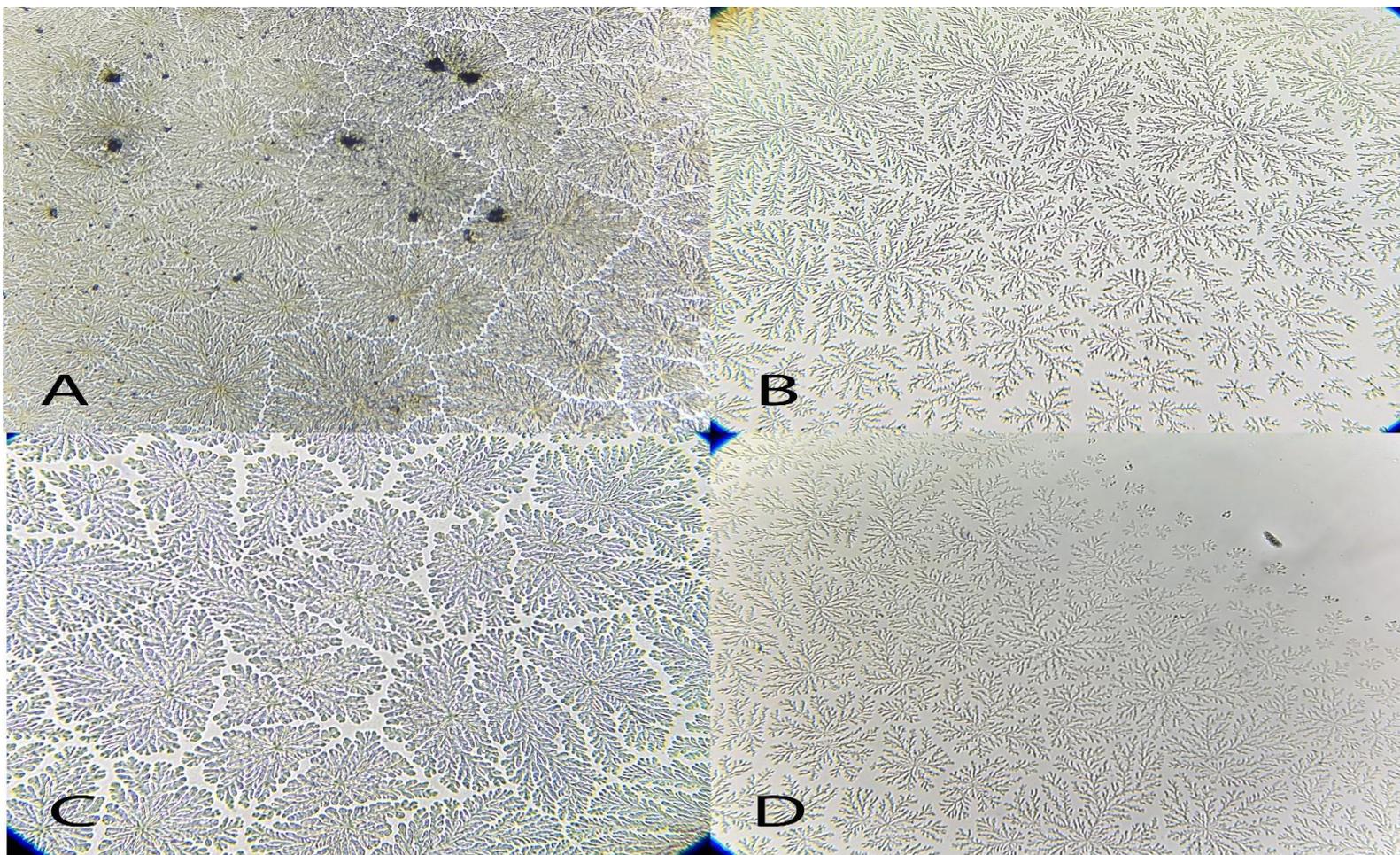


Figura 4. Exemplos de padrões de cristalização em *Rupornis magnirostris* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). Representação (A): Tipo 1 (Rolando), grau 1 (Masmali). (B): Grau 2 (Masmali). (C): Tipo II (Rolando). (D): Grau 3 (Masmali). Objetiva 10x.

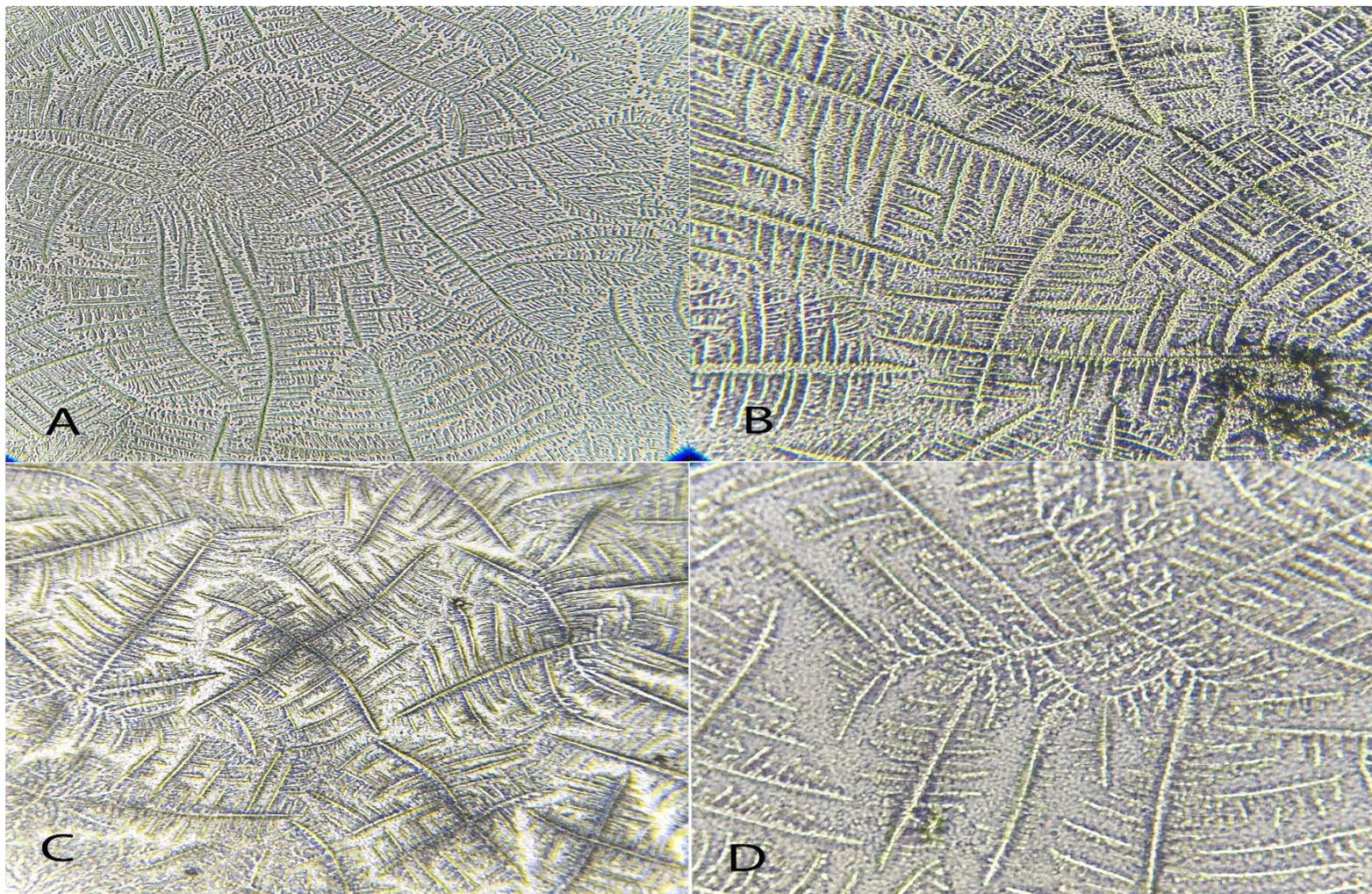


Figura 5. Exemplos de padrões de cristalização em *Chelonoides carbonaria* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). Representação A: tipo I (Rolando), grau 0 (Masmali). B: tipo II (Rolando), grau 1 (Masmali). C: tipo III (Rolando), grau 3 (Masmali). D: tipo III (Rolando), grau 3 (Masmali). E: tipo IV (Rolando), grau 3 (Masmali). F: grau 4 (Masmali). Objetiva 10x.

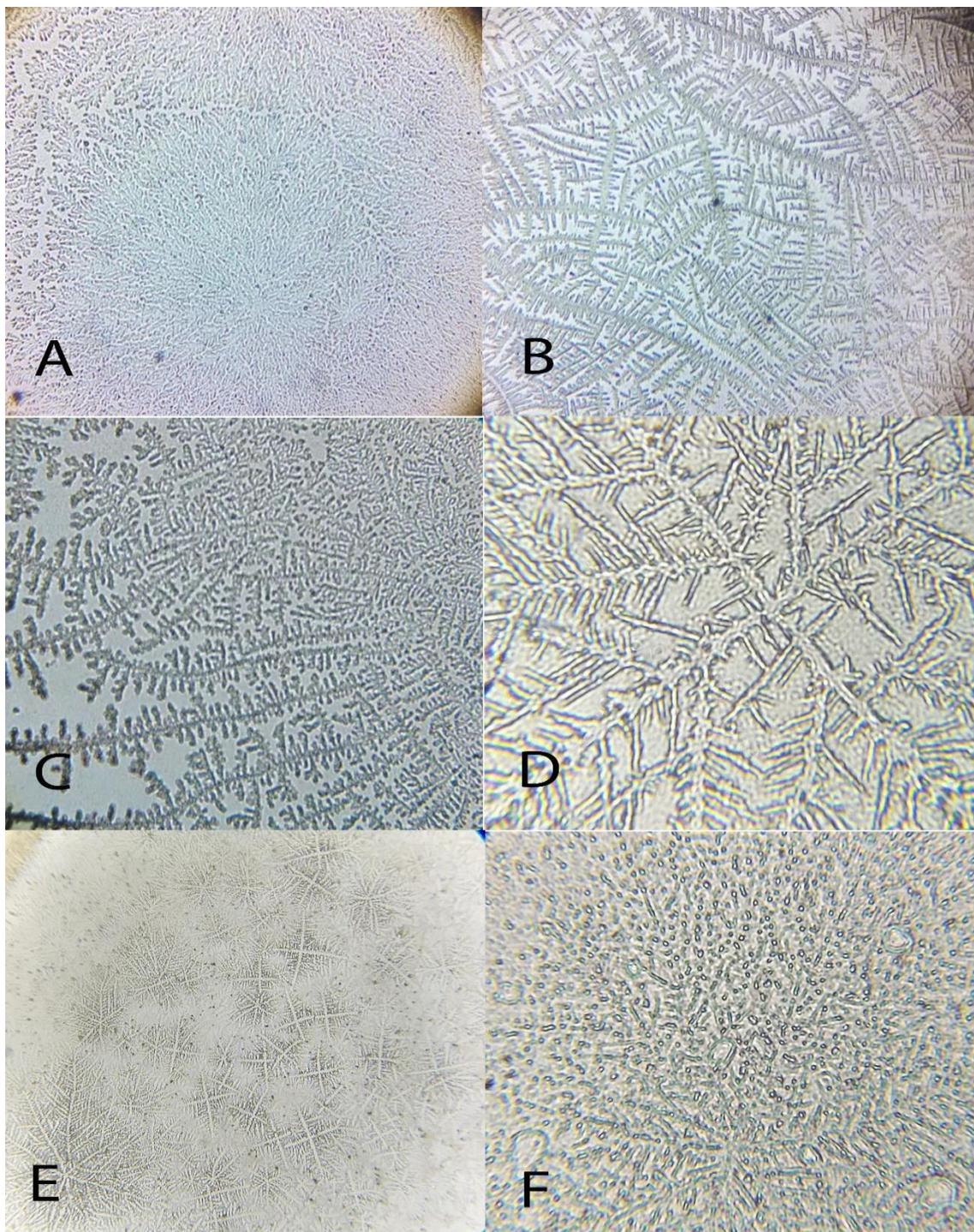


Figura 6. Exemplos de padrões de cristalização em *Caretta caretta* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). Representação: (A): Tipo I (Rolando), grau 0 (Masmali). (B): Tipo II (Rolando), grau 2 (Masmali). (C) Grau 3 (Masmali). (D): Tipo III (Rolando). Objetiva 10x.

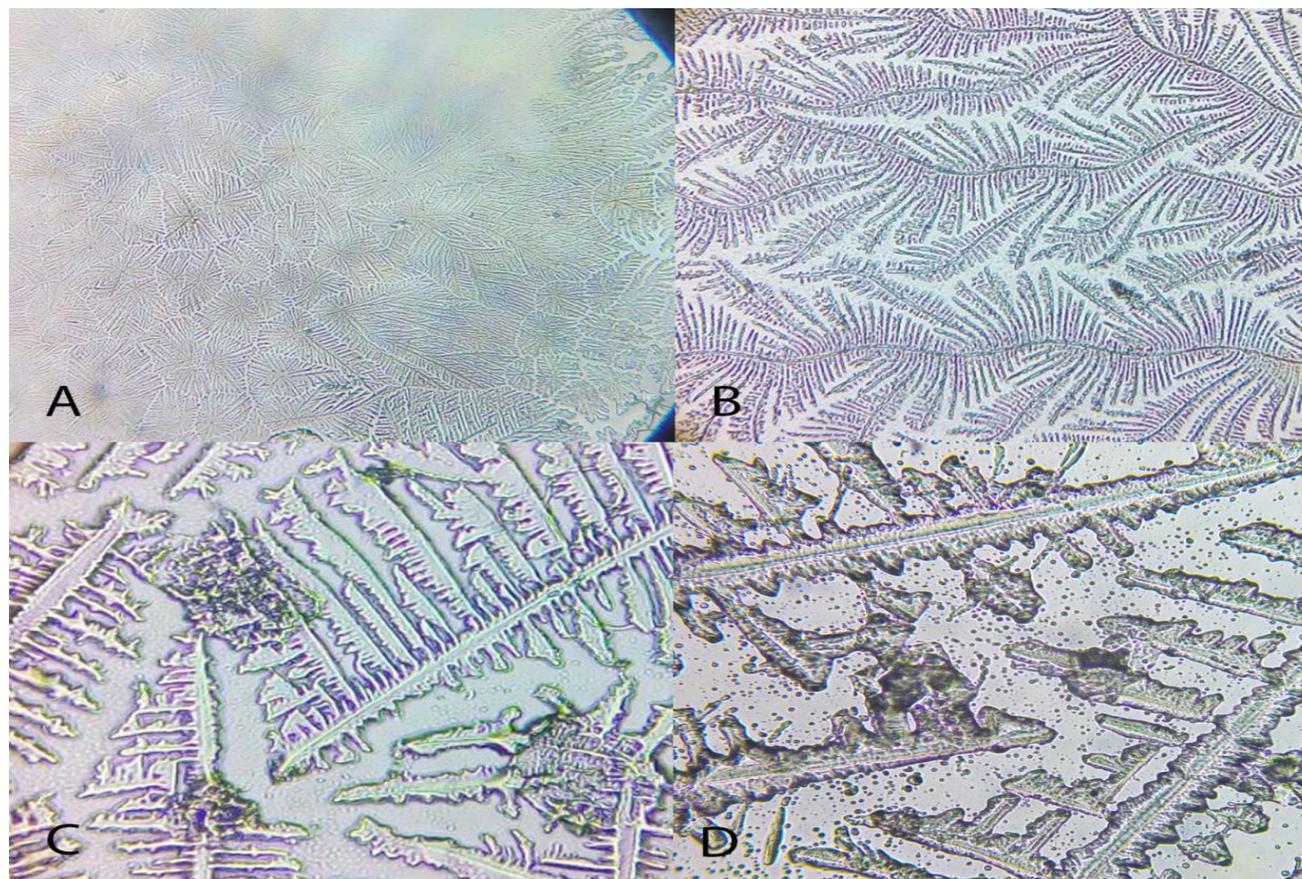
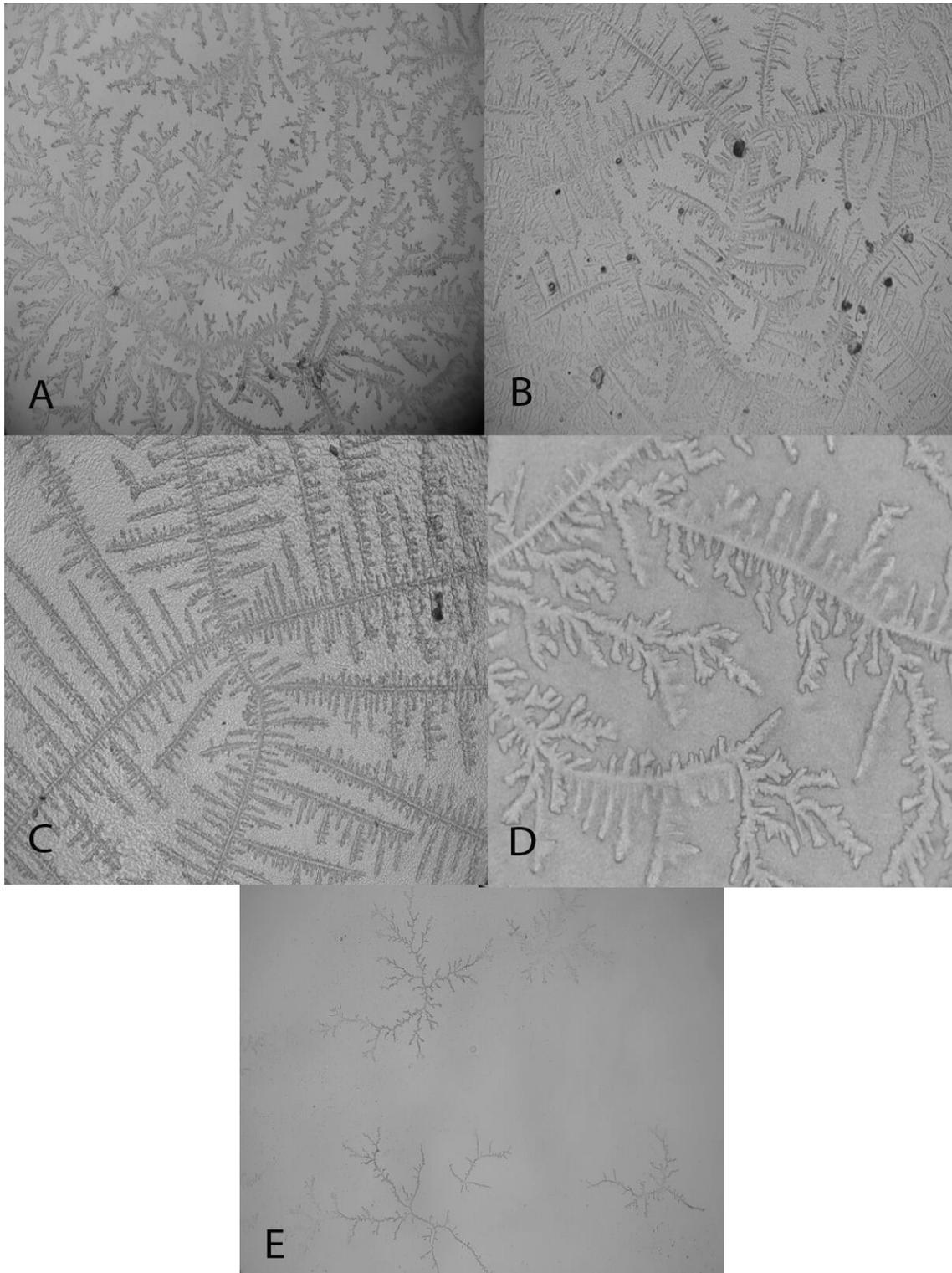


Figura 7. Exemplos de padrões de cristalização em *Caiman latirostris* de acordo com as escalas de Rolando (1984) e Masmali et al. (2014) Representação (A): Tipo II (Rolando), grau 1 (Masmali). (B): Tipo II (Rolando). (C): Tipo II (Rolando), grau 2 (Masmali). (D): Tipo III (Rolando), grau 3 (Masmali). (E): Tipo IV (Rolando), grau 4 (Masmali). Objetiva 10x.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O filme lacrimal compõe a interface entre o olho e o ambiente, e devido a sua complexa composição pesquisas são arroladas em humanos. Contudo, ainda há grande escassez quanto ao entendimento deste fluido em animais, além da compreensão em aspectos comparativos entre as espécies de diferentes nichos ecológicos. Desta forma, acredita-se que respostas sobre a sua dinâmica necessitam do desenvolvimento de parâmetros que se complementem, ou seja, em uma única pesquisa tentar construir o que é o filme lacrimal seria no mínimo, simplório.

Os estudos sobre os eletrólitos nas diferentes espécies mostraram que o processo evolutivo preservou o balanço iônico como forma de manutenção da homeostase, e que a cristalização da lágrima varia de acordo com todos os componentes presentes. O emprego TCL mostrou-se viável a ser utilizado na rotina veterinária e que este, de forma indireta, pode elucidar sobre a composição e variação dos componentes da lágrima.

REFERÊNCIAS

- ALMÁSSY, J.; DISZHÁZIA, G.; SKALICZKI, M.; MÁRTON, I.; MAGYARA, Z.E.; PÉTER P. NÁNÁSI, YULE, D. Expression of BK channels and Na⁺-K⁺ pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *The Ocular Surface. In press*: <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.007>
- AL-SAEDI, Z.; ZIMMERMAN, A.; BACHU, R. D.; DEY, S.; SHAH, Z.; BAUGH, R. E.; BODDU, S.H. Dry Eye Disease: Present Challenges in the Management and Future Trends. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, p. 4470-4490, 2016.
- ATKINSON D.E. Functional roles of urea synthesis in vertebrates. **Physiol Zool**, v.65, p.243–267,1992
- BARSOZZI, G.; BRIGANTI, A.; SPRATTE, J. R.; CECCHERELLI, R.; BREGHI, G. Schirmer tear test type I readings and intraocular pressure values assessed by applanation tonometry (Tonopen® XL) in normal eyes of four European species of birds of prey. **Veterinary Ophthalmology**, v.16, n.5, p. 365-369, 2013.
- BAYÓN, A.; ALMELA, R.M.; TALAVERA, J. Avian ophthalmology. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.17, n.3, p.253-265, 2007.
- BECKWITH-COHEN, B.; HOROWITZ, I.; BDOLAH-ABRAM, T.; LUBLIN, A.; OFRI, R. Differences in ocular parameters between diurnal and nocturnal raptors. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 1, p. 98-105, 2015.
- BURTON, R.F. The scaling of eye size in adult birds: Relationship to brain, head and body sizes. **Vision Research**, v. 48, p. 2345-2351, 2008.
- BUTOVICH, I.A.; LU, H.; MCMAHON, A.; EULE, J.C. Toward an animal model of the human tear film: biochemical comparison of the mouse, canine, rabbit, and human meibomian lipidomes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.53, p.6881–6896, 2012.
- CABRAL, V.P.; LAUS, J.L.; DAGLI, M.L.Z.; PEREIRA, G.T.; TALIERI, I.C.; MONTEIRO, E.R.; MAMEDE, F.V. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands' macroscopic and morphometric characteristics. **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.391-397, 2005.
- CARDOSO-BRITO, V.; RAPOSO, A.C.; ORIÁ, A.P. Semiotécnica oftálmica em aves. **Investigação**, v. 17, n. 3, p. 58–65, 2018.

- COLLIN, S.P.; COLLIN, H.B. The corneal epithelial surface in the eyes of vertebrates: environmental and evolutionary influences on structure and function. **J Morphol**, V. 267, n. 3 p.273–91, 2006.
- CRAIG, J.P.; NELSON, J.D.; AZAR, D.T.; BELMONTE, C.; BRON, A.J.; CHAUHAN, S.K.; DE PAIVA, C.S.; GOMES, J.A.P.; HAMMITT, K.M.; JONES, L.; NICHOLS, J.J.; NICHOLS, K.K.; NOVACK, G.D.; STAPLETON, F.J.; WILLCOX, M.D.P.; WOLFFSOHN, J.S.; SULLIVAN, D.A. TFOS DEWS II report executive summary. **Ocular Surface**, v.15, n.4, p.802-812, 2017.
- DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.2, p. 71-77, 2004.
- DE FOURCROY, A.F.; VAUQUELIN, L.N. Examen chimique des larmes et de l'humeur des narines (Chemical examination of tears and nasal humor). **Ann Chim**, n.10, p.113-30, 1791.
- FALCÃO, M.S.; MONTEIRO, A.R.V.; CARVALHO, C.M.; ANDRADE, H.H.; GALERA, P.D. Reference values for selected ophthalmic tests of the blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*). **Pesq. Vet. Bras.**, 37(4):389-394, 2017.
- FELBERG, S.; CORDEIRO, H.; SATO, E.H.; FILHO, D.M.; 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 Sjogren. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 2, p. 228–233, 2008.
- GALERA, P.D.; ÁVILA, M.O.; RIBEIRO, C.R.; SANTOS, F.V. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella* – LINNAEUS, 1758) e macacos bugio (*Alouatta caraya* – HUMBOLDT, 1812), provenientes do reservatório de Manso, MT, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.69, n.2, p.33-36, 2002.
- GELATT, K.N.; Veterinary Ophthalmology. 5. ed. Barcelona: Masson, v.2, p. 2170, 2013.
- GIPSON, I.K.; HORI, Y.; ARGUESO, P. Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. **The Ocular Surface**, v. 2, p.131–148, 2004.
- GIPSON, I.K. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 10, p. 4390–4398, 2007.
- GOLDING, T.R.; BRENNAN, N.A. The basis of tear ferning. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 72, n. 4, p. 102–112, 1989.

- HIDA, R.Y.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; HIDA, M.M.; TSUBOTA, K. Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, p. 433–437, 2005.
- HOLT, E.; ROSENTHAL, K.; SHOFR, F.S. The phenol red thread tear test in large Psittaciformes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, p. 109–113, 2006.
- HORWATH, J.; ETTINGER, K.; BACHERNEGG, M.; BODNER, E.; SCHMUT, O. Ocular Ferning Test – Effect of temperature and humidity on tear ferning patterns. **Ophthalmologica**, v. 215, p.102–107, 2001.
- ICMBio. Brazil Red Book of Threatened Species of Fauna (BRB). **INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**. p. 1–76, 2016.
- JACOBSON, E. R. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, p. 1-15, 2007.
- JOCHEMS, B.; PHILLIPS, T.E. Histological and ultrastructural studies on the conjunctiva of the barred owl (*Strix varia*). **PLOS ONE**, v.10, n.11, p.1-19, 2015.
- JONES, M.P.; PIERCE, K.E.; WARD, D. Avian vision: A review of form and function with special consideration to birds of prey. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.16, n.2, p.69-87, 2007.
- KRENZER, K.L. et al. Physiology of the tear film. In: SMOLIN, G; THOFT, R.A. **The Cornea**, Lippincott Williams and Wilkins; 3 ed, p. 439, 2001, Noida, India.
- LABELLE, A.L.; WHITTINGTON, J.K.; BREAUX, C.B.; LABELLE, P.; MITCHELL, M.A.; ZARFOSS, M.K.; SCHMIDT, S.A.; HAMOR, R.E. Clinical utility of a complete diagnostic protocol for the ocular evaluation of free-living raptors. **Veterinary Ophthalmology**, v. 15, n. 1, p. 5–17, 2012.
- LANGE, R.R. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, n. 6, p. 386-394, 2008a.
- 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**, v. 15, p. 376–382, 2012.
- LAWTON, M.P.C. Reptilian ophthalmology. In: Reptile Medicine and Surgery. 2nd edn. Eds Mader, D.R. St Louis, Saunders Elsevier. pp 323-342, 2006.
- LI, M.; ZHANG, M.; LIN, Y.; XIAO, Q.; ZHU, X.; SONG, S.; LIN, J.; CHEN, J.; LIU, I.Z. Tear function and goblet cell density after pterygium excision. **Eye**, v. 21, n. 2, p. 224–228, 2007.

- LIM, A.; WENK, M.R.; TONG, L. Lipid-based therapy for ocular surface inflammation and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.21, n.12, p.736-748, 2015.
- LIMA, L.; LANGE, R.R.; TURNER-GIANNICO, A.; MONTIANI-FERREIRA, M. Evaluation of standardized endodontic paper point tear test in New Zealand white rabbits and comparison between corneal sensitivity followed tear tests. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, p. 119–124, 2015.
- 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**, v. 97, n. 5, p. 399–406, 2014.
- MASMALI, A.M.; MURPHY, P.J.; PURSLOW, C. Development of a new grading scale for tear ferning. **Contact Lens & Anterior Eye**, v. 3, p. 178–184, 2014.
- MASMALI, A.M.; FAGEHI R.A.; EL-NAGGAR, A.H; ALMUBRAD, T.M.; AKHTAR, S. Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears, and Refresh Plus. **Molecular vision**, v. 24, p. 305–314, 2018.
- MONÇÃO-SILVA, R. M.; OFRI, R.; RAPOSO, A.C.S.; LIBÓRIO, F.A.; LIMA, A.E.S.; ORIÁ, A.P. Ophthalmic parameters of Blueand-yellow Macaws (*Ara ararauna*) and Lear’s Macaws (*Anodorhynchus leari*). **Avian biology research**, v. 9, n. 4, p. 240–249, 2016.
- MONÇÃO-SILVA, R.; OFRI, R.; RAPOSO, A.C.; ARAÚJO, N.; TOREZANI, J.; MURAMOTO, C.; ORIÁ, A. Ophthalmic diagnostic tests in parrots (*Amazona amazônica*) and (*Amazona aestiva*). **Journal of exotic pet medicine**, v. 25, n. 3, p. 186–193, 2016.
- MONTIANI-FERREIRA, F. Oftalmologia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. 1. ed. São Paulo: Roca, p.1092-1103, 2007.
- MONTIANI-FERREIRA, F.; SHAW, G.; MATTOS, B. C.; RUSS, H.H.A.; VILANI, R.G.D.C. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Veterinary Ophthalmology**, v.11, p.197–201, 2008.
- MONTIANI-FERREIRA, F.; TRUPPEL, J.; TRAMONTIN, M.H.; VILANI, R.G.D.O.; LANGE, R.R. The capybara eye: clinicial tests, anatomic and biometric features. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.6, p.386-394, 2008.
- MURUBE, J. Tear crystallization test: two centuries of history. **Ocul Surf**, v.4, n.2, p.7–9, 2004.

- MURUBE, J. Tear osmolarity. **The Ocular Surface**, v.4, p.62–73, 2006.
- ORIÁ, A.P.; MARTINS FILHO, E.F.; RAPOSO, A.C.S. ARAÚJO, N.L.L.C.; GOMES, D.C.G.JR. Lacrimal production of cats: schirmer tear test, phenol red thread tear test and endodontic absorbent paper point. **Enciclopédia Bioesfera**, v. 11, n. 22, p. 2085–2091, 2015a.
- ORIÁ, A.P.; OLIVEIRA, A.V.; PINNA, M.H.; MARTINS FILHO, E.F.; ESTRELA-LIMA, A.; PEIXOTO, T.C.; SILVA, R.M.; SANTANA, F.O.; MENESES, Í.D.; REQUIÃO, K.G.; OFRI, R. Ophthalmic diagnostic tests, orbital anatomy, and adnexal histology of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. s1, p. 30–39, 2015b.
- ORIÁ, A.P.; PINNA, M.H.; ALMEIDA, D.S.; da SILVA, R.M.M.; PINHEIRO, A.C.O.; SANTANA, F.O.; COSTA, T.R.; MENESES, I.D.S.; MARTINS FILHO, E.F.; OLIVEIRA, A.V.D. Conjunctival flora, Schirmer's tear test, intraocular pressure, and conjunctival cytology in neotropical primates from Salvador, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v.42, p.287–292, 2013b.
- ORIÁ, A.P.; RAPOSO, A.C.S.; ARAÚJO, N.L.L.C.; LIMA, F.B.; MASMALI, A.M. Tear ferning test in healthy dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 21, n. 4, p. 391–398, 2017.
- ORIÁ, A.P.; SILVA, R.M.; PINNA, M.H.; OLIVEIRA, A.V.; FERREIRA, P.R.; MARTINS FILHO, E.F.; MENESES, I.D.; REQUIÃO, K.G.; OFRI, R. Ophthalmic diagnostic tests in captive red-footed tortoises (*Chelonoidis carbonaria*) in Salvador, northeast Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. s1, p. 46–52, 2015.
- WILLIS, E. O.; ONIKI, Y. **Aves do estado de São Paulo**. Rio Claro: Divisa, 2003. 398p.
- 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, Spatial location studies on the chemical composition of human tear ferns. **Ophthal. Physiol. Opt.**, v. 20, n. 4, p. 306–313, 2000.
- RAPOSO, A.C.; PORTELA, R.D.; MASMALI, A.; CARDOSO-BRITO, V.; BERNARDO, M.; OLIVEIRA, D.C.; ORIÁ, A.P. Evaluation of lacrimal production, osmolarity, crystallization, proteomic profile, and biochemistry of capuchin monkeys' tear film. **Journal of Medical Primatology**, p.1-8, 2018.

- RIBEIRO, A.P.; BRITO, F.L.C.; MARTINS, B.C.; MAMEDE, F.; LAUS, J.L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 568-575, 2008.
- ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret international journal of ophthalmology**, v. 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**, v. 25, p. 763–773, 2008.
- SELMI, A.L.; MENDEST, G.M.; MACMANUS, C. Tonometry in adult yellow-footed tortoises (*Geochelone denticulata*). **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, n. 4, p. 305-307, 2003.
- 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**, v. 286, p. 2114-2119, 2001.
- SCHIRRA, F.; RICHARDS, S.M.; LIU, M.; SUZUKI, T.; YAMAGAMI, H.; SULLIVAN, D.A. Androgen regulation of lipogenic pathways in the mouse meibomian gland. **Experimental Eye Research**, v. 83, p. 291–296, 2006.
- SEBBAG, L.; KASS, P.H.; MAGGS, D.J. Reference values, interest correlations, and test-retest repeatability of selected tear film tests in healthy cats. **Journal American Veterinay Medicine Association**, p. 426-435, 2015.
- SHAMSI, F.A.; CHEN, Z.; LIANG, J.; LI, K.; AL-RAJHI, A.A.; CHAUDHRY, I. A.; LI, M.; WU, K. Analysis and comparison of proteomic profiles of tear fluid from human, cow, sheep, and camel eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, n. 52, p. 9156–9165, 2011.
- SILVA, L.R.; GOUVEIA, A.F.; DE FÁTIMA, C.J.; OLIVEIRA, L.B.; REIS, J.L.JR.; 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.
- STERN, M.E.; GAOA, J.; SIEMASKOA, K.F.; BEUERMANB, R.W.; PFLUGFELDERC, S.C. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 409–416, 2004.
- SWINGER, R.L.; SCHMIDT, K.A.; JR DUBIELZIG, R.R. Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. **Vet Ophthalmol**, v. 12, n. 1, p. 50-60, 2009.

- TIFFANY, J. The normal tear film. **Developments in Ophthalmology**, v.41, p.1–20, 2008.
- TIFFANY, J.M. Tears in health and disease, **Eye**, v. 17, n. 8, p. 923–926, 2003.
- TROST, K.; SKALICKY, M.; NELL, B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 3, p. 143–146, 2007.
- UNCU, G; AVCI, R; UNCU, Y; KAYMAZ, C; DEVELIO_GLU, O. The effects of different hormone replacement therapy regimens on tear function, intraocular pressure and lens opacity. **Gynecological Endocrinology**, v. 22, p. 501-550, 2006.
- WIESER, B.; TICHY, A.; NELL, B. Correlation between corneal sensitivity and quantity of reflex tearing in cows, horses, goats, sheep, dogs, cats, rabbits and guinea pigs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, p. 251-262, 2013.
- WILLIAMS, D.; HEWITT, H. Tear ferning in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Open veterinary journal**, v. 7, n. 3, p. 268–272, 2017.
- WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. **Veterinary clinics small animal practice**, v. 38, p. 251–268, 2008.
- WILLIAMS, D.L.; VILLAVINCENCIO, G.C.M.; WILSON, S. Chronic ocular lesions in tawny owls (*Strix aluco*) injured by road traffic. **Veterinary Record**, v. 159, n. 5, p. 148–153, 2006.
- YOSHINO, A.; TABUCHIB, M.; UOC, M.; TATSUMIA, H.; HIDESHIMAA, K.; KONDOD. S.; SEKINE, J. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 6116-6122, 2013.
- ZHOU L, BEUERMAN RW. Tear analysis in ocular surface diseases. **Prog Retin Eye Res.** v.31, p.527–550, 2012.