

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PRODUÇÃO LACRIMAL E DENSIDADE DE CÉLULAS CALICIFORMES  
CONJUNTIVais EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU**

Aline Maria Vasconcelos Lima  
**Orientador:** Prof. Dr. Nilo Sérgio Troncoso Chaves

GOIÂNIA  
2008



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas  
(TEDE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem resarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**  **Dissertação**  **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor: **Aline Maria Vasconcelos Lima** CPF: **987934891-53** E-mail: **alinevetufg@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?  Sim  Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: Sigla: **CAPES**

Título: Produção lacrimal e densidade de células caliciformes conjuntivais em cães da raça Shih-tzu Palavras-chave: **braquicefálicos, lágrima, mucina, ocular, canino**

Título em outra língua: **Tear production and conjunctival goblet cell density in Shih-tzu dogs**

Palavras-chave em outra língua: **brachycephalic, tear, mucin, ocular, canine**

Área de concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **29/02/2008**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**

Orientador(a): **Nilo Sérgio Troncoso Chaves** CPF: **088817231-15** E-mail: **troncoso@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Luiz Augusto Batista Brito** CPF: **087716181-04** E-mail: **labbrito@hotmail.com**

Co-orientador(2): **Eugenio Gonçalves de Araújo** CPF: **336755541-04** E-mail: **earaudo@vet.ufg.br**

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>  total  parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique:

[ ] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 16 de novembro de 2008 Assinatura do(a) autor(a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ALINE MARIA VASCONCELOS LIMA

**PRODUÇÃO LACRIMAL E DENSIDADE DE CÉLULAS CALICIFORMES  
CONJUNTIVais EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU**

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Ciência  
Animal junto à Escola de  
Veterinária da Universidade  
Federal de Goiás

**Área de Concentração:**  
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Orientador:**  
Prof. Dr. Nilo Sérgio Troncoso Chaves – UFG

Comitê de orientação:  
Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo  
Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

**Linha de Pesquisa:**  
Alterações clínicas, metabólicas e  
toxêmicas dos animais e meios  
auxilia

GOIÂNIA  
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(GPT/BC/UFG)

**Lima, Aline Maria Vasconcelos.**

**L732p** Produção lacrimal e densidade de células califormes conjuntivais em cães da raça SHIH-TZU [manuscrito] / Aline Maria Vasconcelos Lima. – 2008.  
xiii,39 f. il. : figs.

**Orientador: Prof. Dr. Nilo Sérgio Troncoso Chaves; Co-Orientadores: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, Prof.**

**Dr.**

**Luiz Augusto Batista Brito.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, 2008.**

Bibliografia: f. 31-37.

Inclui listas de figuras e de abreviaturas.

Anexos.

**I. Aparelho lacrimal – Cão 2. Shih-tzu (cão) – Avaliação lacrimal 3. Braquicefálicos I. Chaves, Nilo Sérgio Troncoso**

**II.**

**Araújo, Eugênio Gonçalves de III. Brito, Luiz Augusto Batista.**

**IV. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária**

**V. Título.**

**CDU**

:

**619:617.764:636.7**



Aos meus pais, que foram e são  
educadores, amigos, refúgios,  
companheiros, anjos, amores,  
vida, tudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai misericordioso, que me proporcionou a oportunidade de ingressar neste curso, e de concluir-lo, com saúde e paz de espírito.

Agradeço aos meus pais amados, Célio José de Lima e Maria Filomena Vasconcelos de Oliveira Lima, que com amor e carinho, sempre me apoiaram para que eu crescesse e evoluísse como profissional e como ser humano.

Agradeço ao meu esposo, Alex de Deus Rodrigues, que me deu a mão e estimulou em todos os momentos da minha vida acadêmica, respeitando e compreendendo a minha ausência, e torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador de pós-graduação e de coração, Prof. Dr. Nilo Sérgio Troncoso Chaves, por ter me acolhido tão carinhosamente como orientanda, despertado em mim o amor pela oftalmologia e confiado em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito e Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, pela co-orientação e sincero apoio.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva e Prof. Dr. Afonso Henrique de Miranda, pela amizade e confiança e por terem despertado em mim o amor pela Ciência.

Ao Prof. Dr. Olízio Claudino da Silva e Prof. MSc. Paulo Henrique Jorge da Cunha pela amizade e por me estimularem a seguir a carreira acadêmica.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neusa Margarida Paulo, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Moema Pacheco Chediak Matos, Prof<sup>a</sup> MSc. Ana Paula Iglesias Santin, Prof<sup>a</sup> MSc. Regiane Nascimento Gagno Porto, Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis, Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Naida Cristina Borges, Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Rosângela de Oliveira Alves, ao Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho, Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno e Prof. Dr. Dirson Vieira, pelo aprendizado, carinho e apoio.

Ao Prof. MSc. Luiz Fernando Fleury, pela colaboração na leitura dos cortes histológicos. À colega MV. Joyce Rodrigues Lobo, pela colaboração nos

exames hematológicos. Ao Técnico de Laboratório Sr. Antônio Souza da Silva, pelo aprendizado e pelo processamento das lâminas deste estudo.

Ao aluno de graduação Carlos Eduardo Fonseca Alves, pelo companheirismo, amizade, dedicação e responsabilidade durante a execução do experimento.

Aos meus queridos amigos MV. Júlia de Miranda Moraes, MV. MSc Marina Pacheco Miguel, MV. MSc. Liliana Borges de Menezes, MV. Alline Cardoso Borges, MV. MSc. Patrícia Lorena da Silva N. Guimaraes, MV. Leandro Guimarães Franco, pelo carinho e apoio incondicionais.

Em especial à minha amiga e irmã de coração MV. MSc. Andréia Vítor Couto do Amaral, pela paciência, apoio, carinho, por dividir comigo seus conhecimentos, pelo otimismo, ânimo, e por fazer deste curso uma experiência tão enriquecedora.

Aos colegas MV. João Fidelis, MV. Ronaldo Medeiros Azevedo e MV. MSc. Apóstolo Ferreira Martins, pela amizade e apoio.

Aos funcionários Carmita, Vilda, Sheila, Helton, Gerson Luis, Mônica, Izis, pelo carinho e paciência.

Aos proprietários dos animais, Roseane, Cynthia, Jarbas e Rosângela, pela confiança e carinho com que cederam seus animais para a realização do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

“A sabedoria, porém, que vem de cima, é primeiramente pura, depois pacífica, condescendente, conciliadora, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade, nem fingimento. O fruto da justiça semeia-se na paz para aqueles que praticam a paz.”

Tiago 3: 17-18.

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	ix
Lista de abreviaturas .....	xi
Resumo .....	xii
Abstract .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 O filme lacrimal pré-ocular .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1 Camada lipídica .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Camada aquosa .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3 Camada mucosa .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Deficiência lacrimal quantitativa .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1 O Teste Lacrimal de Schirmer para avaliação quantitativa da produção lacrimal .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Deficiência lacrimal qualitativa .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.1 Densidade de células caliciformes e higidez da superfície ocular .....</b>	<b>9</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>4 MATERIAL MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Seleção dos animais .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Teste lacrimal de Schirmer – 1 .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Teste lacrimal de Schirmer – 2 .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Biópsia Conjuntival .....</b>	<b>14</b>
<b>4.5 Processamento das amostras .....</b>	<b>15</b>

4.6	Densidade de células caliciformes .....	16
4.7	Avaliação histológica .....	17
4.8	Análise estatística .....	17
5	RESULTADOS .....	18
5.1	Teste Lacrimal de Schirmer 1 e Teste Lacrimal de Schirmer 2 .....	19
5.2	Densidade e Índice de Células Caliciformes .....	19
5.3	Testes lacrimais de Schirmer e Índice de células caliciformes conjuntivais .....	19
5.3	Avaliação Histológica .....	21
6	DISCUSSÃO .....	24
6.1	Teste Lacrimal de Schirmer 1 e Teste Lacrimal de Schirmer 2 .....	24
6.2	Densidade e Índice de Células Caliciformes .....	26
6.3	Testes lacrimais de Schirmer e Índice de células caliciformes conjuntivais .....	27
6.4	Avaliação Histológica .....	28
7	CONCLUSÃO .....	30
	REFERÊNCIAS .....	31
	ANEXOS	

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Cão da raça Shih-tzu .....	12
FIGURA 2 – Olho de um cão da raça Shih-tzu durante oftalmoscopia. ....	12
FIGURA 3 - Tira de papel Whaltam utilizada para o teste lacrimal de Schirmer. ....	14
FIGURA 4 - Teste lacrimal de Schirmer em cão Shih-tzu. ....	14
FIGURA 5 - Conjuntiva de cão Shih-tzu hígido. A seta mais larga mostra uma célula caliciforme repleta de mucina. A seta mais delgada mostra o núcleo de uma célula epitelial. Aumento de 100 x; coloração PAS. ....	16
FIGURA 6 - Dispersão dos valores de TLS-1, TLS-2 e ICC no olho esquerdo dos cães Shih-tzu estudados. ....	20
FIGURA 7 - Dispersão dos valores de TLS-1, TLS-2 e ICC no olho direito dos cães Shih-tzu estudados. ....	20
FIGURA 8 - Epitélio estratificado cúbico e células caliciformes (seta) em conjuntiva de cão Shih-tzu. Aumento de 100 x; coloração H&E. ....	22
FIGURA 9 - Metaplasia escamosa em epitélio conjuntival de cão Shih-tzu. A seta aponta o núcleo de uma célula epitelial escamosa. Aumento de 100 x; coloração H&E. ....	22
FIGURA 10 – Área de adelgaçamento epitelial (seta) associada a epitélio metaplásico. Aumento de 100 x; coloração H&E. ....	23

FIGURA 11 – Área de metaplasia escamosa associada a infiltrado inflamatório em conjuntiva de cão da raça Shih-tzu. Aumento de 100 x; coloração H&E. ....23

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CC	Células caliciformes
CE	Células epiteliais
DCC	Densidade de células caliciformes
HE	Hematoxilina e eosina
ICC	Índice de células caliciformes
KCS	Ceratoconjuntivite seca
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
PAS	Ácido periódico de Schiff
TLS	Teste lacrimal de Schirmer
TLS-1	Teste lacrimal de Schirmer - 1
TLS-2	Teste lacrimal de Schirmer - 2

## RESUMO

Considerando a importância da produção e qualidade lacrimal para a manutenção de uma córnea saudável, o presente trabalho objetivou avaliar a produção lacrimal e a densidade de células caliciformes conjuntivais em cães da raça Shih-tzu. Trinta e cinco cães Shih-tzu, sendo 33 fêmeas e dois machos, adultos, foram submetidos aos testes lacrimais de Schirmer 1 (TLS-1) e 2 (TLS-2). Destes animais, quatorze fêmeas e um macho foram submetidos à biópsia conjuntival para avaliação histológica da densidade e índice de células caliciformes conjuntivais (DCC e ICC). Os valores médios obtidos de TLS-1 para os cães estudados foram de  $19,66 \pm 7,3$  mm/min para o olho esquerdo (OE) e de  $21,97 \pm 5,7$  mm/min para o direito (OD). Os valores do TLS-2 foram de  $10,71 \pm 6,1$  mm/min e de  $9,14 \pm 4,78$  mm/min para OE e OD, respectivamente. A densidade média de células caliciformes (células caliciformes / 50 células epiteliais) encontrada foi de  $13,64 \pm 3,44$  e  $13,64 \pm 4,07$  para os olhos esquerdo e direito, respectivamente. Os índices de células caliciformes médios correspondentes foram de  $0,27 \pm 0,069$  para o olho esquerdo e de  $0,27 \pm 0,081$  para o olho direito. Houve diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito para TLS-1. Não houve diferença significativa entre os olhos para TLS-2, DCC e ICC. Os valores de TLS-1 e TLS-2 não influenciaram significativamente os valores de ICC. Os valores de TLS-1 e 2 encontrados para os animais avaliados se encontram dentro dos padrões considerados normais, mas os valores médios de ICC e DCC são inferiores aos valores descritos na literatura para cães hígidos de outras raças. Admitiu-se como oportuna a avaliação histológica dos fragmentos conjuntivais biopsiados, a qual revelou presença de áreas de metaplasia escamosa em 83,3% das lâminas avaliadas. Destas, 44% apresentavam metaplasias associadas a infiltrados inflamatórios predominantemente mononucleares.

Palavras-chave: braquicefálicos, lágrima, mucina, ocular, canino.

## ABSTRACT

Considering the relevance of tear production and tear quality to the conservation of the corneal health, the present study aimed to evaluate tear production and conjunctival goblet cells density in Shih-tzu dogs. Thirty five grown-up Shih-tzu dogs, including 33 females and 2 males, were subjected to Schirmer tear test 1 (STT-1) and Schirmer tear test 2 (STT-2). Among these dogs, fourteen females and one male underwent conjunctival biopsy for histologic evaluation of goblet cell density (GCD) and goblet cell index (GCI). The STT-1 mean values found were  $19,66 \pm 7,3$  mm/min for left eye (LE) and  $21,97 \pm 5,7$  mm/min for right eye (RE). The STT-2 mean values were  $10,71 \pm 6,1$  mm/min and  $9,14 \pm 4,78$  mm/min for LE and RE, respectively. The GCD mean values found were  $13,64 \pm 3,44$  goblet cells/50 epithelial cells for LE and  $13,64 \pm 4,07$  goblet cells/50 epithelial cells for RE. The GCIs correspondent were  $0,27 \pm 0,069$  and  $0,27 \pm 0,081$  for LE and RE, respectively. There was significant difference between LE and RE STT-1 values. There was not significant difference between eyes for STT-2, GCD and GCI values. STT-1 and STT-2 values did not influence significantly GCI values. STT-1 and STT-2 values are within of the pattern considered normal, but the GCD and GCI mean values are lower than those values described in literature for healthy dogs of other breeds. The conjunctival specimens histological evaluation was accepted as convenient, which demonstrated squamous metaplastic areas in 83,3% of the specimens. Within 44% of these, squamous metaplasia was predominantly associated with mononuclear infiltrate.

Key-words: brachycephalic, tear, mucin, ocular, canine.

## **1. INTRODUÇÃO**

Desde que foi oficialmente aceita pela Federação Cinológica Internacional em 1957, a raça canina Shih-tzu, de origem tibetana, vem ganhando cada vez mais popularidade em todo o mundo. Em 1998 alcançou o título de segunda raça mais registrada no Japão e, no Brasil, o número destes cães aumenta gradativamente (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA, 2007; FEDERAÇÃO CINOLÓGICA INTERNACIONAL, 2008). Perspicaz, ativo e alerta, o Shih-tzu é um cão de pequeno porte e temperamento dócil, qualidades que facilitam seu manejo em apartamentos e proporcionam harmonioso convívio com crianças e idosos. Além da pelagem exuberante, as características típicas de uma raça braquicefálica, como focinho curto, cabeça arredondada e olhos grandes e brilhantes, são elementos estéticos que despertam a simpatia dos criadores (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA, 2007).

O termo braquicefálico refere-se às raças caracterizadas por crânio curto, largo e fortemente convexo (SISSON, 1986; KOCH et al., 2003). Embora esta conformação cranial provoque apelo estético, tal particularidade anatômica pode causar prejuízos à saúde e bem-estar destes animais (OROZCO & GÓMEZ, 2003). Podem-se citar como exemplo as obstruções das vias aéreas superiores decorrentes de estenose das narinas, palato mole prolongado e/ou colapso de laringe (NELSON, 1989). Não obstante, a freqüência de enfermidades oftálmicas diagnosticadas nos cães braquicefálicos, especialmente nos Shih-tzu, assume proporções relevantes. As alterações oculares comuns à raça abrangem entropia de canto medial, triquíase, dermóide e prolapsos da glândula da terceira pálpebra (CHRISTMAS, 1992). Todavia, destacam-se as oftalmopatias que envolvem alterações da córnea, como ceratoconjuntivite seca, ceratites e úlceras corneanas (CARRINGTON et al., 1989; CHRISTMAS, 1992; SLATTER, 2001; SIMONAZZI & ZANICHELLI, 2002; CULLEN & GRAHN, 2003; OROZCO & GÓMEZ, 2003; BRANDÃO et al., 2004; WOERDT, 2004; TOLAR et al., 2006).

A órbita pouco profunda e o euribléfar, ou ampla fissura palpebral, são peculiaridades anatômicas que promovem a exoftalmia e lagoftalmia características dos cães Shih-tzu. A primeira condição pode ser definida como uma protrusão do globo ocular, e a segunda, como um incompleto recobrimento

deste quando ocorre o fechamento palpebral (SLATTER, 2005). Tais características podem promover inadequada distribuição do filme lacrimal sobre a superfície ocular, sua evaporação precoce e aumento da exposição corneana ao ambiente externo, o que favorece a desidratação da córnea e o desenvolvimento de lesões nesta (CARRINGTON et al., 1989; MOORE, 1999; WOERDT, 2004). SLATTER (2005) descreveu, especificamente para a raça Shih-tzu, a ocorrência de erosões corneanas profundas, as quais progridem para separação da córnea entre suas lamelas, seguidas de intensa vascularização e fibrose.

Embora as particularidades anatômicas contribuam de forma relevante para o desenvolvimento de ceratopatias nos cães Shih-tzu, não se pode afirmar que este seja o único fator desencadeador destas desordens nestes animais (SAITO & KOTANI, 1999). Considerando a importância do filme lacrimal para a higidez da superfície ocular, a avaliação do padrão quantitativo e qualitativo da produção lacrimal torna-se oportuna e necessária para a elucidação das condições oculares que envolvem as ceratopatias nos cães Shih-tzu, bem como para a evolução de sua terapêutica e prevenção. Este trabalho se propõe, pois, a estudar a produção lacrimal e a densidade de células caliciformes conjuntivais de cães da raça Shih-tzu.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O filme lacrimal pré-ocular

O componente secretório do sistema lacrimal produz o filme lacrimal pré-ocular trilaminar, o qual é considerado por alguns autores como a primeira camada da superfície ocular (CRISPIN, 2000; SLATTER, 2001). A primeira e mais externa camada desse filme é a lipídica, formada pelo produto das glândulas de Meibômio; a camada média é o componente aquoso produzido pelas glândulas lacrimal principal e da terceira pálpebra; e a camada de mucina, em contato com o epitélio corneano, é produzida pelas células caliciformes e epiteliais superficiais da conjuntiva ocular (MOORE, 1999).

O filme lacrimal é necessário para manutenção de uma superfície ocular homogênea à refração da luz; para a lubrificação das pálpebras, da conjuntiva e da córnea; para a suplementação e nutrição da córnea; para a transferência de oxigênio; para o aporte de células de defesa; para a remoção de corpos estranhos da córnea e conjuntiva; para a remoção de metabólitos, bem como para a defesa da superfície ocular por meio de substâncias antibacterianas, tais como a lactoferrina, as imunoglobulinas e as lisozimas (PRYDAL et al., 1992; PRYDAL & CAMPBELL, 1992; LAMBERTS, 1994; KING-SMITH et al., 2000).

#### 2.1.1. Camada lipídica

A camada lipídica, ou meibomiana, confere uma superfície plana e homogênea para refração da luz, reduz a evaporação lacrimal e previne a contaminação do filme lacrimal por *debris*. A substância oleosa ou meibum é produzida pelas glândulas de Meibômio, que são modificações de glândulas sebáceas, localizadas na placa tarsal (DRIVER & LEMP, 1996). O meibum é formado tanto por lipídios polares quanto por apolares, e possui ponto de solubilidade mais baixo que a secreção sebácea, o que permite sua integração ao filme lacrimal (BRON & TIFFANY, 1998). À semelhança de uma substância surfactante, a fração polar da camada meibomiana é compreendida por

fosfolipídios dispersos sobre a camada aquosa do filme lacrimal, enquanto a fração apolar repousa na porção mais superficial (DRIVER & LEMP, 1996)

A tensão superficial do filme lacrimal é inversamente proporcional à dispersão lipídica nele (DRIVER & LEMP, 1996). A diminuição da tensão superficial promove uma maior solubilidade em água, reduz a espessura do filme lacrimal e faz com que os lipídios permaneçam dispersos mesmo após o ato de piscar. A ausência da camada oleosa promove evaporação da porção aquosa da lágrima, o que resulta em diminuição do tempo de ruptura do filme lacrimal, condição de extrema importância na patogênese da síndrome do olho seco em todas as espécies (DAVIDSON & KUONEN, 2004).

### 2.1.2. Camada aquosa

A porção aquosa do filme lacrimal possui como principais funções a lubrificação e proteção da superfície ocular (DAVIDSON & KUONEN, 2004). É composta por 98,2% de água e 1,8% de sólidos constituídos principalmente por proteínas (GERMAN et al., 1998). Outros componentes da camada aquosa da lágrima incluem lactoferrina, lisozima, imunoglobulina A secretada (slgA), imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina M (IgM), albumina, transferrina, ceruloplasmina, pré-albumina específica lacrimal e glicoproteínas, as quais participam da defesa específica e inespecífica da superfície ocular. A porção aquosa da lágrima também é essencial fonte de nutrientes para a córnea, tais como sais inorgânicos, glicose, oxigênio e proteínas (GERMAN et al., 1998).

No cão, a glândula lacrimal principal e a glândula da terceira pálpebra são as principais produtoras da porção aquosa do filme lacrimal. Essas glândulas tubuloacinares possuem vários ductos pelos quais a secreção aquosa é levada aos fórnices conjuntivais (SLATTER, 2001).

### 2.1.3 Camada mucosa

A camada mucosa do filme lacrimal, composta por mucina, imunoglobulinas, uréia, sais, glicose, leucócitos, *debris* celulares e enzimas (DAVIDSON & KUONEN, 2004), está localizada entre a camada aquosa do filme lacrimal e o epitélio corneano. Sua função é a de proteger e lubrificar a superfície ocular, para prevenir seu ressecamento e sua contaminação por bactérias (MCKENZIE et al., 2000). Por ser hidrofílica, permite a adesão da lágrima ao epitélio corneano, que é hidrofóbico, acondicionando-o com muco e facilitando a dispersão da camada aquosa de forma plana e homogênea na superfície ocular. O muco não é firmemente aderido ao epitélio corneano, mas a existência do glicocálix anexado na superfície da córnea possibilita seu movimento livre, de forma segura. A camada mucosa também fornece proteção mecânica, evitando possíveis danos à superfície corneana por fricção das pálpebras no ato de piscar (DAVIDSON & KUONEN, 2004).

O muco também previne a fixação bacteriana na superfície ocular, mantendo significativa concentração de IgA. O muco capta e engolfa o material estranho, formando um filamento mucoso, que se move para o fórnix conjuntival, onde é expelido do olho. Este movimento permite a constante remoção de *debris* celulares, microorganismos e corpos estranhos. É válido ressaltar que a contínua reposição e renovação da lágrima também ajudam na inibição da aderência bacteriana na superfície corneana (DAVIDSON & KUONEN, 2004).

Essa substância mucosa é secretada, principalmente, pelas células caliciformes da conjuntiva, entretanto, as células epiteliais conjuntivais também contribuem para sua formação. As células caliciformes possuem secreção apócrina e, uma vez estimuladas, vesículas superficiais que contêm glicoproteínas fundem-se com a membrana destas células (ASHUTOSH, 1993). A secreção de mucina pelas células caliciformes pode ser estimulada por histamina, por antígeno ou por estímulo mecânico, como ocorre no blefaroespasmo (CORFIELD et al., 1997).

Anormalidades em quantidade ou qualidade de qualquer uma das três camadas do filme lacrimal pré-ocular podem comprometer sua dinâmica e suas funções primordiais (MOORE, 1999). Hipertoniciidade, desidratação e hipoxia do

epitélio e estroma corneanos são os eventos patofisiológicos iniciais associados à deficiência de lágrima. A lubrificação inadequada resulta em irritação ocular decorrente da fricção exercida pelas pálpebras, bem como em acúmulo de metabólitos tissulares potencialmente tóxicos. Nestas condições, a colonização da superfície ocular por microorganismos acontece rapidamente, resultando em infecção (MOORE, 1999; DAVIDSON & KUONEN, 2004). Visto que o componente lacrimal secretado em maior volume é o aquoso, a produção insuficiente deste é considerada deficiência lacrimal quantitativa. As deficiências dos componentes lipídico e mucoso do filme lacrimal são denominadas desordens lacrimais qualitativas (MOORE, 1999; CULLEN & GRAHN, 2003).

## 2.2. Deficiência lacrimal quantitativa

A deficiência da porção aquosa do filme lacrimal no cão é denominada ceratoconjuntivite seca (KCS). De ocorrência comum nesta espécie, a KCS é caracterizada pelo ressecamento e inflamação da córnea e conjuntiva, resultando freqüentemente em lesões corneanas progressivas e deficiência visual (MOORE, 1999; BARABINO et al., 2004).

A ausência ou redução da secreção aquosa lacrimal pode resultar de doença única ou de uma combinação de condições que afetem as glândulas lacrimais. Dentre as causas infecciosas de KCS em cães destacam-se a cinomose e a blefaroconjuntivite crônica. A hipoplasia acinar ocorre em raças miniaturas e tem caráter hereditário (MOORE, 1999). A KCS fármaco-induzida pode ocorrer após terapia sistêmica à base de sulfonamida, ou pela utilização crônica de colírio à base de atropina (HOLLINGSWORTH et al., 1992; BERGER et al., 1998). Os fármacos anestésicos e pré-anestésicos também reduzem, transitoriamente, a produção lacrimal (COLLINS et al., 1995). Devido à contribuição significativa da glândula da terceira pálpebra para a produção da porção aquosa lacrimal, sua remoção é uma importante causa iatrogênica da enfermidade (MORGAN et al., 1993). Outras condições apontadas como causadoras de KCS incluem doenças orbitais traumáticas ou inflamatórias, inervação parassimpática deficiente e desnervação sensorial da superfície ocular

(MORGAN et al., 1993; KASWAN & SALISBURY, 1990). A irradiação local decorrente do tratamento de neoplasias localizadas na cabeça e endocrinopatias, como hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo e *diabetes mellitus*, também podem contribuir para a manifestação da doença (KASWAN & SALISBURY, 1990). Embora as possíveis causas da KCS sejam numerosas, na maioria dos casos, a etiologia é desconhecida. Estudos histopatológicos do tecido lacrimal de cães afetados pela KCS idiopática sugeriram uma base imunológica para a doença (MOORE, 1999). Relatos de imunopatias concorrentes e de resposta à terapia imunomoduladora corroboram com os achados histopatológicos, o que permite afirmar que a etiologia imunomediada prevalece sobre as demais causas de KCS em cães (KASWAN et al., 1983; MOORE, 1999).

Os sinais clínicos da KCS variam dependendo do tempo de afecção e do grau de ressecamento. Na forma aguda, o olho torna-se severamente doloroso em associação à ulceração corneana axial (MOORE, 1999). Todavia, a forma clínica típica é mais lenta, iniciando-se com olho vermelho e com descarga mucóide, progredindo para opacidade da córnea, hiperemia conjuntival e descarga ocular mucopurulenta persistente. Mais tarde, observam-se ceratite, vascularização, pigmentação e ulceração corneanas (MOORE, 1999).

#### 2.2.1. O Teste Lacrimal de Schirmer para avaliação quantitativa da produção lacrimal

O teste lacrimal de Schirmer (TLS), o método padrão para quantificar a produção aquosa da lágrima no cão (WILLIAMS, 2005; MOORE & BONAGURA, 2000), pode ser classificado em TLS-1 e TLS-2. O primeiro é executado sem anestesia da superfície ocular, e o segundo, após instilação de colírio anestésico. O TLS-1 envolve o estímulo de lacrimejamento provocado pela inserção da tira de papel no saco conjuntival, e inclui as secreções lacrimais residual, basal e reflexa. O TLS-2 suprime a secreção lacrimal reflexa devido à anestesia da superfície ocular, e, provavelmente estima somente a secreção lacrimal basal (SAITO & KOTANI, 1999; BEECH et al., 2003). O diagnóstico de KCS no cão é baseado nos

sinais clínicos e no valor do TLS-1 (MOORE, 1999). Os valores referenciais podem ser interpretados conforme o Quadro 1:

QUADRO 1 – Valores de leituras do TLS-1 e respectivas interpretações.

Leitura (mm/min)	Interpretação
≥ 15 mm/min	Produção lacrimal normal
11- 14 mm/min	KCS inicial ou subclínica
6-10 mm/min	KCS moderada
≤ 5 mm/min	KCS severa

Fonte: MOORE (1999).

SLATTER (2005) descreveu valores normais de TLS-1 e TLS-2 para cães de  $19,8 \pm 5,3$  mm/min e  $11,6 \pm 6,1$  mm/min, respectivamente. Especula-se que os valores do TLS-1 e 2 no cão podem ser influenciados pela raça. Um trabalho realizado com diferentes raças caninas descreveu valores de TLS-1 e TLS-2 iguais a  $20,2 \pm 2,5$  mm/min e  $3,8 \pm 2,7$  mm/min para cães Beagle,  $22,9 \pm 4,1$  mm/min e  $9,6 \pm 3,8$  mm/min para o Labrador Retriever,  $21,8 \pm 3,7$  mm/min e  $8,8 \pm 3,1$  mm/min para o Golden Retriever; e  $15,8 \pm 1,8$  mm/min e  $3,6 \pm 2,8$  mm/min para o Pastor de Shetland (HAMOR et al., 2000). Estudando aspectos da produção lacrimal em cães Shih-tzu hígidos, SAITO & KOTANI (1999) obtiveram valores de  $18,8 \pm 2,3$  mm/min para o TLS-1 e  $8,2 \pm 5,4$  mm/min para o TLS-2.

Os valores do TLS podem sofrer mínimas variações de acordo com a hora do dia (HARTLEY et al., 2006). A idade do animal também influencia na produção lacrimal: os cães jovens possuem valores maiores de TLS que os cães idosos (HARTLEY et al., 2006; KASWAN et al., 1991). Os animais castrados tendem a ter valores inferiores de TLS quando comparados aos inteiros (HARTLEY et al., 2006; KASWAN et al., 1985). SANSON & BARNET (1985) e BARNETT (1988) observaram uma maior ocorrência de KCS em cadelas, a despeito de as diferenças entre a produção lacrimal de machos e fêmeas serem ainda controversas (HARTLEY et al., 2006; KASWAN et al., 1985).

### 2.3. Deficiência lacrimal qualitativa

Casos complicados de olho seco podem ocorrer mesmo quando o volume lacrimal aquoso é normal. Nestes casos, a deficiência lacrimal qualitativa decorrente de anormalidade do componente lipídico ou mucoso do filme lacrimal pode ser a causa primária da doença da superfície ocular (MOORE, 1999).

Os distúrbios das glândulas de Meibômio podem resultar em inadequada secreção lipídica, prejudicando a formação e a estabilidade da camada mais superficial do filme lacrimal e permitindo a evaporação prematura da camada aquosa. As moléculas lipídicas alteradas também podem ser diretamente tóxicas ao epitélio corneano (DAVIDSON & KUONEN, 2004). Blefarites, blefaroconjuntivites e meibomianites podem prejudicar a produção deste componente do filme lacrimal, causando deficiência lacrimal qualitativa e ceratopatias (MOORE, 1999, DAVIDSON & KUONEN, 2004).

A produção insuficiente de mucina pré-ocular também resulta em desestabilização do filme lacrimal (DAVIDSON & KUONEN, 2004). No cão, o olho seco por deficiência de mucina pode ocorrer de forma espontânea ou decorrente de inflamação conjuntival crônica (MOORE & COLLIER, 1990). A cicatrização severa após enfermidade ulcerativa difusa na conjuntiva também pode envolver déficit de células caliciformes. A deficiência de vitamina A, induzida experimentalmente, foi associada à redução do número das células caliciformes conjuntivais (SHERMAN, 1986). A diminuição da densidade destas células resulta em instabilidade e evaporação precoce do filme lacrimal; prejudicando a lubrificação, a nutrição e a proteção da superfície ocular (CULLEN & GRAHN, 2003).

#### 2.3.1. Densidade de células caliciformes e higidez da superfície ocular

O diagnóstico clínico de deficiência de mucina ocular no cão deve ser confirmado pela quantificação histológica de células caliciformes, obtida após biópsia conjuntival (MOORE, 1999, SLATTER, 2005). A quantificação das células caliciformes conjuntivais fornece uma mensuração indireta da produção de

mucina, sendo considerada um sensível indicador da higidez da superfície ocular (MOORE et al., 1987; KINOSHITA et al., 1983).

Na conjuntiva canina, as células caliciformes (CC) estão presentes em pequeno número no epitélio bulbar e em maior número nos fórnices inferiores nasal e medial (MOORE et al., 1987). O maior número de CC e a facilidade de acesso fazem do fórnice conjuntival inferior nasal o sítio padrão para a colheita de amostras a fim de se obter a quantificação histológica das CC conjuntivais no cão (MOORE et al., 1987). A razão entre o número de CC e o de epiteliais conjuntivais numa mesma região é denominada densidade ou índice de CC (MOORE, 1999; BOURGES-ABELLA et al., 2007). Este índice varia de 0,29 a 0,30 em cães normais, podendo atingir valores próximos a 0,05 nos animais com deficiência de mucina ocular (MOORE, 1987).

O grau de hidratação conjuntival pode ser um fator determinante para a densidade de CC conjuntivais (MOORE et al., 2001). Estudos demonstraram uma relação direta entre a ceratoconjuntivite seca e a diminuição da densidade de CC (RALPH, 1975; MOORE et al., 1987; MOORE et al., 2001). Com a progressão das injúrias provocadas pela KCS, o número de CC tende a diminuir drasticamente, resultando em metaplasia escamosa, em aumento da área epitelial e em ocasional queratinização do epitélio conjuntival (MOORE et al., 2001; KUNERT et al., 2002).

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi o de realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa dos componentes lacrimais aquoso e mucoso, em cães hígidos da raça Shih-tzu.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Mensurar a produção da porção aquosa do filme lacrimal de cães hígidos da raça Shih-tzu, por meio do TLS-1;
  - Mensurar a produção da porção aquosa do filme lacrimal frente à anestesia da superfície ocular de cães hígidos da raça Shih-tzu, por meio do TLS-2;
  - Obter a densidade de células caliciformes (DCC) conjuntivais em cães hígidos da raça Shih-tzu.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Seleção dos animais

Fêmeas e machos não castrados de cães da raça Shih-tzu (Figura 1), com idade variando entre dois e cinco anos, foram avaliados em canis particulares do município de Goiânia. Todos os animais foram identificados, pesados e submetidos a exame clínico, que compreendeu a avaliação do estado geral, do grau de hidratação, da coloração das mucosas conjuntival, gengival e genital; a aferição da freqüência cardio-respiratória, do pulso, da temperatura retal; a palpação dos linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos.

Em seguida, todos os cães foram submetidos ao exame oftalmológico. Com auxílio de fonte de luz, observaram-se: o aspecto e simetria do globo ocular, a coloração das conjuntivas palpebral e bulbar, a presença ou ausência de lesões perioculares, de secreção ocular mucosa ou purulenta e de opacificações corneanas. Procedeu-se, então, à oftalmoscopia, utilizando-se um oftalmoscópio direto (Pan Optic, Welch Allyn®, New York, USA), por meio do qual foram examinados a córnea, o humor aquoso, o cristalino, o vítreo, a íris e o fundo de olho, com o intuito de detectar a presença ou ausência de alterações (Figura 2).



FIGURA 1 – Cão da raça Shih-tzu



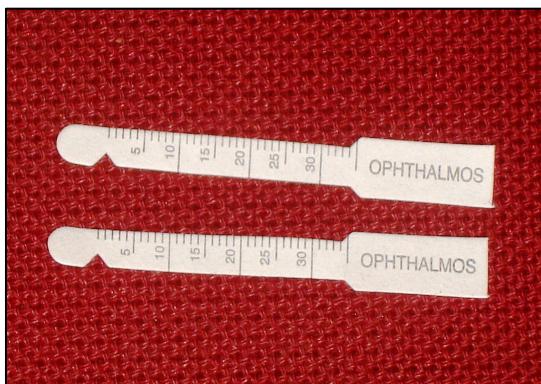
FIGURA 2 – Olho de um cão hígido da raça Shih-tzu durante a oftalmoscopia.

Os animais que não apresentaram qualquer alteração ao exame clínico e oftalmico foram submetidos à colheita de sangue para realização de hemograma e pesquisa de hematozoários, sendo então selecionados para o grupo experimental. Este grupo constou, ao todo, de 35 animais, sendo 33 fêmeas e dois machos, com idade variando entre dois a cinco anos de idade. Os testes lacrimais de Schirmer foram realizados nos 70 olhos (35 animais) e as biópsias conjuntivais em 30 olhos (15 animais).

#### 4.2. Teste lacrimal de Schirmer – 1

Os animais foram testados sempre no mesmo ambulatório do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período vespertino. Para ser avaliado, o cão era posicionado em estação sobre uma mesa de aço inoxidável, quando se esperavam alguns minutos para adaptação ao ambiente, para então dar início aos testes. O primeiro olho a ser testado era escolhido ao acaso.

Os Testes Lacrimais de Schirmer foram executados nos 35 animais, utilizando tiras de papel de filtro Whatman nº. 41 (Teste de Schirmer Ophthalmos, Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil) (Figura 3). Para a realização do TLS-1, a pesquisadora manteve as mãos enluvadas durante todo o procedimento. De acordo com as instruções do fabricante, a tira a ser utilizada tinha a extremidade inicial dobrada ainda no interior do envelope, do qual era retirada pela extremidade terminal. A extremidade dobrada da tira era cuidadosamente inserida na porção medial do saco conjuntival inferior (Figura 4). Neste momento, iniciava-se a cronometragem, sendo que a leitura dos milímetros umedecidos da tira era registrada após exatos sessenta segundos, de acordo com o descrito por MOORE (1999). Em seguida, o olho contralateral era submetido ao mesmo procedimento.



**FIGURA 3** - Tira de papel Whatman utilizada para o teste lacrimal de Schirmer.



**FIGURA 4** - Teste lacrimal de Schirmer em cão Shih-tzu.

#### 4.3. Teste lacrimal de Schirmer – 2

Os mesmos animais submetidos ao TLS-1 foram testados com o TLS-2, conforme a descrição de BERGER & KING (1998). Após a execução do TLS-1, foi instilada em cada olho uma gota de colírio anestésico à base de cloridrato de proparacaína a 0,5% (Anestalcon®, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

Decorridos cinco minutos da instilação do colírio, retirava-se delicadamente o resíduo lacrimal do saco conjuntival inferior com zaragatoa estéril, e uma nova tira para TLS era inserida no terço medial do saco conjuntival. Após sessenta segundos, procedia-se à leitura da porção umedecida da tira. Imediatamente, repetia-se o mesmo procedimento no olho contralateral.

#### 4.4. Biópsia Conjuntival

Logo após os TLS 1 e 2, foi realizada a biópsia nos olhos direito e esquerdo de 15 animais, após o consentimento dos respectivos proprietários. Após a limpeza ocular com solução fisiológica, foi instilado, em ambos os olhos, um colírio anestésico à base de cloridrato de proparacaína a 0,5% (Anestalcon®,

Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), na freqüência de uma gota a cada 30 segundos, durante três minutos, de acordo com o recomendado por SLATTER (2005). A cada minuto, também se instilou uma gota de cloridrato de fenilefrina a 10% (Fenilefrina, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil). Cinco minutos após a anestesia, os cães eram contidos manualmente com auxílio de dois colaboradores, e o fórnice conjuntival ventral nasal era delicadamente pinçado. Utilizando uma tesoura de ponta romba, retirava-se um fragmento conjuntival de cerca de cinco milímetros. A hemostasia era realizada através de compressão palpebral com gaze estéril. Após o procedimento, os cães foram protegidos com colares elizabetanos por 24 horas e receberam instilação local de colírio antibiótico à base de tobramicina (Tobramicina, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) na posologia de uma gota a cada quatro horas, durante 48 horas.

#### 4.5. Processamento das amostras

Cada amostra conjuntival biopsiada foi imediatamente inserida em um recipiente contendo formalina tamponada a 10%, para fixação. Após 24 horas em formalina, os espécimes foram recortados, inseridos em cassetes individuais e identificados. De acordo com a técnica utilizada rotineiramente pelo Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, houve o processamento e inclusão das amostras em parafina, seguidos de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), de acordo com o descrito por LUNA (1968).

#### 4.6. Densidade de células caliciformes

A contagem das CC foi realizada no Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. A DCC, determinada de acordo com CULLEN et al. (1999) e CULLEN et al. (2005), baseou-se na contagem destas e das células epiteliais, incluindo as células epiteliais escamosas, poligonais e basais. As CC foram identificadas pela presença de material intracelular PAS-positivo, ou seja, corado em vermelho-púrpura (Figura 5). Os núcleos celulares associados a material PAS-positivo foram considerados núcleos de CC, conforme o descrito por MOORE et al. (1987).

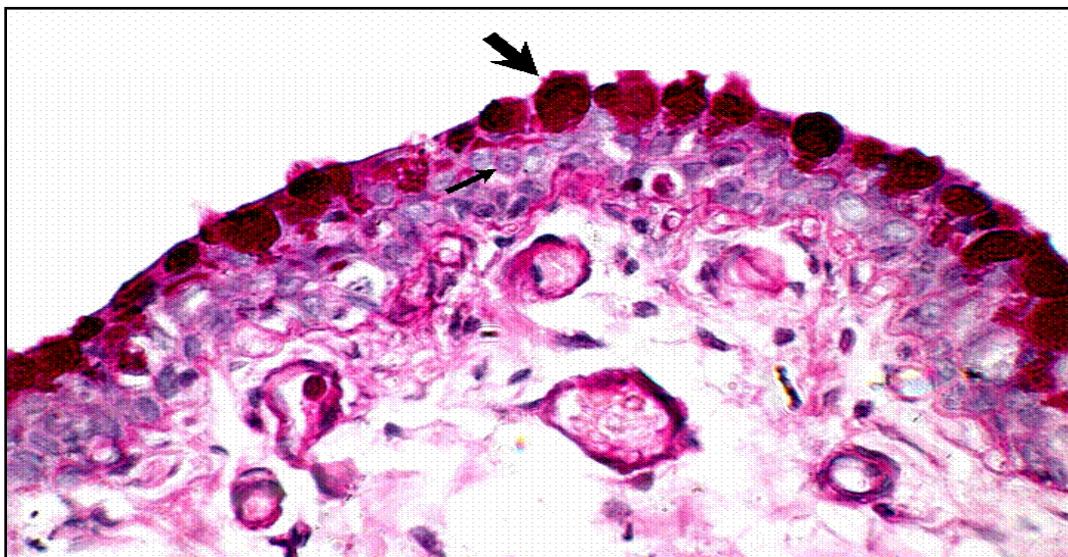


FIGURA 5: Conjuntiva de cão Shih-tzu hígido. A seta mais larga indica uma célula caliciforme repleta de mucina, enquanto a seta mais delgada aponta o núcleo de uma célula epitelial. Aumento de 100 x; coloração PAS.

Utilizando-se de uma câmera fotográfica (CCD Color câmera SAC – 410ND®, Samsung Electronics, Korea) acoplada a um microscópio trinocular, com aumento de 100 x, três imagens fotográficas foram obtidas de cada lâmina. A escolha da região a ser fotografada foi feita levando-se em consideração a integridade do epitélio conjuntival. As imagens foram transferidas para o software

de análise de imagens Axio Vision 3.1 (Carl Zeiss-Jena Vision, München-Hallbergmoos, Alemanha), o qual foi utilizado para a contagem das células. De cada imagem obtida, 50 CE foram contadas em uma determinada região, onde, posteriormente, se procedeu à contagem de CC. A DCC foi representada pela expressão: número de CC / 50 CE. Este procedimento foi repetido nas três imagens de cada lâmina, sendo que a média delas resultou na DCC para o olho representado pela respectiva lâmina. O índice de CC foi calculado dividindo-se a DCC por 50.

#### 4.7. Avaliação histológica

Admitiu-se como oportuna a avaliação histológica dos fragmentos teciduais obtidos por meio das biópsias conjuntivais. Na avaliação histológica dos fragmentos conjuntivais realizada no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas, as lâminas coradas pela HE foram examinadas em fotomicroscópio óptico de campo claro e avaliadas no tocante aos seguintes fatores: presença ou ausência de alterações como hiperemia, edema, metaplasia escamosa e infiltração de células inflamatórias.

#### 4.8. Análise estatística

A análise estatística dos valores de TLS-1, TLS-2, DCC e ICC tiveram os seguintes objetivos: obter as respectivas médias e desvios-padrão; verificar o tipo de distribuição para a escolha adequada do teste estatístico, conforme ilustrado na Tabela 2 (ver capítulo Anexos). Adotando-se um nível de significância de 0,05, lançou-se mão do teste T de Student para dados pareados, com o propósito de verificar se existiu ou não diferença significativa entre os olhos direito (OD) e esquerdo (OE) dentro de um mesmo teste e entre os valores de TLS-1 e TLS-2 para os dois olhos. A análise de regressão foi utilizada para verificar se existiu influência significativa entre os testes lacrimais de Schirmer e o índice de células caliciformes (SAMPAIO, 1998).

## 5. RESULTADOS

Os valores de TLS-1, TLS-2, DCC e ICC obtidos estão distribuídos na Tabela 1 (ver capítulo Anexos). As médias e desvios-padrão de cada variável estudada e os valores encontrados para p estão distribuídos nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 – Média e desvio-padrão de cada variável nos olhos direito e esquerdo

Variável	Média	Desvio padrão	P
<b>TLS1</b>			
Olho Esquerdo	19,66*	7,30	
Olho Direito	21,97*	5,69	0,047
<b>TLS2</b>			
Olho Esquerdo	10,71	6,10	
Olho Direito	9,14	4,78	0,216
<b>DCC</b>			
Olho Esquerdo	13,64	3,44	
Olho Direito	13,64	4,07	1,000
<b>ICC</b>			
Olho Esquerdo	0,273	0,069	
Olho Direito	0,273	0,081	1,000

Teste: t-Student para dados pareados.

TABELA 4 – Média e desvio-padrão de cada olho e em cada fator de TLS.

Variável	Média	Desvio padrão	P
<b>Olho Esquerdo</b>			
TLS 1	19,66*	7,30	
TLS 2	10,71*	6,10	< 0,001
<b>Olho Direito</b>			
TLS 1	21,97*	5,69	
TLS 2	9,14*	4,78	< 0,001

Teste: t-Student para dados pareados

### 5.1. Testes Lacrimais de Schirmer 1 e 2

Os valores médios de TLS-1 encontrados nos cães Shih-tzu estudados foram de  $19,66 \pm 7,30$  para o olho esquerdo e de  $21,97 \pm 5,69$  para o direito, uma diferença considerada significativa ( $p<0,05$ ). Por sua vez, os valores médios de TLS-2 foram de  $10,71 \pm 6,10$  para o olho esquerdo e de  $9,14 \pm 4,78$  para o olho direito, não havendo diferença significativa entre os dois olhos ( $p>0,05$ ).

As diferenças entre os valores médios de TLS-1 e TLS-2 para olho esquerdo e TLS-1 e TLS-2 para olho direito foram significativas ( $p<0,05$ ).

### 5.2. Densidade e Índice de Células Caliciformes Conjuntivais

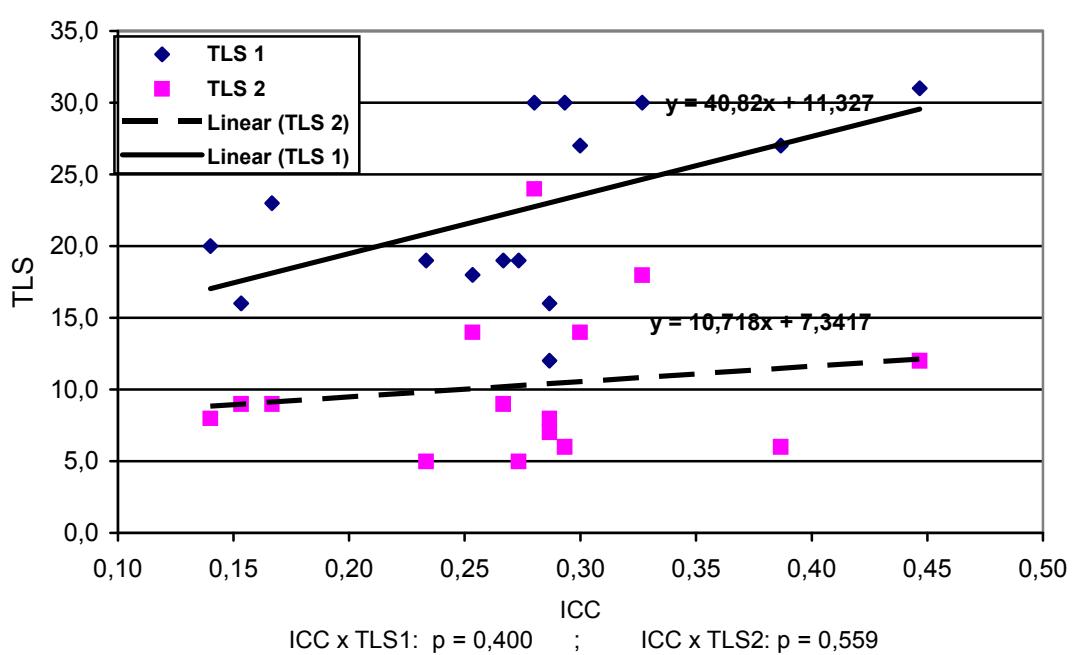
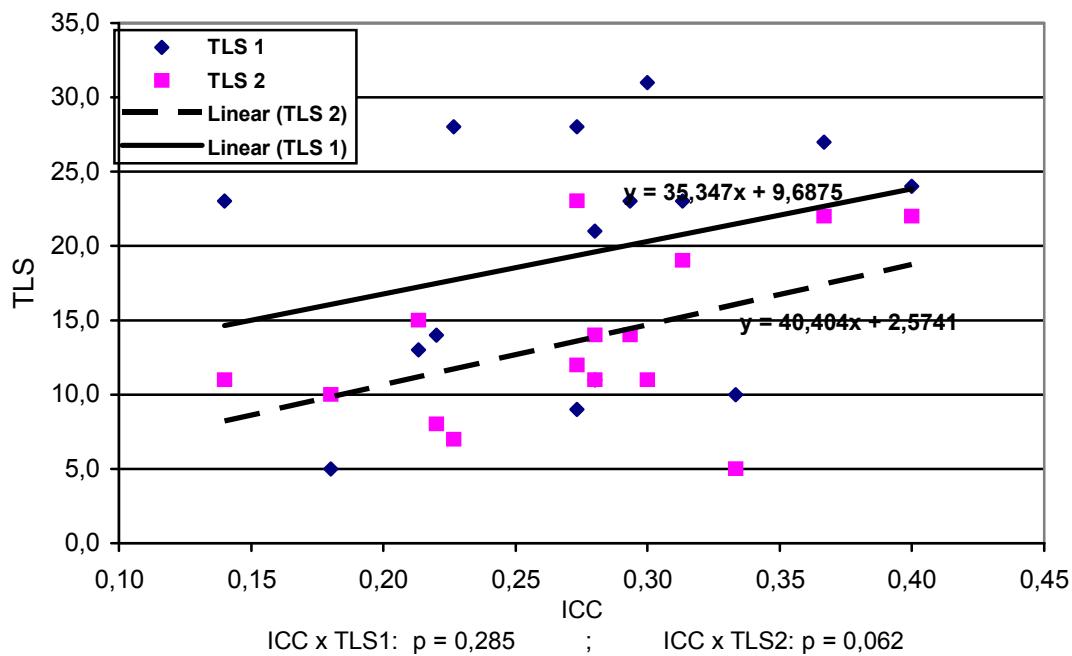
As densidades médias de CC (CC / 50 CE) encontradas nos fragmentos conjuntivais dos animais submetidos à biópsia e à histopatologia conjuntival foram de  $13,64 \pm 3,44$  e  $13,64 \pm 4,07$  para os olhos esquerdo e direito, respectivamente.

O índice médio de CC correspondente foi de  $0,27 \pm 0,069$  para o olho esquerdo e  $0,27 \pm 0,081$  para o olho direito.

Não houve diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo ( $p>0,05$ ), no que diz respeito à densidade ou ao índice de células caliciformes conjuntivais.

### 5.3. Testes lacrimais de Schirmer e Índice de células caliciformes conjuntivais

As Figuras 6 e 7 ilustram a dispersão dos valores dos testes lacrimais de Schirmer 1 e 2 e dos ICCs obtidos para os olhos esquerdo e direito, respectivamente.



A análise de regressão realizada para verificar a influência entre os testes lacrimais de Schirmer 1 e 2 e o índice de células caliciformes constatou que a associação entre os valores de TLS-1 e ICC para o olho esquerdo não foi significativa ( $p=0,285$ ). Os valores de TLS-2 também não influenciaram significativamente os valores de ICC para o olho esquerdo ( $p=0,062$ ).

Para o olho direito, não foi observada influência significativa entre os valores de TLS-1 e ICC ( $p=0,400$ ). Também não foi significativa a associação entre os valores de TLS-2 e ICC para o olho direito ( $p=0,559$ ).

### 5.3. Avaliação Histológica

A avaliação histológica dos fragmentos conjuntivais revelou regiões de epitélio conjuntival estratificado cúbico entremeado de CC (Figura 8). Em 25 (83,3%) lâminas avaliadas foi observada a presença de áreas de metaplasia escamosa, caracterizadas por CE separadas, mais alongadas, e a redução ou ausência das CC (Figura 9). Algumas regiões metaplásicas também apresentaram adelgaçamento da camada epitelial (Figura 10). Em 11 (44%) destas lâminas, foi observado um infiltrado inflamatório mononuclear com predominância de macrófagos nas áreas adjacentes ao epitélio metaplásico (Figura 11).

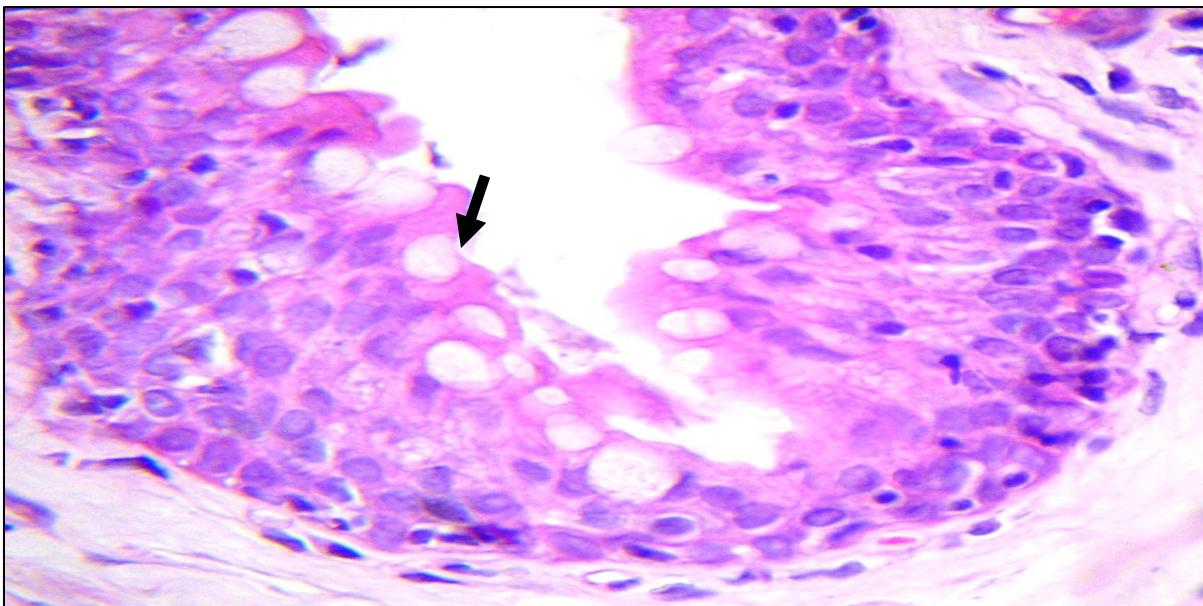


FIGURA 8 – Epitélio estratificado cúbico e células caliciformes (seta) em conjuntiva de cão Shih-tzu. Aumento de 100 x; coloração H&E.

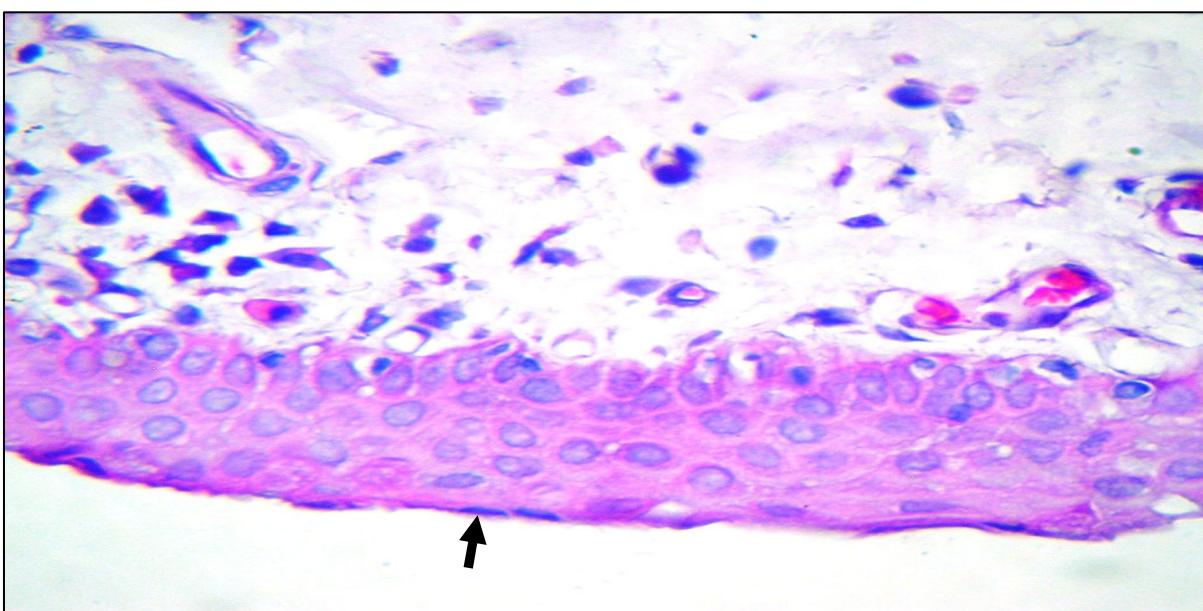


FIGURA 9 – Metaplasia escamosa em epitélio conjuntival de cão Shih-tzu. A seta aponta o núcleo de uma célula epitelial escamosa. Aumento de 100 x; coloração H&E.

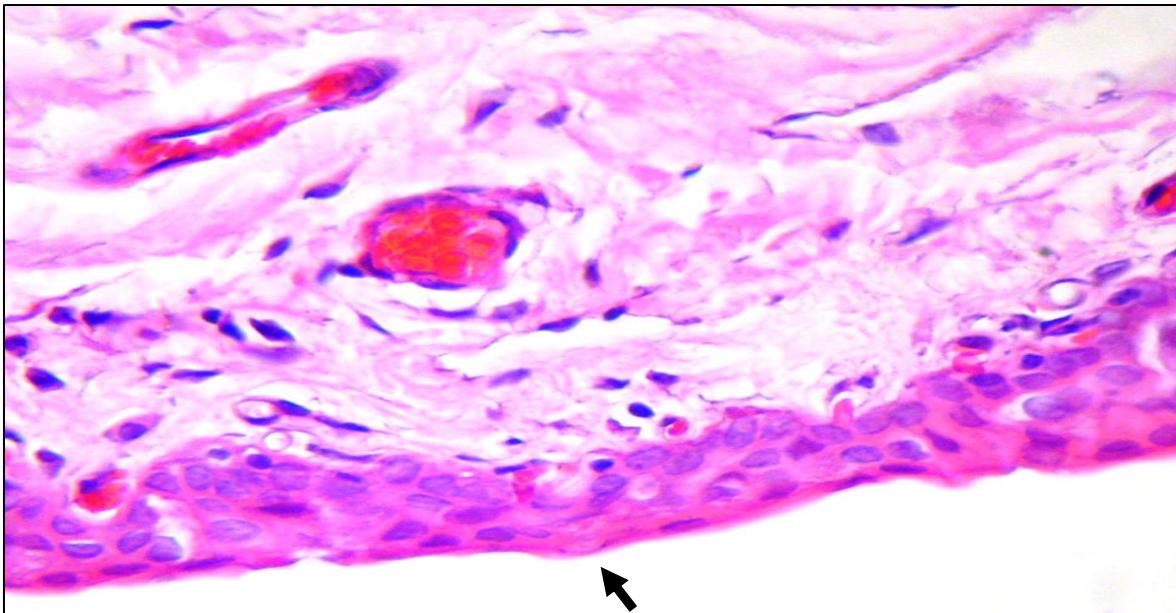


FIGURA 10 – Área de adelgaçamento epitelial (seta) associada a epitélio metaplásico. Aumento de 100 x; coloração H&E.

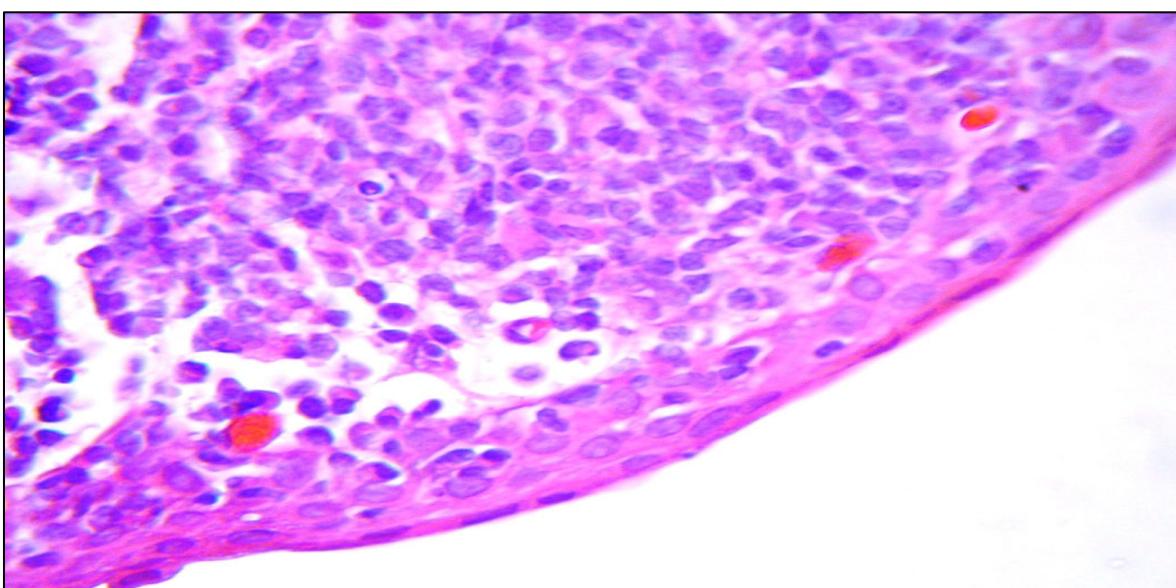


FIGURA 11 – Área de metaplasia escamosa associada a infiltrado inflamatório em conjuntiva de cão da raça Shih-tzu. Aumento de 100 x; coloração H&E.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Testes Lacrimais de Schirmer 1 e 2

O TLS é o método-padrão para quantificar a produção da porção lacrimal aquosa no cão (MOORE & BONAGURA, 2000; WILLIAMS, 2005). Os valores médios de TLS-1 encontrados nos cães Shih-tzu avaliados no presente estudo estão incluídos acima do limite mínimo de 15 mm/min para produção lacrimal proposto por MOORE (1999) para cães hígidos. O valor médio de  $18,8 \pm 2,3$  mm/min para cães Shih-tzu saudáveis encontrado por SAITO & KOTANI (1999) foi semelhante ao observado neste estudo.

Os valores de TLS-1 obtidos neste trabalho de  $19,66 \pm 7,30$  para OE e  $21,97 \pm 5,69$  para OD foram próximos aos descritos por HIRSH & KASWAN (1995), SLATTER (2005) e WYMAN et al. (2005) para cães hígidos adultos, que corresponderam a  $21,3 \pm 3,8$  mm/min,  $19,8 \pm 5,3$  mm/min e  $18,64 \pm 4,47$  mm/min, respectivamente.

Já os mesmos valores, quando comparados com os obtidos por SAITO & KOTANI (2001) e HAMOR et al. (2000) para cães hígidos adultos de variadas raças – de  $20,2 \pm 2,5$  mm/min e  $18,89 \pm 2,62$  mm/min, para a raça Beagle; de  $22,9 \pm 4,1$  mm/min para o Labrador Retriever; de  $21,8 \pm 3,7$  mm/min para o Golden Retriever; e de  $15,8 \pm 1,8$  mm/min para o Pastor de Shetland – foram ora semelhantes, ora diferentes.

Os valores médios de  $10,71 \pm 6,10$  para o olho esquerdo e de  $9,14 \pm 4,78$  para o olho direito, encontrados para o TLS-2 nos cães Shih-tzu estudados, estão dentro do intervalo de valores descrito por GELATT et al. (1975), que foram de  $11,6 \pm 6,1$  mm/min para cães hígidos. O mesmo fato ocorreu quando comparados com aqueles valores obtidos por SAITO & KOTANI (1999), que constataram um TLS-2 médio de  $8,2 \pm 5,4$  mm/min para cães Shih-tzu hígidos.

Os valores médios encontrados para o TLS-1 nos dois olhos foram significativamente maiores que os encontrados para o TLS-2. Esta observação está coerente com o descrito por SAITO & KOTANI (1999) e BEECH et al. (2003), uma vez que o TLS-1 envolve o estímulo de lacrimejamento reflexo, enquanto o TLS-2 estima, provavelmente, a secreção lacrimal basal.

Embora outros anestésicos já tenham sido utilizados para execução do TLS-2 (GELATT et al.; 1975; SAITO & KOTANI, 1999; SAITO et al., 2001; TROST et al., 2007), o protocolo de anestesia da superfície ocular utilizado neste estudo está de acordo com o proposto por LAMBERTS et al. (1979) e BERGER & KING (1998). A escolha do cloridrato de proparacaína a 0,5% para anestesia da superfície ocular foi influenciada pelos seguintes fatores: disponibilidade comercial do fármaco, custo, baixa toxicidade córneo-conjuntival (AMARAL, 2005) e efetividade anestésica para a superfície ocular (OTERO, 2005). Supõe-se que o princípio do fármaco anestésico poderia alterar os valores de TLS-2, entretanto, na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos que avaliassem a produção lacrimal frente ao uso de diferentes colírios anestésicos.

Outros fatores que podem ser responsáveis por variações em valores de TLS-1 e TLS-2 são: temperatura e umidade ambiente, ciclo circadiano, presença ou ausência de gônadas, porte, idade, sexo, uso de fármacos locais e sistêmicos, como atropina, tropicamida, sulfonamidas, quimioterápicos e anestésicos (WILLIAMSON & ALLISON, 1967; SANSON & BARNET, 1985; BARNETT, 1988; KASWAN et al., 1991; HOLLINGSWORTH et al., 1992; BERGER & KING, 1998; MARGADANT et al., 2003; HARTLEY et al., 2006). A fim de minimizar tais fontes de variação, optou-se por realizar o experimento sempre no mesmo ambulatório, no mesmo período (vespertino), em animais não castrados, com idade variando entre dois e cinco anos. A triagem para o uso de fármacos foi realizada por meio de uma anamnese detalhada. Essa anamnese possibilitou a seleção de animais que, segundo seus proprietários, não estavam sobre ação de medicamentos.

MOORE et al. (1987) e CULLEN et al. (2005) não encontraram diferenças significativas entre os valores de TLS-1 e TLS-2 para os olhos esquerdo e direito de cães. Contrariando esses autores, este estudo revelou diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito, quanto aos valores de TLS-1. Não foi possível identificar a causa desta discrepância entre os olhos. Em contrapartida, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de TLS-2 obtidos para os olhos esquerdo e direito.

A comparação dos valores obtidos entre os sexos não foi factível, visto que foram incluídos no experimento apenas dois machos. Tal situação ocorreu

devido à existência não só de um maior número de fêmeas nos canis visitados, como também ao número de machos com lesões corneanas não selecionados para o estudo.

## 6.2. Densidade e Índice de Células Caliciformes

A quantificação das células caliciformes conjuntivais fornece uma mensuração indireta da produção de mucina, considerada um sensível indicador da higidez da superfície ocular (MOORE et al., 1987; KJNOSHITA et al., 1983). CULLEN et al. (2005) encontraram uma DCC média de 28 células caliciformes para 50 epiteliais para cães hígidos, valor muito superior ao observado para os cães Shih-tzu avaliados no presente estudo.

Com o objetivo de demonstrar a heterogeneidade da distribuição de células caliciformes na conjuntiva canina, MOORE et al. (1987) obtiveram um índice médio de  $0,29 \pm 0,043$  no fórnice nasal ventral de cães hígidos da raça Beagle, valores que se aproximam dos encontrados para os cães Shih-tzu estudados. Contudo, MOORE et al. (1987) relataram diferenças significativas entre o ICC no fórnice conjuntival nasal ventral para os dois sexos, com valores médios de  $0,26 \pm 0,027$  para machos e de  $0,33 \pm 0,015$  para fêmeas. No presente estudo, especificamente para as fêmeas, foram obtidos ICC de  $0,28 \pm 0,07$  para o olho esquerdo e de  $0,27 \pm 0,08$  para o olho direito. Estes valores estão significativamente inferiores aos descritos por MOORE et al. (1987) para cadelas hígidas da raça Beagle. A comparação do ICC entre os sexos não foi possível neste experimento, visto que não houve amostra representativa para machos.

MOORE et al. (1987) e CULLEN et al. (2005) não avaliaram o ICC de olhos esquerdo e direito separadamente. Tal avaliação foi realizada no presente trabalho, sendo identificada a ausência de diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo em relação ao ICC.

Embora pouco se saiba sobre os fatores que influenciam a densidade e distribuição das células caliciformes conjuntivais, o grau de hidratação conjuntival foi apontado por MOORE et al. (1987) como um fator exógeno relevante. Corroborando com esta observação, há estudos que demonstram uma relação

direta entre a ceratoconjuntivite seca e a diminuição da densidade de células caliciformes (RALPH, 1975; MOORE et al., 2001). Apesar de a produção lacrimal observada nos cães Shih-tzu estudados estar dentro dos padrões de normalidade, supõe-se que a evaporação do filme lacrimal que recobre a superfície ocular ocorra mais rapidamente nestes cães, devido à exoftalmia e lagoftalmia características da raça. Tal condição poderia levar à deficiência de hidratação conjuntival e promover diminuição do número de células caliciformes.

Em contrapartida, a deficiência de células caliciformes leva à redução da produção da camada mucosa do filme lacrimal pré-ocular, a qual, segundo DAVISON & KUONEN (2004), age como interface entre o epitélio corneano hidrofóbico e o fluido lacrimal aquoso. Portanto, uma produção deficiente de mucina pré-ocular poderia aumentar ainda mais a evaporação lacrimal, agravar a desidratação da superfície ocular e predispor os cães Shih-tzu ao desenvolvimento de afecções córneo-conjuntivais.

### 6.3. Testes lacrimais de Schirmer 1 e 2 e Índice de células caliciformes

Neste trabalho, a influência dos valores dos testes lacrimais Schirmer sobre os valores de ICC não foi estatisticamente significativa, constatação que corrobora com KIM et al. (1992), que não observaram uma correlação significativa entre valores de TLS e DCC em humanos hígidos.

Todavia, é possível afirmar, por meio da observação das Figuras 6 e 7, que existe uma associação crescente entre os valores de TLS-1 e ICC para os olhos esquerdo e direito, bem como para os valores de TLS-2 e ICC. Tal associação foi identificada por RALPH (1975), MOORE et al. (1987) e MOORE et al. (2001), que apontaram o grau de hidratação conjuntival como um fator contribuidor para a variação da DCC. Diante destas observações, sugere-se que a falta de associação significativa entre as variáveis pode ter ocorrido devido ao tamanho reduzido da amostra ( $n=15$ ), como também ao fato de que outros fatores poderiam estar relacionados às variações do número de CC em cães da raça Shih-tzu. Dentre eles podem-se citar a evaporação precoce do filme lacrimal pré-

ocular e a presença de agentes agressores, como irradiação solar, contaminantes ambientais e pêlos perioculares em contato com o epitélio conjuntival.

#### 6.4. Avaliação Histológica

A avaliação histológica da conjuntiva dos cães Shih-tzu estudados revelou a presença de epitélio estratificado cúbico entremeado de células caliciformes, observação que corrobora a descrição de SAMUELSON (1999) para o fórnice conjuntival de cães hígidos. Contudo, áreas de metaplasia escamosa foram encontradas na maioria dos fragmentos avaliados. A metaplasia escamosa do epitélio conjuntival foi caracterizada por NELSON & WRIGHT (1984) e TSENG (1985) pela presença de células epiteliais separadas, mais alongadas, com citoplasma abundante, núcleos picnóticos ou ausentes e redução ou ausência das células caliciformes. No presente estudo, as áreas de metaplasia identificadas apresentaram características semelhantes às descritas pelos autores supracitados.

De acordo com FARIA (2003), a metaplasia é ocasionada por mudança do meio ou por ação de estímulos anormais. Esses estímulos são duradouros e podem ter caráter mecânico, inflamatório, hormonal, ou químico. SLATTER (2005) definiu a metaplasia conjuntival como uma adaptação protetora, na qual o epitélio transforma-se em escamoso estratificado e, algumas vezes, queratinizado, em resposta à irritação crônica. TSENG et al. (1984) sugeriram que a presença de fatores introduzida pelo processo inflamatório na mucosa pode favorecer o surgimento de alterações epiteliais na superfície ocular. LIM & CULLEN (2005) associaram a presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntival canino à metaplasia escamosa e à redução do número de células caliciformes. A presença de infiltrado inflamatório em áreas adjacentes ao epitélio metaplásico foi observada neste trabalho.

Supõe-se que alguns fatores poderiam favorecer o desenvolvimento de metaplasia no epitélio conjuntival de cães da raça Shih-tzu, tais como a exposição acentuada da conjuntiva ao ambiente externo e seus agentes agressores devido à exoftalmia apresentada pela raça. CARRINGTON et al. (1989) constataram que a

exoftalmia promove acúmulo da mucina ao longo da margem palpebral inferior e o deslocamento de debríss e contaminantes para o fórnix conjuntival ventral.

A exoftalmia também contribuiria para evaporação prematura do filme lacrimal, favorecendo a desidratação da superfície ocular e o desenvolvimento de lesões nesta (CARRINGTON et al., 1989; MOORE, 1999; WOERDT, 2004). Segundo KUNERT et al. (2004), com a progressão das injúrias provocadas pelo olho seco, o número de células caliciformes tende a diminuir drasticamente, resultando em metaplasia escamosa, em aumento da área epitelial e em ocasional queratinização do epitélio conjuntival (MOORE et al., 2001; KUNERT et al., 2002). No presente estudo, não se observou queratinização do epitélio conjuntival, tampouco aumento da área epitelial, mas o adelgaçamento do epitélio conjuntival, em associação a algumas áreas de metaplasia escamosa.

De acordo com SEO et al. (2004), a presença de pêlos em contato com a superfície ocular de cães pode provocar lacrimejamento, conjuntivite e ceratite pigmentar. Existe a possibilidade de que a agressão ao tecido conjuntival provocada pelos pêlos perioculares em cães Shih-tzu poderia favorecer o desenvolvimento do processo inflamatório e da metaplasia escamosa na conjuntiva destes animais.

Avaliações microbiológicas da superfície ocular, do tempo de ruptura do filme lacrimal em cães da raça Shih-tzu e do epitélio conjuntival em cães braquicefálicos de pelo curto podem ser convenientes, a fim de elucidar a influência de fatores, como a exoftalmia e a presença de pêlos perioculares, no desenvolvimento de alterações do epitélio conjuntival em cães Shih-tzu.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nas avaliações da produção lacrimal, da densidade de células caliciformes conjuntivais, pode-se concluir que:

- Os valores do TLS 1 e 2 para os cães Shih-tzu avaliados estão dentro do padrão de produção lacrimal normal descrito na literatura consultada para cães hígidos de outras raças.
- A DCC e o ICC conjuntivais obtidos para os cães Shih-tzu avaliados são inferiores aos valores descritos na literatura consultada para cães hígidos de outras raças.

## REFERÊNCIAS

1. AMARAL, A.V.C. **Estudo clínico e histológico das pálpebras, conjuntiva e córnea hígidas submetidas a tratamento local com soluções anestésicas em coelhos.** 2005. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
2. ASHUTOSH, S. Energies of corneal epithelial cell-ocular mucus-tear film interactions: some surface-chemical pathways of corneal defense, **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 47, p. 87-99, 1993.
3. BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M.R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. **Experimental eye research**, London, v.79. p.613-621, 2004.
4. BARNETT, K.C. Keratoconjunctivitis sicca: sex incidence. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, n.29, p.531-534, 1988.
5. BEECH, J.; ZAPPALA, R. A.; SMITH, G.; LINDBORG, S. Schirmer tear test results in normal horses and ponies: effect of age, season, environment, sex, time of day and placement of trips. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.6, n. 3, p.251-254, 2003.
6. BERGER, S.L.; KING, V.L. The Fluctuation of Tear Production in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Ithaca, v.34, p.79-83, 1998.
7. BERGER, S.; SCAGLIOTTI, R.; LUND, E.M. A quantitative study of the effects of Tribriksen on canine tear production. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.31, p.236-241, 1995.
8. BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; DIQUELOU, A.; GUILLOT, E.; REGNIER, A.; TRUMEL, C. Comparison of cytologic and histologic evaluations of the conjunctiva in the normal equine eye. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.10, n.1, p.12-18, 2007.
9. BRANDÃO, C.V.S; RANZANI; J.J.T.; MARINHO; L.F.L.P.; RODRIGUES, G. N.; CREMONINI, D.N.; PEIXOTO, T.P.; LIMA, L.S.A.; CHIURCIU, J. L. V. **Análise retrospectiva de 45 casos de proptose em cães (1998-2003).** In: 8<sup>a</sup> Mostra Científica. 2004. Botucatu-SP. [on line]. Botucatu: FMVZ - UNESP, 2004. Disponível em: [www.fmvz.unesp.br/cursos/8aMostra/anais/Clinica\\_e\\_Cirurgia\\_Animal/CCA04.htm](http://www.fmvz.unesp.br/cursos/8aMostra/anais/Clinica_e_Cirurgia_Animal/CCA04.htm). Acesso em: 03 mai.2006.
- 10.BRON, A. J., TIFFANY, J. M. The Meibomian glands and tear film lipids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 438, p. 281-295, 1998.

11. CARRINGTON, S.D.; BEDFORD, P.G.; GUILLON, J.P.; WOODWARD, E.G. Biomicroscopy of the tear film: the tear film of the Pekingese dog. **The veterinary record**, London, v.124, n.13; p.323-328. 1989.
12. CORFIELD, A. P., CARRINGTON, S. D., HICKS, S. J. Ocular mucine purification, metabolism and functions. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 16, p. 627-656, 1997.
13. CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA. **Shih-tzu**. [on line]. Disponível em: [www.cbck.org](http://www.cbck.org). Acesso em: 16 out. 2007.
14. CRISPIN, S. M. Tear-deficient and evaporative dry eye syndromes of the horse. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.3, p.87-92, 2000.
15. CHRISTMAS, R.E. Common ocular problems of Shih-tzu dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, Ontario, v.33, 390-393, 1992.
16. CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; MACCARVILLE, C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, N.8, v.4, p.215-224, 2005.
17. CULLEN, C.L.; NJAA, B.L.; GRAHN, B.H. Ulcerative keratitis associated with qualitative tear film abnormalities in cats. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, n.2, p.197-204, 1999.
18. CULLEN, C.L.; GRAHN, B.H. Diagnostic ophthalmology. **The Canadian veterinary journal**, Ghelph, v.44, p.761-763; 2003.
19. DAMASCENO, A. D.; CHAVES, N. S. T. **Neurooftalmologia de pequenos animais**. Goiânia: Editora UFG, 2003, 68 p.
20. DAVIDSON, H. J., KUONEN, V. J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.7, n.2, p.71-77, 2004.
21. DRIVER, P. J., LEMP, M. A. Meibomian gland dysfunction. **Survey of Ophthalmology**, New York, v.40, p.343-363, 1996.
22. FARIA, J.L. **Patologia geral: Fundamentos das doenças, com aplicações clínicas**. 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 298 p.
23. FEDERAÇÃO CINOLÓGICA INTERNACIONAL. Shih-tzu. [on line]. Disponível em: <http://www.fci.be/>. Acesso em 4 jan. 2008.
24. GELATT, K.N.; PEIFFER, R.L.; ERICKSON, J.L.; GUM, G.G. Evaluation of tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.166, p.368-370, 1975.

25. GERMAN, A. J., HALL, F. J., DAY, M. J. Measurement of IgM, IgG e IgA concentration in canine serum, saliva, tears and bile. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 64, p. 107-121, 1998.
26. HAMOR, R.E.; ROBERTS, S.M.; SEVERIN, G.A.; CHAVKIN, M..J. Evaluation of results for Schirmer tear tests conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, n.61, p.1422-1425, 2000.
27. HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.9, n.1, p.53-57, 2006.
28. HIRSH, S.G.; KASWAN, R.L. A comparative study of Schirmer tear test strips in dogs. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, Oxford, v.5, p.215–217, 1995.
29. HOLLINGSWORTH, S.R.; CANTON, D.D.; BUYUKMIHCI, N.C.; FARVER, T.B. Effect of topically administered atropine on tear production in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.200, p.1481-1484, 1992.
30. KASWAN, R.L.; MARTIN, C.L.; DAWE, D.L. Rheumatoid factor determination of 50 dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca. v.183, p.1073-1075, 1983.
31. KASWAN, R.L.; MARTIN, C.L.; DAWE, D.L. Keratoconjunctiva sicca. Immunological Evaluation of 62 canine cases. **American journal of Veterinary Research**, Chicago, n.46, p. 376-383, 1985.
32. KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A. A new perspective of canine keratoconjunctivitis sicca. Treatment with ophthalmic cyclosporine. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**. Philadelphia, v.20, p.583-613, 1990.
33. KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A.; LOTTHROP, C.D. Interaction of age and gender on occurrence of canine keratoconjunctivitis sicca. **Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology**, Oxford, n.1, p.93-97, 1991.
34. KIM, S.D.; KIM, J.K.; HAN, H.K. Normal Conjunctival Goblet Cell Density in Korean Measured by Impression Cytology. **Journal of Korean Ophthalmology Society**, v.33, n.5, p.427-435, 1992.
35. KING-SMITH, P. E., FINK, B. A., FOGL, N. The thickness of the tear film: evidence from reflection spectra. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.41, p.3348-3359, 2000.

- 36.KINOSHITA, S.; KIORPES, T.C.; FRIEND, J.; THOFT, R.A. Goblet cell density in ocular surface disease: A better indicator than tear mucin. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, n.101, p.1284, 1983.
- 37.KOCH, D.A.; HUBLER, A.S.M., MONTAVON, P.M. Brachycephalic syndrome in dogs. **Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian**, Princeton, v.25, n.1, p.48-54. 2003.
- 38.KUNERT, S.K.; TISDALE, A.S.; GIPSON. I.K. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, V.20, p. 330-337, 2002.
- 39.LAMBERTS, D. W. Physiology of the tear film. In: SMOLIN, G. THOFT. **The Cornea**. New York: Little Brown & Co, 1994, p.439-455.
- 40.LAMBERTS, D.W.; FOSTER, C.S.; PERRY, H.D. Schirmer test after topical anesthesia and the tear meniscus height in normal eyes. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.97, n.6, p.1082-1085, 1979.
- 41.LIM, C.C.; CULLEN, C.L. Schirmer tear test values and tear film break-up times in cats with conjunctivitis. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.8, n.5, p.305-310, 2005.
- 42.LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: Mc Graw Hill, 1968. 258 p.
- 43.MARGADANT, D.L.; KIRKBY, K.; ANDREW, S.E.; GELATT, K.N. Effect of topical tropicamide on tear production as measured by Schirmer's tear test in normal dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, V.6, N.4, P.315-320, 2003.
- 44.MCKENZIC, R. W., JUMBLATT, J. E., JUMBLATT, M. M. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.41, p.703-708, 2000.
- 45.MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, cap.16, p.583-607.
- 46.MOORE, C.P.; BONAGURA, J.D. Keratoconjunctivitis sicca. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice**, Philadelphia: WB Saunders, 2000, p.1061–1066.
- 47.MOORE, C.P.; COLLIER, L.L. Ocular surface disease associated with loss of conjunctival goblet cells in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.26, 458–466; 1990.

48. MOORE, C.P.; MCHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. Effect of Cyclosporine on conjunctival mucin in a canine Keratoconjunctivitis sicca model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.42, p.653-659, 2001.
49. MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V.; MAJORS, L.J.; COLLIER, L.L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. **Investigative ophthalmology and visual science**, St. Louis, v.28, p.1925-1932, 1987.
50. MORGAN, R.V.; DUDDY, J.M. MCCLUG, K. Prolapse of the gland of the third eyelid in dogs. A retrospective study of 89 cases (1980-1990). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.29, p.56-60, 1993.
51. NELSON, J.D.; WRIGHT, J.C. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disorders. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.102, p.1049-51, 1984.
52. NELSON, W.A. Lower Respiratory System. In: SLATTER, D.H. **Texto de Cirugía de los Pequeños Animales**, 2<sup>a</sup> ed. Barcelona: Editorial Masson, 1989, p.777-804.
53. OROZCO, S.C.; GÓMEZ, L.F. Manejo médico y quirúrgico del síndrome de las vías aéreas superiores del braquicéfalo. Reporte de un caso. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Medellín, v.16: n.2, 2003.
54. OTERO, P.E. **Dor: Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. 1<sup>a</sup> ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2005; 293 p.
55. PRYDAL, J. L., ARTAL, P., WOON, I I., CAMPBELL, F. W. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.22, p. 2006-2011, 1992.
56. PRYDAL, J. L., CAMPBELL, F. W. Study of precorneal tear thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.33, p.1996-2005, 1992.
57. RALPH, R.A. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. **Investigative Ophthalmology**, St. Louis, v.14, p.299, 1975.
58. RIOS, J. D., FORDE, K., DIEBOLD, Y. Development of conjunctival goblet cells and their neuroreceptor subtype expression. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 24, p. 570-576, 1983.
59. SAITO, A.; KOTANI, T. Tear production in dogs with epiphora and corneal epitheliopathy. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.2, p.173-178. 1999.
60. SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.1, p.7-11, 2001.

61. SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221 p.
62. SAMUELSON, D.A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**, 3 ed, Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1999; p.31–150.
63. SANSON, J.; BARNETT, K.C. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, n.26, p.121-131, 1985.
64. SEO, K.; Yi, N.; Kim, W.; Jeong, M.; Jeong, S.; Kim, S.; Nam, T. Medial canthoplasty for epiphora in dogs: 13 cases. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 7, p. 432, 2004.
65. SHERMAN, M.I. Evidence that retinoids control epithelial differentiation. In: SHERMAN, M.I. **Retinoids and cell differentiation**. Boca Raton: CRC Press, 1986, p.30-51.
66. SIMONAZZI, B.; ZANICHELLI, S. Studio retrospettivo sull'utilizzo della tecnica pocket nella correzione del prolasso della ghiandola della terza palpebra nel cane. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma**, Parma. v.22, p.283 – 293, 2002.
67. SISSON, S. Osteologia do carnívoro. In: SISSON, S.; GROSSMAN. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p.1337-1415.
68. SLATTER, D. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders company, 2001, 640 p.
69. SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3 ed. São Paulo: Editora Roca, 2005. 686 p.
70. SULLIVAN, D. A., ROCHA, E. M., ULLMAN, M. D. Androgen regulation of the meibomian gland. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 438, p. 327-331, 1998.
71. TOLAR, E.L.; HENDRIX, D.V.; ROHRBACH, B.W.; PLUMMER C.E.; BROOKS, D.E.; GELATT, K.N. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993-2003). **Journal American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.228, n.1, p.80-85, 2006.
72. 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**, Oxford, v.3, n.10, p.143-146, 2007.

73. TSENG, S.C.G. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.92, p.728-33, 1985.
74. TSENG, S.C.; HIRST, L.W.; MAUMENE, A.E.; KENYON, K.R.; SUN, T.T.; GREEN, W.R. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. **Ophthalmology**, Philadelphia, V. 91, N.6, P.545-552, 1984.
75. WILLIAMS, D.L. Analysis of tear uptake by the Shirmer tear test strip in the canine eye. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.8, n.5, p. 325-330, 2005.
76. WILLIAMSON, J.; ALLISON, M. Effect of temperature and humidity in the Schirmer tear test. **The British Journal of Ophthalmology**, London, n.51, p.596, 1967.
77. WOERDT, A.V.D. Adnexal surgery in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.7, n.5, p.284-290; 2004.
78. WYMAN, M.; GILGER, B.; MUELLER, P. Clinical evaluation of a new Schirmer tear test in the dog. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, Oxford, v.5, p.211–214, 1995.

## ANEXOS

**TABELA 1**-Valores de TLS-1, TLS-2, Densidade de células caliciformes (DCC) e Índice de células caliciformes (ICC) nos olhos esquerdos (OE) e direitos (OD) de cães da raça Shih-tzu.

Shih-tzu	TLS-1(mm/min)		TLS-2 (mm/min)		DCC (CC/50 CE)		ICC	
	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD
1	23	27	14	6	14,667	19,333	0,2933	0,3867
2	5	18	10	14	9	12,667	0,18	0,2533
3	13	20	15	8	10,667	7	0,2133	0,14
4	9	16	23	9	13,667	7,6667	0,2733	0,1533
5	21	19	14	9	14	13,333	0,28	0,2667
6	23	30	19	24	15,667	14	0,3133	0,28
7	11	19	11	5	14	13,667	0,28	0,2733
8	31	31	11	12	15	22,333	0,3	0,4467
9	10	23	5	9	16,667	8,3333	0,3333	0,1667
10	7	16	10	9	—	—	—	—
11	13	22	13	12	—	—	—	—
12	19	22	2	5	—	—	—	—
13	11	9	2	7	—	—	—	—
14	21	21	6	14	—	—	—	—
15	18	28	3	16	—	—	—	—
16	27	24	5	7	—	—	—	—
17	28	26	4	10	—	—	—	—
18	21	27	9	2	—	—	—	—
19	8	21	4	10	—	—	—	—
20	25	22	15	6	—	—	—	—
21	21	20	24	11	—	—	—	—
22	22	27	8	8	—	—	—	—
23	20	15	5	5	—	—	—	—
24	27	29	7	14	—	—	—	—
25	24	23	9	2	—	—	—	—
26	29	20	13	2	—	—	—	—
27	23	17	10	7	—	—	—	—
28*	10	14	5	5	—	—	—	—
29	14	16	8	8	11	14,333	0,22	0,2867
30	28	19	12	5	13,667	11,667	0,2733	0,2333
31	27	12	22	7	18,333	14,333	0,3667	0,2867
32*	28	27	7	14	11,333	15	0,2267	0,3
33	24	29	17	14	—	—	—	—
34	23	30	11	18	7	16,333	0,14	0,3267
35	24	30	22	6	20	14,667	0,4	0,2933

\*Cães machos

TABELA 2 – Teste de comprovação de normalidade de cada uma das variáveis

Variável	n	média	Desvio Padrão	z	P
TL1_OE	35	19,66	7,30	1,023	0,246
TL1_OD	35	21,97	5,69	0,745	0,636
TL2_OE	35	10,71	6,10	0,650	0,792
TL2_OD	35	9,14	4,78	0,831	0,494
DCC_OE	15	13,64	3,44	0,655	0,783
DCC_OD	15	13,64	4,07	0,657	0,781
ICC_OE	15	0,273	0,069	0,655	0,783
ICC_OD	15	0,273	0,081	0,657	0,781