

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Comparação de Quatro Diferentes Testes Quantitativos**  
**de Produção Lacrimal em Cães Domésticos**

**Leandro Nogueira e Silva**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Padronização e Comparação de Três Diferentes Testes Quantitativos**  
**de Produção Lacrimal em Cães Domésticos**

**Leandro Nogueira e Silva**

Sob a orientação do Professor

**João Telhado Pereira**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina veterinária, Área de Concentração em Ciência Clínicas

Seropédica, RJ

2010

Dedico esta dissertação a minha namorada Camila, por toda felicidade que me traz e estar sempre ao meu lado me incentivando e apoiando nesta jornada, sem a qual esta realização não seria possível. Todo meu amor!

Aos meus pais Paulo e Luzia, por todo apoio que me deram ao longo de minha formação e por continuarem a ser o meu exemplo.

Ao meu orientador e amigo João Telhado, por acreditar em mim e me mostrar a oftalmologia contribuindo de forma importante para minha formação profissional. Meu sincero muito obrigado!

### Agradecimento:

A Dra. Andrea Kunner a qual contribuiu em muito para a idealização e concretização deste experimento.

Ao Químico Wagner do Laboratório de Química Analítica, pela importante ajuda no desenvolvimento e produção dos testes com fio e indicador de pH e análise dos resultados.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica por ceder os animais que participaram do experimento e pelo apoio dado pelas pessoas que deste fazem parte.

Aos professores e coordenadores do curso de Mestrado em Medicina Veterinária Rita Botteon e Paulo Botteon, por todo apoio e orientação.

## **RESUMO:**

Silva, Leandro Nogueira. **Comparação de quatro diferentes testes quantitativos de produção lacrimal em cães domésticos**, Seropédica: UFRRJ, 2010 nº p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária)

Em relação à mensuração da produção lacrimal, a técnica de leitura lacrimal com o fio de algodão embebido em uma solução indicadora de pH vem se mostrando vantajosa em relação ao Teste Lacrimal de Schirmer I (TLS I) em diversos estudos, devido à menor largura do material de teste e tempo de realização deste, o que leva a uma menor produção lacrimal reflexa e uma leitura mais próxima da produção lacrimal basal ou real. Este experimento teve como objetivos, testar diferentes tipos de fios e avaliar qual o mais indicado a realização dos testes, desenvolver um material de medição quantitativo da produção lacrimal de fio impregnado com vermelho fenol, testar outro indicador de pH, estabelecer um padrão de leitura para estes e o ZoneQuick® da Menicon e compará-los ao TLS I avaliando suas vantagens e desvantagens. Para isto, foram selecionados 50 cães da raça Beagle, machos e fêmeas, com idade variando de 1 a 8 anos do Canil do Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica da UFRRJ, e produzidos dois testes com Fio de Algodão impregnados com Vermelho Fenol ou Verde de Bromocresol. Em seguida foi feita a padronização da leitura dos três testes em comparação ao TLS I, obtendo-se como faixa normal de leitura para o Teste de Fio de Algodão com Vermelho Fenol de 13,6 a 22,7 mm/15seg., o ZoneQuick® da Menicon entre 22,7 e 37,8mm/15seg. e o Teste de Fio de Algodão com Verde de Bromocresol de 13,7 a 22,8 mm/15 seg.. Dentre os três testes, o ZoneQuick® apresentou a menor viragem na cor do indicador e o Teste de Fio de Algodão com Verde de Bromocresol a maior o que, juntamente com o menor erro padrão por este apresentado, facilita sua leitura e reduz a chance de falso positivo ou negativo. Na etapa de comparação entre os TLS I, Fio de Algodão com Verde de Bromocresol e Fio de Algodão com Vermelho Fenol este último gerou menor produção lacrimal reflexa, com uma leitura mais próxima da real.

Palavras Chaves: Cão, Sistema Lacrimal, Testes Quantitativos de Produção Lacrimal

## **ABSTRACT:**

Silva, Leandro Nogueira. **Standardization and comparison of three different quantitative tests of tear production in dogs**, Seropédica: UFRRJ, p. 2010 (Thesis, Master of Veterinary Medicine)

Regarding the measurement of tear production, the technique of reading tear with a cotton soaked in a pH indicator solution has proven to be advantageous compared to Schirmer Tears Test in many studies due to the smaller width of the test material and time for attaining this, which leads to less reflex tear production and a closer reading of basal tear production or real. This experiment aimed to develop a quantitative measurement equipment in tear production similar to the ZoneQuick® Menicon and improve it, establish a pattern of reading to those and evaluate their advantages and disadvantages. For that, we selected 50 beagle dogs, male and female, aged 1-8 years from the Canil do Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica of UFRRJ, and produced two tests with Cotton Thread with Phenol Red and Bromocresol Green. Afterwards was made the reading standardization of those three tests compared to the Schirmer tear test, getting as normal range of reading for the tests with Cotton Thread with Phenol Red 13.6 to 22.7 mm/15seg., the ZoneQuick® Menicon of between 22, 7 and 37.8 mm/15seg. and tests with Cotton Thread with the Bromocresol Green 13.7 to 22.8 mm/15seg.. Among those three tests, the ZoneQuick® showed the smallest shift in color of the indicator and the largest Cotton Thread with the Bromocresol Green which along with the smaller standard error presented by this facilitates its reading and reduces the chance of false positive or negative. In a comparison between the Schirmer Tears Test, Cotton Thread with the Bromocresol Green tests and Cotton Thread with Phenol Red latter, generated less reflex tear production, with a reading closer to the real.

Key words: Dog, Lacrimal System, Production Testing Quantitative Lacrimal



## **Lista de Figuras:**

Figura 1: Mostra a viragem na coloração do amarelo para o vermelho no Teste com Fio de Algodão com Vermelho Fenol em um Beagle, p. 16.

Figura 2: Mostra a dificuldade de visualização na viragem da cor durante a realização do Teste ZoneQuick®, p.17.

Figura 3: Mostra a viragem na coloração do Verde para o Azul no Teste de Leitura Lacrimal com Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, p. 18.

## **Lista de Gráficos:**

Gráfico nº 1: Valores de Leituras Mínimos e Máximos, Média Aritimética e Desvio Padrão obtidos com os dados da padronização dos Testes Lacrimal de Schirmer, ZoneQuick®, Fio de Algodão com Vermelho Fenol e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 19.

Gráfico nº 2 : Percentual da ocorrência de viragem na coloração visível a olho nu dos fio impregnados com indicador de pH usados no estudo, ZoneQuick®, Teste de fio de algodão com Vermelho Fenol e de Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, durante a realização destes teste em cães da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica 2010, p. 24.

Gráfico nº 3: Valores mínimos e máximos, média aritmética e desvio padrão, obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(1º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (1º dia), e Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(2º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (2º dia)em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 25.

Gráfico nº 4: Diferença entre as médias aritméticas das leituras dos (1) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(1º dia), (2) Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (1º dia), e (3) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(2º dia), (4) Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (2º dia) em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 26.

Gráfico nº 5: Valores mínimos e máximos, média aritmética e desvio padrão, obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(1º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (1º dia), e Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(2º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (2º dia)em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 28.

Gráfico nº 6 : Diferença entre as médias aritméticas das leituras dos (1) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(1º dia), (2) Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (1º dia), e (3) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito(2º dia), (4) Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (2º dia) em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 29.

## **Lista de Tabelas:**

Tabela 1: Resultado do testes in vitro das amostras de fio de a serem usados nos testes quantitativos de produção lacrimal em Beagles, UFRRJ, Seropédica 2009, p. 15.

Tabela nº 2 : Tamanho da amostra, valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação obtidos na padronização dos Testes Lacrimal de Schirmer, ZoneQuick®, Fio de Algodão com Vermelho Fenol e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 20.

Tabela nº 3 : Tamanho da amostra, valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação obtidos na análise em conjunto das leituras de ambos os olhos direito (OD) e esquerdo (OE) na etapa de padronização, em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p. 21.

Tabela 4: Padronização da avaliação dos resultados obtidos com o Teste Lacrimal de Schirmer, ZoneQuick®, Teste com fio de algodão e Vermelho Fenol, e Teste com fio de algodão com Verde de Bromocresol, p. 23.

Tabela nº 5: Tamanho da amostra, valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimais em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010, p.25.

Tabela nº 6: Tamanho da amostra, valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimais em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010. p.28.

## **Lista de Abreviaturas e Siglas:**

TLS: Teste Lacrimal de Schirmer

TFAVF: Teste de Fio de Algodão Com Vermelho Fenol

TFAVB: Teste de Fio de Algodão Com Verde de Bromocresol

LQA: Laboratório de Química Analítica

LQEP: Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica

UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO:

DEDICATÓRIA-----	III
AGRADECIMENTOS -----	VI
RESUMO -----	VII
ABSTRACT -----	VIII
LISTA DE FIGURAS -----	IX
LISTA DE GRÁFICOS -----	X
LISTA DE TABELAS -----	XI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS -----	XII
1. INTRODUÇÃO -----	2
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	3
2.1. Filme Lacrimal -----	3
2.1.1. Camada Lipídica -----	3
2.1.2. Camada Aquosa -----	3
2.1.3. Camada Mucosa -----	4
2.2. Dinâmica do Filme Lacrimal -----	5
2.3. Avaliação Quantitativa do Filme Lacrimal -----	6
2.3.1. Teste Lacrimal de Schirmer -----	6
2.3.2. Teste de Fio com Vermelho Fenol -----	6
2.4. Exame do Aparelho Excretor -----	7
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	8
3.1. Animais -----	8
3.2. Laboratórios -----	8
3.3. Material utilizado -----	8
3.3.1. Fios-----	8
3.3.2. Testes Quantitativos Comerciais -----	8
3.3.3. Soluções Indicadoras de pH e Tampão -----	9
3.3.4. Outros Materiais -----	9
3.4. Métodos -----	9
3.4.1. Seleção dos Fios -----	9
3.4.2. Preparação das Soluções de Vermelho Fenol-----	9
3.4.3. Preparação dos Fios Impregnados com Vermelho Fenol-----	10
3.4.4. Testes <i>in vitro</i> -----	10
3.4.5. Preparação das Soluções de Verde de Bromocresol-----	11
3.4.6. Preparação dos Fios para o Testes <i>in vivo</i> -----	11
3.4.7. Teste dos Fios Impregnados <i>in vivo</i> -----	11
3.4.8. Comparação entre os Quatro Testes -----	12
3.4.9. Avaliação Comparativa do Efeito Sobre a Produção Lacrimal Reflexa Gerada pelos TLS, TFAVF e TFAVB -----	12
3.4.10. Comissão de Ética-----	13
3.4.11. Análise Estatística-----	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	13
4.1. Seleção dos Fios-----	13
4.2. Teste <i>in vivo</i> -----	14
4.3. Comparação entre os Quatro Testes TLS, ZoneQuick®, TFAVF e TFAVB-----	17
4.4. Avaliação Comparativa do Efeito sobre a Produção Lacrimal Reflexa Gerada pelos TLS, TFAVF e TFAVB-----	21
5. CONCLUSÃO-----	27
6. ANEXOS-----	27
6.1. Sistema Lacrimal-----	27
6.2. Anexo 2-----	34
6.2.1. Parecer da Comissão de Ética sobre o Projeto de Pesquisa-----	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	35

## 1. INTRODUÇÃO:

A incidência de quadros mórbidos do sistema lacrimal, principalmente a ceratoconjuntivite seca, vem aumentando significativamente em caninos domésticos o que implica na necessidade de melhoria das técnicas de diagnóstico e tratamento.

As tentativas para se desenvolver um teste para mensuração da real produção lacrimal, já duram cerca de 100 anos, sendo que, atualmente existem vários testes (qualitativos e quantitativos) para avaliar as alterações do filme lacrimal porém nenhum deles pode ser considerado 100% eficaz.

Em cães, os testes quantitativos mais utilizados, são o TLS I e o filtro de papel (coador de café)<sup>1</sup> cortado em tiras de 5 por 50 milímetros, que medem a produção basal e reflexa, não sendo capazes de avaliar a secreção “real” ou basal sem a dessensibilização da superfície ocular com o uso de um colírio anestésico, como feito no TLS II. Este fato pode gerar erros de diagnóstico, conferindo valores de produção de lágrima normais a animais com diminuição mórbida da produção lacrimal, dificultando a identificação e tratamento precoce, e colocando em risco a hígidez visual dos caninos acometidos.

Em humanos, o teste do fio com vermelho fenol vem-se mostrando mais eficaz, com uma leitura mais próxima da basal em função da rapidez e menor desconforto à sua aplicação quando comparado aos anteriormente descritos, segundo estudos em humanos realizados no Brasil utilizando um fino fio de algodão especial impregnado de Vermelho Fenol produzido pela Menicon o ZoneQuick® (HIDA, 2005). Com relação aos cães existem poucas pesquisas sobre os padrões de leitura e vantagens ou desvantagens deste teste com relação aos métodos quantitativos padrões atualmente utilizados.

Assim, buscou-se neste estudo avaliar o ZoneQuick®, desenvolver e testar outros materiais de medição quantitativa da produção lacrimal com fio impregnado com vermelho fenol e outro indicador de pH, e compará-los ao teste lacrimal de Schirmer I.

---

<sup>1</sup> Marca de papel de filtro de café facilmente encontrado em todo o Brasil

## **2. REVISÃO DE LITERATURA:**

### **2.1. Filme Lacrimal:**

O filme lacrimal pré-corneano é uma barreira que protege a córnea do meio exterior sendo responsável por manter a sua saúde e a função normal, pois remove resíduos e detritos, fornece umidade, lubrificação e nutrientes essenciais, tais como oxigênio e glicose, e contém imunoglobulinas, enzimas e outras proteínas que são importantes para proteção do olho (PICCIONE, 2009). Sua espessura no centro da córnea é de 7 a 10  $\mu\text{m}$  e apresenta três fases ou camadas: lipídica, aquosa e mucosa, dispostas nesta ordem, sendo a camada lipídica superficial ligada à camada aquosa e a mucinica à aquosa e à córnea (GRAHN & STOREY, 2004).

#### **2.1.1 Camada Lipídica:**

Esta é a fase mais superficial do filme lacrimal pré-corneano secretado pelas glândulas de Zeiss e especialmente pelas Tarsais ou Meibomianas. É composta por uma mistura de lipídeos polares e não polares e permanece fluida a 35° Celsius, sendo constituída por colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios, onde a fração polar (fosfolipídios) fica em contato com a camada aquosa do filme lacrimal e a apolar com o ar (DAVIDSON & KUONEN, 2004).

Sua espessura é relativamente pequena variando no cão de 0,013 a 0,6  $\mu\text{m}$ . Ela forma uma única camada elástica que cobre a fase aquosa, ligando o filme lacrimal pré-corneano às margens palpebrais inferior e superior, prevenindo o seu transbordamento devido à sua alta tensão superficial, além de diminuir a evaporação da camada aquosa, aumentar o tempo de quebra do filme lacrimal e a sua osmolaridade (DAVIDSON & KUONEN, 2004).

#### **2.1.2. Camada Aquosa:**

Com uma espessura média de 7  $\mu\text{m}$ , esta representa  $\geq 60\%$  do filme lacrimal. É secretada pela glândula lacrimal principal, pela glândula da membrana nictitante e glândulas lacrimais acessórias da conjuntiva, (GUM et. al., 1999). Ela é composta de 98,2% de água e de 1,8% de materiais sólidos (como minerais, proteínas, glicose, células sanguíneas) (IWATA, 1983).

Em cães, a concentração de proteínas na fase aquosa da lágrima é de 3,5 a 6,2 mg/ml, sendo, principalmente, globulinas (93%, principalmente de imunoglobulinas A e G), albumina (4%), lisozimas (3%) e lactoferrinas (GUM et. al., 1999). No cão o pH médio segundo Gum et. al. (1999) é de 7,5, já para Saito & Kotani (2001) e Saito et. al. (2001) é em torno de 7 podendo haver

variações que segundo Brown (1997) vão de 6,8 a 7,5.

A fase aquosa nutre a superfície corneana avascular, ao fornecer glicose, sais minerais e proteínas além de atuar como meio de transferência do oxigênio atmosférico. Promove a lubrificação do epitélio corneal, conjuntival e da membrana nictitante, facilitando a passagem das pálpebras e membrana nictitante sobre a córnea. Ela protege ao remover material estranho, metabólitos provenientes da córnea (dióxido de carbono, ácido láctico, entre outros), debris celulares e bactérias do saco conjuntival e superfície corneana (MOORE, 1999). Apresenta propriedade antibacteriana por conter células inflamatórias (atraídas por influências quimiotáticas durante a inflamação), anticorpos (imunoglobulina A - IgA) e enzimas como lactoferrinas e lisozimas. Realiza uma lavagem que protege contra agressões mecânicas, microbianas e térmicas (IWATA, 2004; GERMAN et. al., 1998).

### **2.1.3. Camada Mucosa:**

A camada mucosa tem na sua composição mucina, imunoglobulinas (como a IgA), uréia, sais minerais, glicose, leucócitos, debris celulares e enzimas (como as lisozimas) (GUM et. al., 1999; NICHOLS et. al., 1985). Ela lubrifica e protege a córnea, prevenindo o ressecamento, fixa o filme lacrimal sobre seu epitélio, diminuindo as forças de atrito sobre este, e inibe o desenvolvimento bacteriano (MCKENZIE et. al., 2000). Ela fixa o filme lacrimal pré corneano sobre a córnea e a lubrifica (GUM et. al., 1999)

A mucina é uma miscelânea de glicoproteínas de diferentes formas moleculares que apresentam como particularidade a presença de um pólo hidrofílico em contato com a fase aquosa e um pólo hidrofóbico em contato com o epitélio corneal hidrofóbico, funcionando como um meio de ligação entre eles. É produzida pelas células caliciformes e lançada no saco conjuntival (GRAHN & STOREY, 2004). Apesar disto o muco não está firmemente aderido sobre a córnea, deslizando livremente sobre esta e se distribuindo de forma uniforme, o que contribui para a proteção desta contra o atrito durante o movimento palpebral (DILLY, 1986) e remoção de debris celulares, microrganismos e material estranho, que são captados, agrupados e levados ao fórnix conjuntival, sendo expulsos do olho pelo ducto nasolacrimal (ADAMS, 1986; LEMP & BLACKMAN, 1981). Ela se adere às microvilosidades corneais, minimizando as irregularidades do epitélio corneal, o que contribui junto com as outras camadas da lágrima para uma superfície ocular lisa, importante para o perfeito funcionamento óptico. Deficiências na produção da porção aquosa do filme lacrimal, danos ao epitélio ou glicocálice e aumento na perda de células epiteliais, podem levar a uma maior aderência do muco a si próprio ou ao epitélio, o que forma aglomerados mucosos e leva a instabilidade do filme lacrimal (ASHUTOSH, 1993; CHANDLER & GILLETTE, 1983)



## 2.2. Dinâmica do Filme Lacrimal:

O filme lacrimal é totalmente renovado em poucos minutos. A secreção basal do filme é de 0,5 a 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  e esta produção pode variar ligeiramente num mesmo indivíduo ao longo do dia (BERGER et al., 1998; HAKANSON et. al., 1997). Estudos realizados mostram uma variação na leitura da produção lacrimal ao longo do dia com o TLS I de 2 milímetros, esta variação é pequena para ter significado clínico mas é estatisticamente significativa e pode ter implicações fisiológicas, sendo que o pico de produção ocorre as 20:00 horas e a mínima as 08:00 horas (PICCIONE, 2008).

O controle da secreção é multifatorial e isto ainda não foi completamente elucidado. A inervação parassimpática estimula as glândulas lacrimais e da membrana nictitante. Já a inervação adrenérgica poderia também as estimular (POWELL et. al., 1989). Outros mediadores químicos, como os agonistas beta-adrenérgicos, agonistas colinérgicos, peptídeos e diversos hormônios como a prolactina e os androgênicos, são também mencionados como estimuladores da secreção lacrimal (STILES et. al., 1997).

A qualidade do filme lacrimal não só depende da produção normal das diversas frações acima mencionadas, mas também da motilidade ocular, da integridade anatômica e funcional das pálpebras (14 piscadelas por minuto em cães), mas se a oclusão não é completa, a eficácia dos movimentos palpebrais cai a 45%. (REGNIER, 2001; DEAN, 1997; CARRINGTON, 1987). A cada piscar de pálpebras, a camada lipídica é secretada e forma uma fina, porém resistente membrana entre as duas margens palpebrais (MOORE, 1990). Quando elas se afastam uma da outra, a parte lipídica espalha-se rapidamente sobre a superfície da camada aquosa. A fase aquosa sofre a ação de uma força centrífuga que a espalha sobre a córnea em direção à periferia desta e a fase lipídica uma força centrípeta que a espalha em direção ao centro da córnea. O movimento palpebral e do globo, promove o aumento e a diminuição do saco conjuntival, e um contato entre a conjuntiva palpebral e a córnea, com isto a mucina se espalha sobre a córnea preenchendo as microvilosidades e atuando como um elo de ligação entre a camada aquosa e a córnea (GUM et. al., 1999). Em cães, o papel de disseminação do filme lacrimal é também atribuído à membrana da membrana nictitante. A maior parte do filme lacrimal se acumula, em função da gravidade, no fórnice conjuntival inferior, formando um lago lacrimal, durante o fechamento das pálpebras o músculo orbicular contrai contribuindo para a drenagem da lágrima pelo ponto lacrimal, pois, a parede do saco lacrimal é tensionada, criando uma pressão menor no lúmen, fazendo com que a lágrima o adentre. Este efeito sifão do saco lacrimal em adição a capilaridade do ducto nasolacrimal, são os principais responsáveis pelo bombeamento da lagrima pelo ducto (GRAHN, 1999). A secreção e a produção devem ocorrer em harmonia com a eliminação, não havendo derramamento lacrimal fora do trato lacrimal. Estima-se que 70% da lágrima é drenada pelos pontos lacrimais, sendo o restante

eliminado por evaporação (SLATTER, 2005).

## **2.3. Avaliação Quantitativa do Filme Lacrimal:**

### **2.3.1. Teste Lacrimal de Schirmer:**

Este método foi desenvolvido por Schirmer em 1903 e a partir de 1941 com o uso de tiras de papel Whatman 41 para padronizar o procedimento, passou a ser amplamente utilizado (BARABINO et. al., 2004). Neste promove-se a exploração quantitativa da produção da fase aquosa do filme lacrimal pré-corneano, através do uso de uma tira papel filtro (0,5x 5,0 cm) graduada de 5 em 5 mm, cuja extremidade (0,5cm) é colocada no fórnix conjuntival inferior (STRUBBE & GELATT, 1999; GELATT et. al., 1975).

O teste dura um minuto e os resultados são apresentados em milímetros por minuto. Existem dois tipos: o Teste Lacrimal de Schirmer I (TLS I), medindo o total de secreção lacrimal e o Teste Lacrimal de Schirmer II (TLS II) realizado com a instilação de anestésico tópico e secagem do fórnix conjuntival medindo principalmente a produção lacrimal basal (PICIONE et. al., 2009). Mesmo com o uso de colírio anestésico, a presença de secreção lacrimal reflexa tem sido documentada (BARABINO et. al., 2005). Recomenda-se manter as pálpebras abertas, mas o seu fechamento pouco interfere no resultado da leitura final. No TLS I a lágrima é absorvida pelo papel saturando-o, nos primeiros 10 segundos de estudo, há uma grande absorção com gradiente médio de  $29,6 \pm 16,9$  mm/min., seguido por uma fase estacionária com  $5,3 \pm 2,3$  mm/min. Isto permite a avaliação da secreção lacrimal total, onde inicialmente o papel absorve principalmente a lagrima presente no fórnice conjuntival e depois a produção lacrimal basal e reflexa (causada em parte pela irritação originada pela fita utilizada no teste), através da graduação (WILLIAMS, 2005). Em cães são considerados normais resultados entre 15 e 25 mm/min, sendo que resultados entre 15 e 8 mm/min são considerados suspeitos e abaixo de 8mm/min é diagnosticada a ceratoconjuntivite seca (SLATTER, 2005).

### **2.3.2. Teste de Fio com Indicador de pH:**

Em 1975, foi desenvolvido por Kurihashi et al. um método de avaliação utilizando um fino fio de algodão ao invés da fita de papel de filtro do teste lacrimal de Schimmer (TLS) (HIDA et al., 2005). O fio feito com algodão de alta qualidade tem de 0,2 a 0,3 milímetros de espessura (BARABINO et. al., 2004). A nova técnica foi melhorada com a impregnação do fio por vermelho

fenol (fenol sulfo-naftaleína), uma solução usada como corante sensível ao pH normal da lágrima, cuja cor varia gradualmente do amarelo ao vermelho na faixa de pH entre 6,6 e 8,0, e acima do pH 8,1 apresenta uma cor rosa brilhante (magenta) . O fio com 75 milímetros de comprimento é dobrado a 3 mm da extremidade de sua borda superior (HOLT et. al., 2006) para facilitar a sua fixação na borda palpebral inferior (HIDA et al., 2005).

Quando em contato com a lágrima, a porção umidificada por ela passa do amarelo para o vermelho alaranjado, em função da natureza alcalina desta. Após 15 segundos a extensão do fio modificada é medida em milímetros. Em humanos o padrão normal de leitura é  $19,77 \pm 7,90$  mm (HIDA et al., 2005). Para cães é de  $29,3 \pm 3,45$  mm/15 seg (SAITO & KOTANI, 2001).

Os indicadores visuais de pH são substâncias capazes de mudar de cor dependendo da solução na qual estão contidos, em função de fatores diversos com pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos e adsorção de sólidos. São substâncias orgânicas fracamente ácidas (indicadores ácidos) ou fracamente básicas (indicadores básicos), que adicionadas a uma solução se ligam a íons  $H^+$  ou  $OH^-$ , alterando sua configuração molecular e por consequência a cor (TERSI & ROSSI, 2002).

Estes indicadores tem diversas utilizações na medicina com é o casos do Verde de Bromocresol ou tetrabromometacresolsulfonoftaleína, que apresenta cor amarela pálida, é inodoro e varia de cor do amarelo em soluções com pH abaixo de 3,8 para o azul em soluções com pH acima de 5,4. Este é usado na determinação de albumina sérica e junto com o púrpura de bromocresol (outro indicador de pH) na análise de farmacos veterinários (Amina, 1997).

## **2.4. Exame do Aparelho Excretor:**

Teste de Jones verifica a funcionalidade da porção excretora através da instilação de uma gota da solução de fluoresceína no olho, e verificando o aparecimento do corante no óstio nasal correspondente. Normalmente a fluoresceína atravessa o sistema de drenagem nasolacrimal em 5 minutos (STRUBBE & GELATT, 1999). No entanto até 50% dos cães normais apresentam resultado negativo ao teste (BARNETT, 1998), sendo que só devem ser considerados os resultados positivos, principalmente em raças braquicefálicas, nas quais o caminho nasolacrimal desemboca caudalmente na garganta, sendo necessário abrir a boca do animal para visualizar língua e faringe a procura de presença da coloração e dar o diagnóstico positivo (CLERC, 1986; STRUBBE & GELATT, 1999).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1. Animais:**

Ao todo foram utilizados no experimento 50 cães da raça Beagle, sendo 25 fêmeas e 25 machos, com idade média de 1 ano e 8 meses do Canil do Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Todos foram mantidos em canis, com abrigo, água e comida à vontade, e limpos diariamente apresentando boas condições de higiene. A seleção dos animais foi feita de forma aleatória, sendo o critério de exclusão produção lacrimal igual a zero pelo Teste Lacrimal de Schirmer I. Entraram no estudo animais, com boa saúde ocular e outros com ceratoconjuntivite seca de modo a padronizar o teste, tendo como referência uma população de cães próxima à realidade clínica de centros oftalmológicos veterinários.

#### **3.2. Laboratórios:**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica da UFRRJ<sup>2</sup> e no Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica da UFRRJ<sup>3</sup>

#### **3.3. Material utilizado:**

##### **3.3.1. Fios:**

Foram utilizados os fios 100% poliéster TEX 80<sup>4</sup> (F1), 63% poliéster e 37% algodão TEX 25<sup>5</sup> (F2), 100% algodão TEX 34<sup>6</sup> (F3), 100% algodão TEX 42<sup>7</sup> (F4), 100% algodão TEX 85<sup>8</sup> (F5).

##### **3.3.2. Testes Quantitativos Comerciais:**

Foram empregados os o Teste lacrimal de Schimmer<sup>9</sup> (TLS) e o ZoneQuick®<sup>10</sup>

---

<sup>2</sup> BR-465, Km 7. Seropédica/Rio de Janeiro

<sup>3</sup> BR-465, Km 7. Seropédica/Rio de Janeiro

<sup>4</sup> Drima® Pesponto TEX 80 Coats Corrente Têxtil Ltda, Brasil

<sup>5</sup> Corrente Laranja® Linha para costura TEXT 25, Coats Corrente Têxtil Ltda, Brasil

<sup>6</sup> Corrente® linha para costura Sewing Thread TEX 34, Coats Corrente Têxtil Ltda, Brasil

<sup>7</sup> Glacê 40® TEX 42, Coats Corrente Têxtil Ltda, Brasil

<sup>8</sup> Pipa 10® TEX 85, Coats Corrente Têxtil Ltda, Brasil

<sup>9</sup> Ophthalmus, Rua Ataulfo de Paiva, nº566, Lj. 302, Leblon, Rio de Janeiro

### **3.3.3. Soluções Indicadoras de pH e Tampão:**

As soluções indicadoras de pH utilizadas foram o vermelho fenol<sup>11</sup> na diluição de 0,1; 0,15; 0,2% em álcool etílico 99,8% e o verde de bromocresol<sup>12</sup> na diluição de 0,05%, 0,1% e 0,2% em álcool etílico 99,8%<sup>13</sup>, sendo este selecionado pela faixa de pH de viragem e pelo contraste tonal obtido com a mesma (do verde ao azul em pH acima de 3,6, sendo sua faixa de viragem de 3,6 a 5,4, segundo o fabricante).

Foi utilizada uma solução tampão de pH 6,98 a base de fosfatos produzida pelo laboratório de Química Analítica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### **3.3.4. Outros Materiais**

Escalímetro na escala de 1:100 para as medições<sup>14</sup>

## **3.4. Métodos**

### **3.4.1. Seleção dos Fios**

Foram selecionados cinco tipos de fios com composição e espessuras diferentes, para serem avaliados e se determinar o tipo ideal para a produção do material de teste e realização da leitura da produção lacrimal em cães. A avaliação foi dividida em três etapas, primeiro foram preparadas as solução de Vermelho Fenol, em segundo a preparação dos fios impregnados com Vermelho Fenol e em terceiro os testes in vitro.

### **3.4.2. Preparação das Soluções de Vermelho Fenol**

Foram preparadas três soluções de Vermelho Fenol diluídas em álcool etílico a 99,8% de pureza em concentrações de 0,1%, 0,15% e 0,2%. Estas foram escolhidas, pois a diluição padrão

---

<sup>10</sup> Showa Yakuin Kako CO., LTD Tokio Japan (Sales Agent: Menicon America Inc., San Matei, CA)

<sup>11</sup> Vetec Química Fina

<sup>12</sup> E. Merck AG - Darmstadt

<sup>13</sup> Vetec Química Fina

<sup>14</sup> Fabricante: TRIDENT INDÚSTRIA DE PRECISÃO LTDA – Itapuí - SP

para indicadores de pH é 0,1% e se quis testar concentrações maiores para melhorar a visualização na viragem de coloração do indicador.

### **3.4.3. Preparação dos Fios Impregnados com Vermelho Fenol**

Em seguida, foram cortados três pedaços de 80 cm de cada fio (F1, F2, F3, F4 e F5) e mergulhados nestas soluções durante 15 segundos, sendo logo em seguida colocados para secar ao ar. Após a secagem cada pedaço impregnado foi fragmentado em 10 pedaços de 75 milímetros, sendo posteriormente designados pela sigla do fio seguida da concentração (ex: F1-0,1%; F3-0,2). Nesta etapa foram avaliados a coloração final e o nível de rigidez dos fios testados após a impregnação.

A avaliação destes parâmetros é extremamente importante pelos seguintes motivos:

- a) Coloração final após impregnação e secagem – durante a absorção da lágrima se espera a viragem da coloração do amarelo para o laranja ou vermelho (TFAVF). Uma capacidade de impregnação excessiva poderia levar a uma coloração final do fio após impregnação e secagem laranja ou vermelha dificultando a visualização da viragem do Vermelho Fenol que vai do amarelo para o laranja, vermelho alaranjado ou vermelho de acordo com o pH;
- b) Rigidez do fio após impregnação e secagem – uma maleabilidade excessiva dificultaria a colocação dos 3 milímetros necessários no saco conjuntival, tornando o teste muito difícil de ser realizado. Contudo uma maior rigidez pode ferir a conjuntiva e/ou córnea do animal e pode provocar uma maior produção lacrimal reflexa, levando à maiores diferenças de leitura entre os olhos. Os fios foram classificados com o caractere (+), onde o(s) de melhor rigidez receberiam classificação +++, o(s) de pior + e o(s) que apresentassem rigidez intermediária ++;

### **3.4.4. Testes *in vitro***

Nesta etapa as amostras de fios impregnados com Vermelho Fenol produzidas foram testadas na sua capacidade de absorção e viragem na coloração. Para isto, 3 milímetros de uma das extremidades de cada fio foi mergulhado numa solução tampão por 15 segundos, medindo-se em seguida a parte umedecida com um escalímetro na escala de 1/100 obtendo-se o valor em milímetros por 15 segundos (mm/15seg.) para avaliar a capacidade de absorção e avaliando-se,

através de inspeção desarmada a variação da coloração à medida que a solução tampão era absorvida para se determinar a capacidade de viragem da coloração de cada fio.

A avaliação destes parâmetros é extremamente importante pelos seguintes motivos:

- a) Coloração de viragem quando mergulhado na solução tampão – quanto mais diferente é a coloração após a viragem, mais fácil fica a leitura. Os fios foram classificados com o caractere (+), onde o(s) que apresentassem melhor viragem na cor (variassem do amarelo para o vermelho) receberiam como classificação (+++++), os que não mudassem de cor quando mergulhados na solução tampão (+) e os demais de (++++) a (++) de acordo com a intensidade de viragem na cor;
- b) A capacidade de absorção – quanto maior a capacidade de absorção, mais fácil se torna a medição de pequenas variações da produção lacrimal dentro do reduzido intervalo de tempo dos testes com fio

### **3.4.5. Preparação das soluções de Verde de Bromocresol**

Foram preparadas três soluções de Verde de Bromocresol diluídas em álcool etílico a 99,8% de pureza em concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,2%. Estas foram escolhidas, pois a diluição padrão para indicadores de pH é 0,1%, se quis testar uma concentração menor a 0,05%, já que a maior intensidade de viragem da cor na faixa de pH normal do cão (6,8 a 7,5), poderia facilitar a sua visualização possibilitando boa visualização com uma menor concentração, e uma maior a 0,2% para melhorar a visualização na viragem de coloração do indicador.

### **3.4.6. Preparação dos fios para os testes *in vivo***

Definido o tipo ideal de fio em laboratório, foram cortados seis pedaços de 80 cm de cada fio (F1, F2, F3, F4 e F5) e mergulhados nestas soluções (três de Vermelho Fenol a 0,1%, 0,15% e 0,2% e três de Verde de Bromocresol a 0,05%, 0,1% e 0,2%) durante 15 segundos, sendo logo em seguida colocados para secar ao ar. Após a secagem cada pedaço impregnado foi fragmentado em 10 pedaços de 75 milímetros, sendo posteriormente designados pela sigla do fio seguida do tipo de indicador e depois pela concentração (ex: F1-VF-0,1%; F3-VB-0,2%).

### **3.4.7. Teste dos Fios Impregnados *in vivo***

Foram selecionados 10 cães, sendo 5 fêmeas e 5 machos. Foram realizados teste de aferição

da produção lacrimal com o material produzido para os testes *in vivo* através da colocação de aproximadamente 3 mm de uma das extremidades da amostra no terço médio do saco conjuntival inferior de cada olho, por 15 segundos. Os animais foram examinados logo após a aplicação e nos dois dias seguintes, na busca de possíveis efeitos danosos aos cães, para se determinar qual a concentração ideal de indicador de pH (Vermelho Fenol e Verde de Bromocresol) para realização dos testes.

### **3.4.8. Comparação entre os Quatro Testes**

Foram selecionados 30 cães da raça Beagle dentro do grupo de 50 Beagles usados no experimento, sendo 15 fêmeas e 15 machos, dos quais se avaliou a produção lacrimal aquosa, com os TLS, ZoneQuick®, Teste de Fio com Vermelho Fenol (TFAVF) e Teste de Fio com Verde de Bromocresol (TFAVB). A realização dos testes ocorreu em quatro dias seguidos, para cada dia foi feito apenas um teste em todos os animais selecionados, sempre no mesmo horário de 08:00 às 11:00 horas da manhã, e os animais foram testados sempre na mesma ordem. Foram avaliadas a produção lacrimal medida em milímetros com o uso de um escalímetro na escala de 1/100, a mudança na cor dos fios dividindo-os em dois grupos, um em que foi possível visualizar viragem na cor do indicador de pH e outro em que isto não foi possível, e a facilidade de realização. Além disto, foi feita a análise estatística das leituras obtidas com os testes para compará-los e se determinar qual apresenta diagnóstico mais assertivo, com menor chance de erro.

### **3.4.9. Avaliação Comparativa do Efeito Sobre a Produção Lacrimal Reflexa Gerada pelos TLS, TFAVF e TFAVB**

Foram selecionados 30 cães da raça Beagle dentro do grupo de 50 Beagles usados no experimento, sendo 15 fêmeas e 15 machos nos quais se realizou duas baterias de testes de produção de lágrima em dois dias consecutivos, com uma semana de intervalo entre estas. No olho direito de cada animal foi realizado o TLS enquanto que no esquerdo se realizou o TFAVF (1ª bateria) ou TFAVB (2ª bateria). No primeiro dia de cada bateria, iniciou-se os testes pelo olho direito e no segundo dia pelo olho esquerdo. Todos os testes foram realizados das 8:00 as 11:00 horas, obedecendo-se sempre à mesma seqüência dos animais. Nesta etapa buscou-se novamente avaliar e comparar a eficiência dos TLS, TFAVF e TFAVB para se determinar qual o mais assertivo e a influencia destes sobre a produção lacrimal reflexa por meio de análise estatística dos dados obtidos com a realização dos testes nos cães selecionados.



### **3.4.10. Comissão de Ética**

A Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP-UFRRJ) vinculada ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da UFRRJ deu parecer que este projeto atende os princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. O número do protocolo para submissão de projeto de pesquisa a comissão de ética é 042/2010.

### **3.4.11. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram avaliados com o programa BioEstat 5.0<sup>®</sup>. Os métodos estatísticos utilizados foram ANOVA e a Estatística descritiva para dados quantitativos.

A ANOVA foi utilizada na avaliação comparativa do Efeito Sobre a Produção Lacrimal Reflexa gerada pelos TLS, TFAVF e TFAVB.

Estatística descritiva para dados quantitativos foi empregada com o intuito de comparar os quatro testes e avaliar qual é mais assertivo, para isto foram avaliados: tamanho da amostra, valor mínimo, valor máximo, amplitude total, média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação dos dados obtidos com o TLS, TFAVF, TFAVB e ZoneQuick<sup>®</sup> realizados nos animais utilizados no experimento, sendo que os resultados do olho direito e esquerdo foram analisados em separado e juntos.

## **4. Resultados e Discussão:**

### **4.1. Seleção dos Fios:**

Na etapa de preparação dos fios impregnados com Vermelho Fenol, os fios F1 e F2 apresentaram uma excessiva capacidade de impregnação pelas soluções de Vermelho Fenol (0,1%, 0,15% e 0,2%) na comparação com os outros fios resultando numa. Além desse parâmetro avaliou-se a rigidez dos fios pós-impregnação (visualmente e taticamente) sendo que o F4 e o F5 foram os mais rígidos e por esse motivo mais desejáveis, visto que uma das dificuldades dos testes de produção lacrimal baseados em fios é dificuldade de colocação decorrente da falta de rigidez do material, deste modo o F3 foi eliminado.

Já nos testes *in vitro* houve pouca variação da coloração dos fios F1 e F2 pois a coloração após impregnação e secagem alaranjada ou avermelhada dificultou a visualização da viragem na cor do vermelho de fenol quando mergulhado na solução tampão, sendo por isto descartados. Além disto os fios F1, F2 e F3 foram os que apresentaram a maior absorção da solução tampão durante o período de 15 segundos de realização do teste e o F4 a menor .

No conjunto de parâmetros avaliados o fio F5 se destacou (tabela 1), sendo escolhido para os testes *in vivo*, pois foi o que apresentou alta viragem na cor quando mergulhado na solução tampão em comparação aos fios F1 e F2, maior rigidez em relação ao fio F3 e maior absorção da solução tampão quanto ao fio F4.

Tabela 1: Resultado do testes *in vitro* das amostras de fio de a serem usados nos testes quantitativos de produção lacrimal em Beagles, usando-se o vermelho de fenol, UFRRJ, Seropédica 2009

Fios: F1- Fio 100% poliester/ TEX 80; F2- Fio poliester 63% / algodão 37% /TEX 25; F3 - Fio 100% algodão/TEX 34; F4 - Fio 100% algodão/ TEX 42; F5-Fio 100% algodão/TEX 85. Rigidez: + a +++ sendo + o mais macio; Variação de coloração de + a +++ sendo + a menor variação

Fios	Coloração final	Rigidez	Absorção de solução tampão	Variação na coloração
F1	alaranjado	+	32mm/15seg.	++
F2	vermelho	+	24 mm/ 15 seg.	+
F3	amarela	++	26mm/ 15 seg.	+++
F4	amarela	+++	14 mm/ 15 seg.	+++
F5	amarela	+++	17 mm/ 15 seg.	+++

#### 4.2. Teste dos Fios Impregnados *in vivo*

Nos testes *in vivo*, para a avaliação de possíveis efeitos danosos, não se observou nenhuma, independentemente das concentrações de Vermelho Fenol (0,1%, 0,15% e 0,2%) usadas na preparação do fio F5. Contudo, devido à facilidade de visualização (maior variação na coloração durante a absorção da lágrima) optou-se pela concentração de 0,2 % para o Vermelho Fenol, sendo selecionado para as etapas de comparação entre quatro testes e avaliação comparativa do efeito sobre a produção lacrimal reflexa gerada pelos TLS, TFAVF e TFAVB, fio F5 impregnado com

Vermelho Fenol a 0,2%. Entretanto, mesmo nesta concentração, em três animais ocorreu pouca ou nenhuma variação na cor no TFAVF com fio F5, o que pode ser explicado pela faixa de viragem do vermelho de fenol, que começa em 6,8 muito próximo do valor médio de pH da lágrima canina é 7,0 (SAITO & KOTANI, 2001 e SAITO et. al., 2001).



Figura 1: Mostra a viragem na coloração do amarelo para o vermelho-alaranjado no Teste com Fio de Algodão com Vermelho Fenol em um Beagle

O ZoneQuick®, tem o fio mais maleável dificultando sua colocação no saco conjuntival de cães, pois ao contrário de humanos, eles não ficam imóveis durante a realização dos testes. Além disto houve uma dificuldade ainda maior em comparação ao TFAVF em quantificar a quantidade de lágrima absorvida pelo fio, pois em muitos animais este não apresentava alteração visível na coloração ao absorver a lágrima. Fato que foi melhor avaliado na etapa de padronização dos testes.



Figura 2: Mostra a dificuldade de visualização na viragem da cor durante a realização do Teste ZoneQuick®

Esta ausência ou menor variação na coloração à medida que a lágrima ou a solução tampão é absorvida, observada tanto nos testes *in vitro* como *in vivo*, pode ser devida à faixa de variação do pH médio da lágrima do cão é 7 e o pH da solução tampão ser 6,98, valores estes que se localizam no começo da faixa de pH de viragem do Vermelho Fenol (de 6,6 ao 8,4, segundo a Veytec, fabricante do indicador). Com isto, a mudança de cor, de amarelo para vermelho, é pequena a ponto de alguns casos não ser percebida visualmente, dificultando em muito a medição da produção lacrimal. Foi esta constatação que tornou necessária a busca por um indicador de pH que apresentasse uma faixa de viragem iniciada em pH mais baixo e cuja variação de coloração fosse mais intensa, daí a escolha do verde bromocresol que varia do verde claro ao azul celeste em um faixa de pH do 3,6 ao 5,4 segundo o fabricante do indicador.

Na avaliação de possíveis efeitos adversos, apenas na concentração de 0,2%, em um dos cães foi notada alteração, com uma leve hiperemia conjuntival em apenas um dos olhos ao término do teste, que não existia antes deste ser iniciado, e o qual se desfez alguns minutos após não sendo visualizada nos dois dias subsequentes. Em função disto foi escolhido como padrão para este indicador a concentração de 0,05% com fio 100 % algodão de TEX 85.

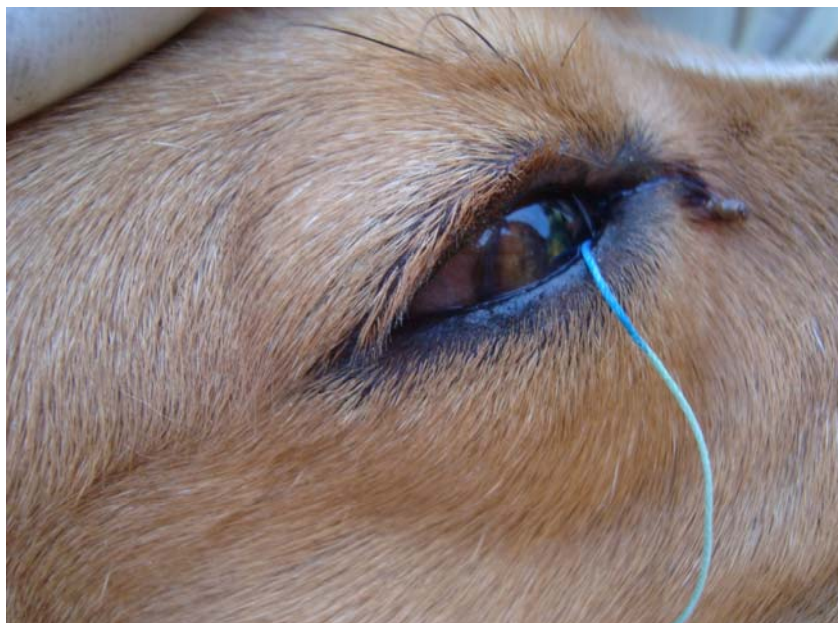


Figura 3: Mostra a viragem na coloração do Verde para o Azul no Teste de Leitura Lacrimal com Fio de Algodão com Verde de Bromocresol

### 4.3. Comparação entre os Quatro Testes

Os resultados obtidos nos quatro dias de teste revelaram como médias aritméticas e desvios padrões para o TLS as valores de 19,77 ( $\pm$  5,95) mm/min. no olho direito , 18,21 ( $\pm$  6,12) mm/min. no olho esquerdo e 18,98 ( $\pm$  6,35) mm/min. nas leituras de ambos os olhos; para o ZoneQuick® 29,4 ( $\pm$  6,69) mm/15 seg. no olho direito, 28,0 ( $\pm$  7,16) mm/15 seg. no olho esquerdo e 28,7 ( $\pm$  6,91) para ambos os olhos; já o TFAVF apresentou 17,5 ( $\pm$  3,5) mm/15 seg. no olho direito, 16,93 ( $\pm$  3,79) mm/15 seg. no olho esquerdo e 17,22 ( $\pm$  3,63) mm/15 seg. para ambos os olhos; e o TFAVB 17,63 ( $\pm$  3,22) mm/15 seg. no olho direito, 17,03 ( $\pm$ 3,25) mm/15 seg. no olho esquerdo, 17,33 ( $\pm$  3,22) mm/15 seg. para ambos os olhos. Os valores obtidos na Estatística Descritiva podem ser visualizados no gráfico 1 e na tabela 2:

Tabela nº 2 : Apresenta o tamanho da amostra, os valores em milímetros/15 segundos para Zone

Quick, TFAVF e TFAVB e milímetros/minuto para o TLS dos valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão e erro padrão, e em porcentagem o coeficiente de variação, ambos obtidos na comparação dos Testes Lacrimal de Schirmer, ZoneQuick®, Fio de Algodão com Vermelho Fenol e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, em 30 cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010

	<b>TLS OD</b>	<b>TLS OE</b>	<b>Zone Quick® OD</b>	<b>Zone Quick® OE</b>	<b>TFAVF OD</b>	<b>TFAVF OE</b>	<b>TFAVB OD</b>	<b>TFAVB OE</b>
<b>Tamanho da amostra</b>	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>Mínimo</b>	1	1	10	11	10	7	11	10
<b>Máximo</b>	27	29	38	40	22	23	24	23
<b>Amplitude Total</b>	26	28	28	29	12	16	13	13
<b>Média Aritmética</b>	19,77	18,2	29,4	28	17,5	16,93	17,63	17,03
<b>Variância</b>	35,43	37,41	44,73	51,31	12,26	14,34	10,38	10,59
<b>Desvio Padrão</b>	5,95	6,12	6,69	7,16	3,5	3,79	3,22	3,25
<b>Erro Padrão</b>	1,09	1,12	1,22	1,31	0,64	0,69	0,59	0,59
<b>Coeficiente de Variação</b>	30,11%	36,61%	22,75%	25,58%	20,01%	22,36%	18,27%	19,10%

Legenda: Teste Lacrimal de Schirmer olho direito (TLS OD), Teste Lacrimal de Schirmer olho esquerdo (TLS OE), ZoneQuick® olho direito (ZoneQuick® OD), ZoneQuick® olho esquerdo (ZoneQuick® OE), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho direito (TFAVF OD), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (TFAVF OE), Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho direito (TFAVB OD) e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (TFAVB OE).

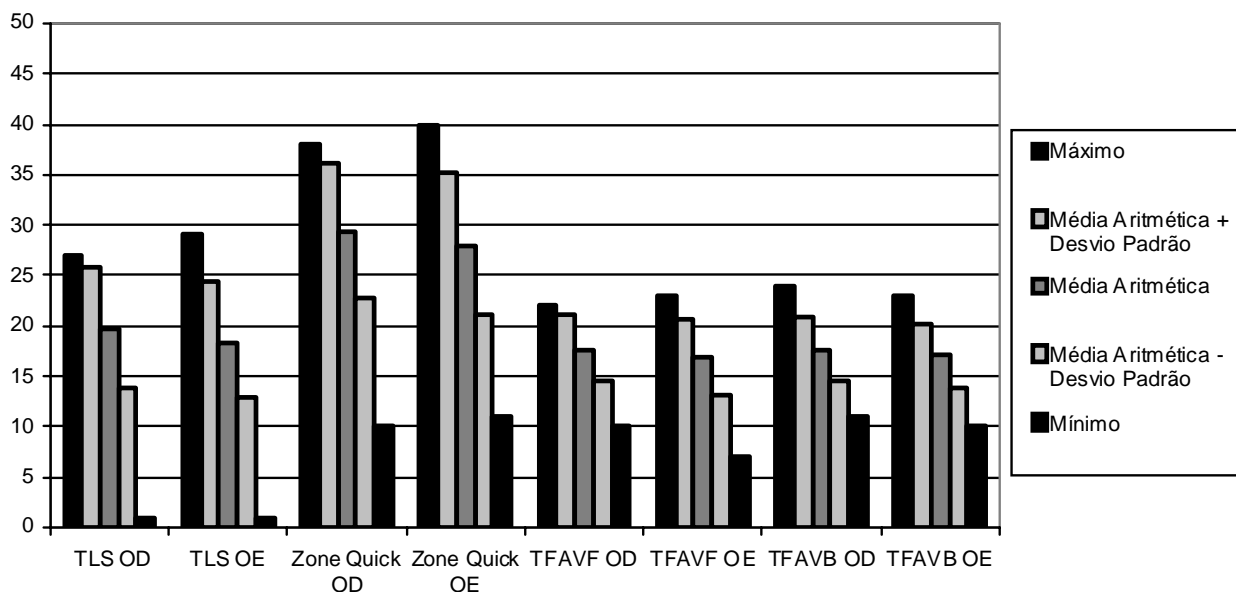


Gráfico 1: Apresenta os valores em milímetros/15 segundos para Zone Quick, TFAVF e TFAVB e milímetros/minuto para o TLS da Leitura de Mínimos e Máximos, Média Aritmética e soma e subtração de um Desvio Padrão a média aritmética, obtidos com os dados da comparação entre Testes Lacrimal de Schirmer, ZoneQuick®, Fio de Algodão com Vermelho Fenol e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, em 30 cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010.

Legenda: (TLS OD) Teste Lacrimal de Schirmer olho direito; (TLS OE) Teste Lacrimal de Schirmer olho esquerdo; (ZoneQuick® OD) ZoneQuick® olho direito; (ZoneQuick® OE) ZoneQuick® olho esquerdo; (TFAVF OD) Teste de Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho direito; (TFAVF OE) Teste de Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo; (TFAVB OD) Teste de Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho direito; e (TFAVB OE) Teste de Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo.

Como o olho esquerdo foi sempre avaliado após o direito, era esperado que o valor médio da leitura fosse superior, em decorrência da produção lacrimal reflexa desencadeada anteriormente pelos realizados no olho direito. Contudo não foi o que não aconteceu, verificando-se o contrario com menor leitura média do olho esquerdo em relação ao direito. Em termos percentuais foi 7,9% menor com o TLS , 4,8% com o ZoneQuick® , 3,3% com o TFAVF e 3,4% com o TFAVB. Não foi possível no experimento determinar a causa desta diferença.

Ao se avaliar as leituras dos dois olhos de cada animal obteve-se 18,98 ( $\pm$  6,35) mm/min. para o TLS, 28,70 ( $\pm$  6,91) mm/15seg. para o ZoneQuick®, 17,22 ( $\pm$  3,63) mm/15seg. para o TFAVF e 17,33 ( $\pm$  3,22) mm/15seg. com o TFAVB. Os resultados apresentados demonstraram proximidade entre os resultados do TFAVF e TFAVB, com uma diferença mínima entre as médias,

estatisticamente não significativa, de 0,11 mm/15 seg. ou 0,64% . Quando avaliados e comparados, variância, desvio padrão e erro padrão dos quatro testes, identificou-se um maior risco de erro de leitura para os testes padrões (TLS e ZoneQuick®) em relação ao TFAVF e TFAVB, sendo que o TFAVB apresentou os menores valores, o que pode ser visto na tabela nº3.

Tabela nº 3: Apresenta o tamanho da amostra, os valores em milímetros/15 segundos para Zone Quick, TFAVF e TFAVB e milímetros/minuto para o TLS dos valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão e erro padrão, e em porcentagem o coeficiente de variação, obtidos na análise em conjunto das leituras de ambos os olhos direito (OD) e esquerdo (OE) na comparação dos Testes Lacrimal de Schirmer, ZoneQuick®, Fio de Algodão com Vermelho Fenol e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol, em 30 cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010

	<b>TLS OD e OE</b>	<b>ZoneQuick® OD e OE</b>	<b>TFAVF OD e OE</b>	<b>TFAVB OD e OE</b>
<b>Tamanho da amostra</b>	60	60	60	60
<b>Mínimo</b>	1	10	7	10
<b>Máximo</b>	29	40	23	24
<b>Amplitude Total</b>	28	30	16	14
<b>Média Aritmética</b>	18,98	28,70	17,22	17,33
<b>Variância</b>	36,42	47,70	13,16	10,40
<b>Desvio Padrão</b>	6,35	6,91	3,63	3,22
<b>Erro Padrão</b>	0,78	0,89	0,47	0,42
<b>Coeficiente de Variação</b>	31,79%	24,07%	21,07%	18,60%

Legenda: Teste Lacrimal de Schirmer olho direito e olho esquerdo (TLS OD e OE), ZoneQuick® olho direito e olho esquerdo (ZoneQuick® OD e OE), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho direito e olho esquerdo (TFAVF OD e OE), Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho direito (TFAVB OD) e Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (TFAVB OE).

Com relação à facilidade de realização dos testes, o ZoneQuick® foi considerado o pior dentre os quatro em função da maior maleabilidade do fio que dificultou sua colocação no fórnice conjuntival em comparação aos outros testes. Outro fato observado foi que durante a realização dos testes com fio, o movimento ocular e palpebral leva este a entrar mais ou sair do fórnice conjuntival com mais facilidade do que ocorre com o TLS em virtude de sua menor largura, o que poderia alterar o resultado final do teste. Apesar disto, o coeficiente de variação do TLS foi maior em comparação aos testes de fio com indicador de pH, apresentando este uma maior chance de diagnóstico errado (falso positivo ou falso negativo).



Também foi analisada a eficiência dos testes de fio com indicador de pH ao se avaliar a porcentagem de olhos em que houve alteração na coloração visível à inspeção desarmada. Ocorreu variação de 100% para o TFAVB, 63% para o TFAVF e 43% para o ZoneQuick®, como pode ser visualizado no gráfico número 2.

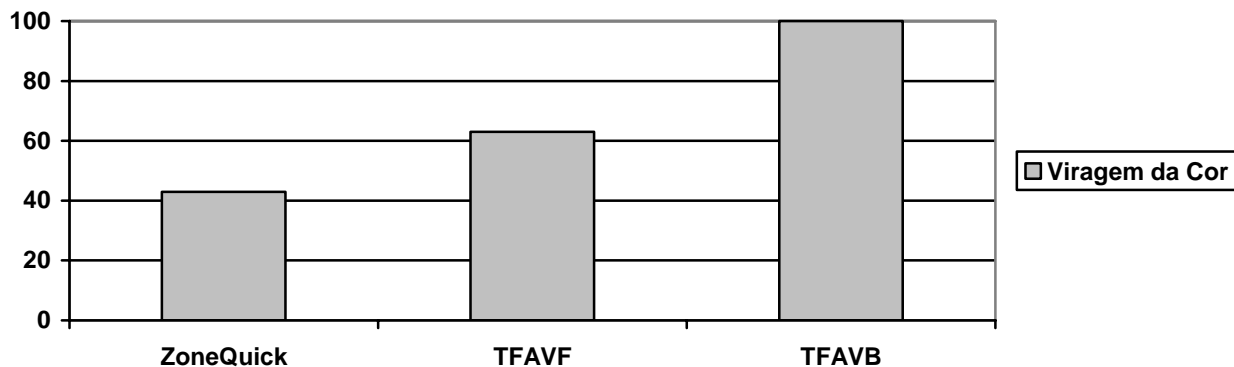


Gráfico nº 2: Avaliação percentual da ocorrência de viragem na coloração visível a olho nu dos fios impregnados com indicador de pH (ZoneQuick®, TFAVF e TFAVB) usados na comparação entre os testes (TLS, ZoneQuick®, TFAVF e TFAVB), durante a realização destes teste em cães da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica 2010.

#### **4.4. Avaliação Comparativa do Efeito Sobre a Produção Lacrimal Reflexa Gerada pelos TLS, TFVF e TFVB**

Avaliando-se os TFAVF e o TLS, observou-se que no primeiro dia o olho direito apresentou, com o TLS as leituras mínima e máxima de 5 e 28 mm/min. com uma amplitude total de 23 mm/min.; já o olho esquerdo, com o TFAVF 13 e 29 mm/15 seg. e amplitude de 16mm/15seg.. No segundo dia o olho direito apresentou como leituras mínima e máxima para o TLS 7 e 28 mm/min. e 21mm/min de amplitude, já o olho esquerdo 9 e 30 mm/min. com 21 mm/min. de amplitude. As leituras médias do TLS no olho direito foram de 19,7mm/min. no primeiro dia e 19,3 mm/min. no segundo dia, enquanto que o TFAVF no olho esquerdo, foi de 18,73 mm/min. no primeiro dia e 15,97 mm/min. no segundo, o que pode ser visto no gráfico 3. Nos dois dias de teste o TFAVF apresentou variância e erro padrão menores que o TLS, sendo assim menos susceptível a erros diagnósticos como falsos positivos ou negativos para CCS, o que pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5: Apresenta o tamanho da amostra, os valores em milímetros/15 segundos para Zone Quick, TFAVF e TFAVB e milímetros/minuto para o TLS dos valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão e erro padrão, e em porcentagem o coeficiente de variação, obtidos pela análise das leituras de ambos os olhos em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010

	TLS OD 1º dia	TFAVF OE 1º dia	TLS OD 2º dia	TFAVF OE 2º dia
<b>Tamanho da amostra</b>	30	30	30	30
<b>Mínimo</b>	5	13	7	9
<b>Máximo</b>	28	29	28	30
<b>Amplitude Total</b>	23	16	21	21
<b>Média</b>				
<b>Aritmética</b>	19,7	18,73	19,3	15,97
<b>Variância</b>	27,25	17,44	21,87	15,83
<b>Desvio Padrão</b>	5,22	4,18	4,68	3,98
<b>Erro Padrão</b>	0,95	0,76	0,85	0,73
<b>Coeficiente de Variação</b>	26.50%	22.29%	24.23%	24.92%

Legenda: (TLS OD 1º dia) - Testes Lacrimal de Schirmer olho direito 1º dia, (TFAVF OE 1º dia) - Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo 1º dia, e (TLS OD 2º dia) - Testes Lacrimal de Schirmer olho direito 2º dia, (TFAVF OE 2º dia) - Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo 2º dia.

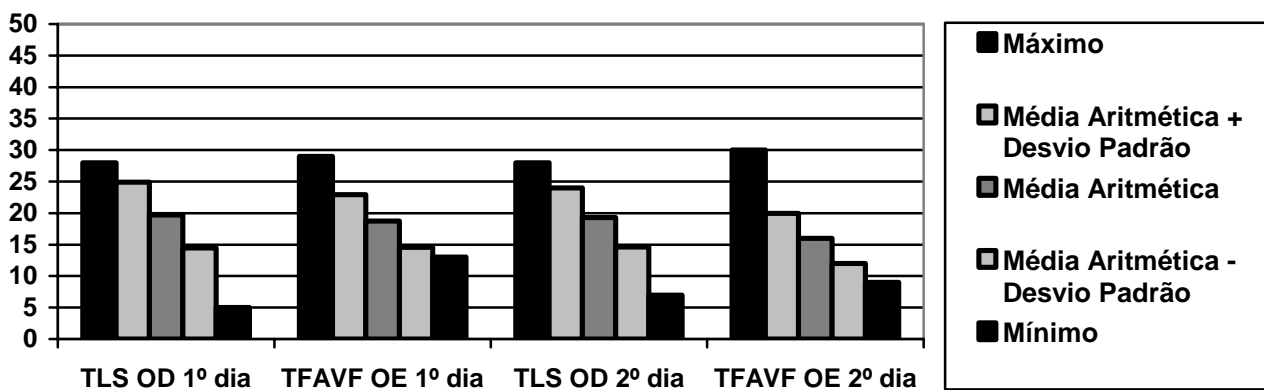


Gráfico 3: Apresenta os valores em milímetros/15 segundos para Zone Quick, TFAVF e TFAVB e milímetros/minuto para o TLS da Leitura de Mínimos e Máximos, Média Aritmética e soma e subtração de um Desvio Padrão a média aritmética, obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimal de Schirmer olho direito no 1º dia (TLS OD 1º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo no 1º dia (TFAVF OE 1º dia), e Testes Lacrimal de Schirmer olho direito no 2º dia (TLS OD 2º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo no 2º dia (TFAVF OE 2º dia) em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010

Ao analisar os resultados obtidos com teste anova e teste t, a comparação entre as médias aritméticas do TLS realizado no olho direito no 1º dia (1) e TFAVF realizado no olho esquerdo no 1º dia (2) , e do TLS realizado no olho esquerdo no 2º dia (1) com o TLS realizado no olho direito no 2º dia (3) foram consideradas não significativas, já entre o TLS realizado no olho direito no 2º dia (3) e TFAVF realizado no olho esquerdo no 2º dia (4), e TFAVF realizado no olho esquerdo no 1º dia (2) e TFAVF realizado no olho esquerdo no 2º dia (4), mostraram-se significativas.

Estes resultados mostram uma maior influência sobre a produção lacrimal reflexa pelo TLS na comparação com o TFAVF, pois quando o TFAVF (olho esquerdo) é realizado antes do TLS (olho direito) sua leitura média é 20,85% menor e se feito após é de 5,18%. Tal resultado pode ser explicado pelo menor tempo de realização do TFAVF (¼ do necessário para o TLS), pela largura onde a filipeta do TLS apresenta 5 milímetros de largura e o fio de algodão do TFAVF menos de 1 milímetro, além disto, segundo Williams (2005) para o TLS, nos primeiro 10 segundos ocorre, basicamente, a absorção da lágrima presente no fórnice conjuntival. Em seguida é predominantemente da produção basal e da reflexa.

Se usarmos estes parâmetros para o TFAVF que dura 15 segundos há pouco tempo para absorção da produção reflexa por ele gerada, sendo sua leitura influenciada principalmente pela absorção da lágrima presente no fórnice conjuntival. Estes dados podem ser vistos no gráfico 4.

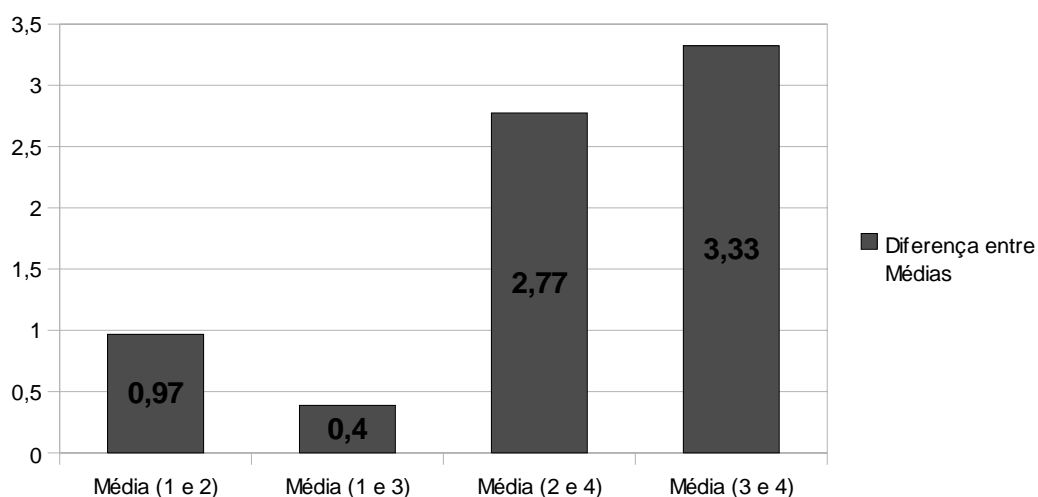


Gráfico 4: Diferença entre as médias aritméticas das leituras dos (1) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito (1º dia), (2) Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (1º dia), e (3) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito (2º dia), (4) Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (2º dia) em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010.

Quando comparados o TLS feito no olho direito e o TFAVB no olho esquerdo, o olho direito apresentou com o TLS as leituras mínima e máxima de 5 e 34 mm/min. com uma amplitude total de 29 mm/min., já o olho esquerdo com o TFAVB 10 e 26 mm/15 seg. e amplitude de 16mm/15seg., no segundo dia o olho direito com o TLS 2 e 28 mm/min. e 26mm/min de amplitude, o olho esquerdo 8 e 22 mm/15 seg. com 14 de amplitude.

As leituras com TLS demonstraram como médias aritméticas no olho direito 21,63 mm/minuto no primeiro dia (1) e 19,6 mm/minuto no segundo dia (2), já na feita com o TFAVB no olho esquerdo, foi de 17,63 mm/15 seg. no primeiro dia (3) e 16,27 mm/seg. no segundo dia (4) (Gráfico 5 e Tabela 6).

Assim como na padronização o TFAVB apresentou variância e erro padrão menores na comparação com os outros testes, ele também se mostrou nos dois dias de comparação entre este e o TLS, sendo assim menos susceptível a erros diagnósticos como falsos positivos ou negativos para CCS. Na comparação dos TFAVB e TLS, a diferença entre a variância e o erro padrão foi maior que a ocorrida entre os TLS e TFAVF.

Apesar desta vantagem, ao analisar os resultados obtidos com teste Anova e teste t na comparação entre as médias aritméticas TLS realizado no olho direito no 1º dia (1), TFAVF realizado no olho esquerdo no 1º dia (2), TLS realizado no olho direito na 2º dia (3) e TFAVF realizado no olho esquerdo no 2º dia (4), foram consideradas significativas as diferenças entre 1 e 2 e entre 3 e 4, já entre 1 e 3, e 2 e 4 são não significativas (Gráfico 6). Isto demonstra que o TFAVB não apresenta redução no estímulo de produção lacrimal reflexa como foi evidenciado na comparação entre o TLS e o TFAVF.

Tabela 6: Tamanho da amostra, valores mínimos e máximos, amplitude total, mediana, média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimais em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010.

	<b>TLS OD 1º dia</b>	<b>TFAVB OE 1º dia</b>	<b>TLS OD 2º dia</b>	<b>TFAVB OE 2º dia</b>
<b>Tamanho da amostra</b>	30	30	30	30
<b>Mínimo</b>	5	10	20	8
<b>Máximo</b>	34	26	28	22
<b>Amplitude Total</b>	29	16	26	14
<b>Média</b>				
<b>Aritmética</b>	21,63	17,63	19,60	16,27
<b>Variância</b>	37,14	15,41	33,08	13,51
<b>Desvio Padrão</b>	6,09	3,93	5,75	3,68
<b>Erro Padrão</b>	1,11	0,72	1,05	0,67
<b>Coeficiente de Variação</b>	28.17%	22.26%	29.34%	22.60%

Legenda: Teste de Schirmer olho direito (TLS OD) (1º dia), Teste Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (TFAVB OE) (1º dia), e Teste Lacrimal de Schirmer olho direito (TLS OD) (2º dia), Teste Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (TFAVB OE) (2º dia).

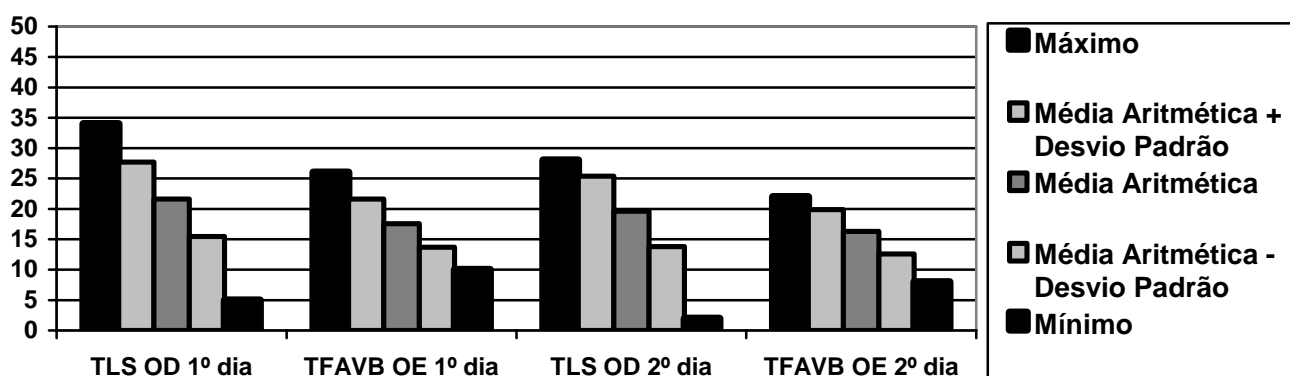


Gráfico 5: Valores mínimos e máximos, média aritmética e desvio padrão, obtidos pela análise das leituras dos Testes Lacrimal de Schirmer olho direito (TLS OD 1º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (TFAVB OE 1º dia), e Testes Lacrimal de Schirmer olho direito (TLS OD 2º dia), Fio de Algodão com Vermelho Fenol olho esquerdo (TFAVB OE 2º dia) em 30 cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010.

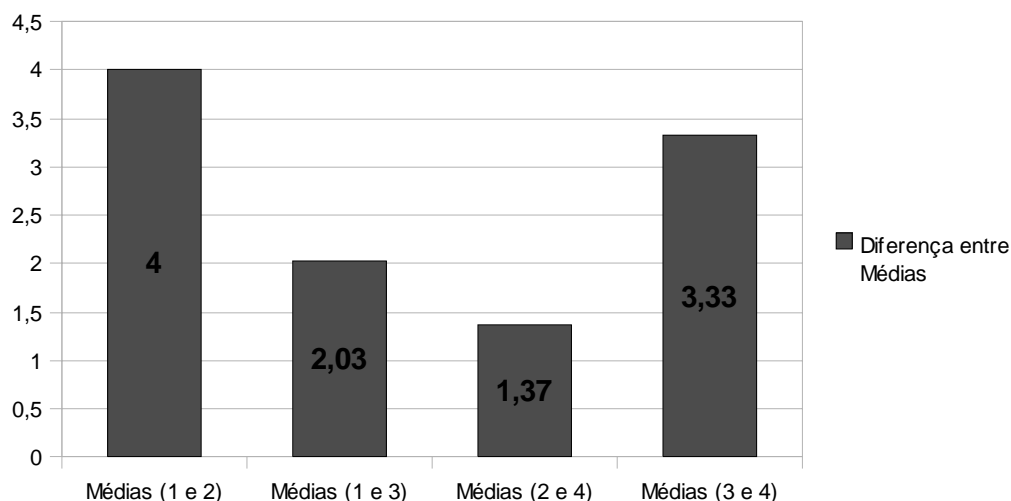


Gráfico 6: Diferença entre as médias aritméticas das leituras dos (1) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito (1º dia), (2) Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (1º dia), e (3) Testes Lacrimal de Schirmer olho direito (2º dia), (4) Fio de Algodão com Verde de Bromocresol olho esquerdo (2º dia) em cães Beagle, UFRRJ, Seropédica, 2010.

Ao se comparar os três testes de avaliação da produção lacrimal com o TLS, é possível determinar o TFAVB como o mais vantajoso dentre os quatro, em função de maior viragem na cor do indicador de pH e menor possibilidade de ocorrer um diagnóstico errado; já o TFAVF apresentou como vantagem o menor estímulo à produção lacrimal reflexa em relação ao TFAVB quando estes foram comparados ao TLS.

Durante os testes in vivo para a determinação da concentração ideal de solução de Verde de Bromocresol (0,2%, 0,1% ou 0,05%) com a qual o fio teste seria impregnado, na concentração de 0,2% um dos dez cães avaliados apresentou um leve quadro de irritação na realização do teste.

È provável que o maior estímulo à produção lacrimal reflexa pelo TFAVB em relação ao TFAVF se deva a um maior incomodo desencadeado pelo indicador de pH durante a realização do teste. Tal fato torna necessária a realização de mais estudos com o Verde de Bromocresol em concentrações menores, a um nível em que se mantenha a porcentagem de viragem da cor deste indicador de pH em 100%, no intuito de se tentar reduzir o estímulo à produção lacrimal reflexa, o que por conseqüência diminuiria o erro padrão e a possibilidade de erros no diagnóstico, tornando-o ainda mais vantajoso em comparação ao Vermelho Fenol.

## **5. Conclusão**

Dentre os fios testados neste experimento, o mais adequado para a produção de testes para medir a produção lacrimal é o 100% algodão TEX 85. Já entre as soluções testadas, o Verde de Bromocresol a 0,05% e Vermelho Fenol a 0,2% foram escolhidas como ideais para o experimento.

A técnica de leitura lacrimal com o fio de algodão impregnado com Verde de Bromocresol 0,05% e Vermelho Fenol a 0,2%, se mostrou melhor que o Teste Lacrimal de Schirmer, quanto à menor produção lacrimal reflexa; e melhor que o ZoneQuick® em relação à facilidade de realização do teste e a maior visibilidade de viragem da cor do indicador de pH.

O indicador de pH mais adequado para impregnar os fios, quando se considera o vermelho de fenol e o verde de bromocresol, é este último a 0,05% em solução alcoólica, em função da sua melhor visibilidade de viragem da cor do indicador de pH e menor erro padrão.

## **6. Anexos:**

### **6.1 Anexo 1 (Sistema Lacrimal):**

#### **1. Sistema Lacrimal**

A superfície ocular representa a interface entre o olho e o mundo. Diversas estruturas como os ossos da órbita, pálpebras, cílios, epitélio conjuntival e corneal e o filme lacrimal pré-corneano atuam juntos para garantir a qualidade desta superfície de refração e da visão (ROLANDO & ZIERHUT, 2001). No estudo do sistema lacrimal é necessário dividi-lo em duas porções: a secretora e a excretora. O funcionamento adequado em conjunto destas duas porções, é fundamental para manter a dinâmica do filme lacrimal pré-corneano. Esta divisão é importante visto que estes dois aparelhos apresentam doenças, semiologia e terapêutica distintas (SLATTER, 2005).

#### **1.1. Anatomia do Sistema lacrimal**

##### **1.1.1. Porção Secretora**

O sistema lacrimal é constituído de um conjunto de glândulas, que juntas produzem o filme lacrimal pré-corneano, onde a glândula lacrimal e a da membrana nictitante produzem a fase aquosa do filme lacrimal, e as fases lipídica e mucóide da lágrima são produzidas pelas glândulas

acessórias (tarsais e células caliciformes) (GRAHN & STOREY, 2004).

### **1.1.2. Glândula Lacrimal**

Esta glândula achatada fica alojada na fossa supra-orbitária, na região dorso lateral do globo ocular, abaixo do ligamento orbital no processo supra orbital do osso frontal, estando relacionada com a superfície do osso zigomático e tem cerca de 15 mm de comprimento e 12 mm de largura. Sua posição anatômica, a torna exposta e sensível a traumas na face (CLERC, 1986).

Produz e secreta boa parte da fase aquosa da lágrima, sendo responsável por cerca de 70 % a 85% do filme lacrimal total (GUM, 1991; SAITO et al., 2001). Em cães, a secreção produzida nos ácinos é liberada por três a cinco ductos microscópicos que desembocam no fórnix conjuntival superior (MOORE, 1999).

Ela é irrigada pela artéria oftálmica e interna, innervada pelas fibras sensitivas excito-motoras do nervo lacrimal e pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo, e por fibras excito-secretoras provenientes do ramo parassimpático do nervo facial. Por isto, fenômenos dolorosos na córnea, geram uma estimulação excessiva das terminações do nervo trigêmeo, levando a aumento da secreção (SLATTER, 2005).

### **1.1.3. Glândula Lacrimal da Membrana nictitante**

A glândula lacrimal da membrana nictitante localiza-se na superfície interna da membrana nictitante, na base da cartilagem em T que a recobre parcialmente. Ela apresenta semelhanças histológicas com a glândula lacrimal principal, o que explica o fato dela produzir o mesmo tipo de secreção serosa, sendo responsável por cerca de 15% a 30% do volume lacrimal total (CLERC, 1986; GUM et. al., 1999; HELPER, 1970). Sua produção é liberada na superfície corneal por múltiplos ductos que se abrem entre os folículos linfóides na face posterior em região medial da membrana nictitante (GRAHN & STOREY, 2004; ANDREWS, 1970). A sua innervação é semelhante a da glândula lacrimal principal, sendo a innervação destas duas glândulas essencialmente parassimpática, o que explica o fato de ocorrer marcante redução na produção lacrimal, quando é feita a aplicação de medicamentos parassimpatolíticos (anticolinérgicos) que inibem a ativação parassimpática, como a atropina. A innervação simpática também estimula a secreção (GUM et. al., 1999).



#### **1.1.4. Glândulas Acessórias**

Estão situadas dentro da conjuntiva e próximo às margens palpebrais, sendo responsáveis por produzir as fases lipídicas e mucínicas que representam cerca de 1 a 3% do filme lacrimal pré-corneano. As glândulas Tarsais ou Meibomiais e as células caliciformes são consideradas glândulas acessórias (MCLAUGHLIN et. al., 1988; PRINCE et. al., 1960).

As glândulas tarsais são glândulas sebáceas modificadas, sendo responsáveis pela secreção lipídica (DRIVER & LEMP, 1996). São glândulas halócrinas (devido a isto células inteiras e seu conteúdo são liberados) em forma de tubos, arranjadas linearmente na margem ocular palpebral, que desembocam na face palpebral interna. No cão, há cerca de 40 destas glândulas na margem palpebral tarsal e a contração do músculo orbicular é o principal responsável liberação da secreção lipídica (GRAHN & STOREY, 2004).

As células caliciformes da conjuntiva estão presentes dentro do saco conjuntival e apresentam um aparelho de Golgi que secreta a mucina (glicoproteína hidratada). Esta constitui a parte interna do filme lacrimal pré-corneano e sua secreção pode ser estimulada por histamina, antígenos, complexos imunes ou ação mecânica (CHANDLER & GILLETTE, 1983). O controle neural pode ser direto ou indireto (CORFIELD et. al., 1997), por inervação simpática e parassimpática (DARTT et. al., 1995), difusão de neuropeptídeos em fibras nervosas próximas, por estímulo indireto de córnea e conjuntiva (DARTT, 1994; CORFIELD et. al., 1997; DARTT et. al., 1995; RIOS et. al., 2000), e pela presença de receptores muscarínicos e alfa-adrenérgicos em células caliciformes imaturas, regulando a secreção diretamente (RIOS et. al., 2000).

## **2. Aparelho Excretor**

A eliminação da lágrima é realizada através dos pontos e canalículos lacrimais e ducto nasolacrimal. Externamente o aparelho excretor é composto da carúncula lacrimal e pelos pontos lacrimais. Estes prosseguem pelo canalículo lacrimal, saco lacrimal e o ducto nasolacrimal que se estende em direção ao óstio nasal (AGUIRRE et. al., 1972; EVANS et. al., 1979; MARTIN et. al., 1981)

São constituídos por uma mucosa coberta por um epitélio estratificado pavimentoso, que contém algumas glândulas mucosas e células ciliadas a quais contribuem para o fluxo lacrimal. A carúncula lacrimal é uma pequena protuberância presente no canto interno, que direciona a lágrima do lago lacrimal para o ponto lacrimal e evita a penetração de corpos estranhos nas vias excretoras lacrimais. Os pontos lacrimais têm formato mais ou menos oval e um diâmetro que varia de 0,5 a 1

mm encontrados a cerca de 2 a 5 mm do canto medial (limite nasal). Estas estruturas são rodeadas por musculatura lisa que trabalha em conjunto com o movimento palpebral movimentando a lágrima para dentro do ducto nasolacrimal (SAMUELSON, 1999).

A sua continuação se dá pelo canalículo lacrimal. O ponto lacrimal inferior é o responsável pela drenagem de quase 90% da secreção lacrimal. Os canalículos lacrimais superior e inferior se originam a partir dos pontos lacrimais e seguem em direção medial pela borda palpebral, unindo-se para formar o saco lacrimal (SLATTER, 2005). Este posicionamento torna esta estrutura vulnerável a lesões de pálpebra. Em cães, os canalículos são longos com comprimento variável de 3 a 7mm, e um diâmetro de 0,5 a 1 mm (CLERC, 1986).

O saco lacrimal está alojado numa depressão do osso lacrimal chamada de fossa lacrimal (SLATTER, 2005). É longo apresentando cerca de 2 a 5 mm de comprimento e 0,5 a 2 mm de largura em cães (BARNNET, 1998) e dá origem ao ducto nasolacrimal. O ducto nasolacrimal mede de 2 a 7cm (BARNNET, 1998) e passa pelo canal lacrimal (um conduto ósseo) sobre a superfície medial da maxila, realizando um trajeto intraósseo e intramucoso até se abrir na cavidade nasal pelo óstio nasolacrimal. Em cães a abertura ocorre no assoalho das narinas a cerca de 1 centímetro do seu fim. Às vezes ela pode abrir nos meatos medial ou ventral, ou até sobre os caninos superiores, com a presença de um canal que passa pelo canino superior (SAMUELSON, 1999).

### **3. Quadros Mórvidos do Sistema Lacrimal**

Instabilidades do filme lacrimal e ressecamento da superfície corneal, decorrem de alterações quantitativas ou qualitativas do filme lacrimal (CULLEN et. al., 1999), que apresentam sintomas parecidos como, blefarospasmo, secreção ocular e alterações corneais como úlcera (GRAHN & STOREY, 2004).

#### **3.1. Défices Quantitativos**

##### **3.1.1. Ceratoconjuntivite Seca**

A ceratoconjuntivite seca é uma doença comum em cães, cuja ocorrência estimada é de 1,0% (MOORE, 1999). Ela afeta principalmente a conjuntiva e a córnea causando inflamação (AGUIRRE et. al., 1971), daí o nome ceratoconjuntivite seca. A deficiência na porção aquosa do filme lacrimal, gera desde desconforto ocular (fotofobia, blefarospasmo e entrópico espástico),

descarga muco purulenta, conjuntivite até pigmentação, vascularização, edema, irregularidade da superfície e úlcera corneana, ressecamento ocular e nasal e em alguns casos perda visual (AGUIRRE et. al., 1971; SANSON & BARNETT, 1985; GRAHN & STOREY, 2004). Os sinais da ceratoconjuntivite seca dependem se a condição é bi ou unilateral, e se ocorre de forma aguda ou crônica, temporária ou permanente. Nos estágios finais de desenvolvimento da doença ocorre pigmentação completa da córnea e perda da sensibilidade da mesma com a destruição das terminações nervosas do nervo trigêmeo, razão pela qual a dor é relativamente bem tolerada, nesta fase de evolução da patologia (KASWAN et. al., 1985).

Dentre as principais etiologias da CCS, estão:

- Causas congênitas (AGUIRRE et. al., 1971) por agenesia ou hipoplasia acinar (WESTERMEYER et. al., 2009).
- Iatrogênicas, como CCS induzida por drogas como sulfonamidas e atropina com efeito tóxico sobre glândula lacrimal e da terceira pálpebra produzindo deficiência primária do componente aquoso da lágrima (AGUIRRE et. al., 1971) e pela extração cirúrgica da glândula da terceira pálpebra (ALMEIDA et. al., 2004).
- Trauma do olho ou região supra orbital resultando em lesão da glândula lacrimal ou suprimento nervoso (como na lesão do ramo oftálmico do nervo trigêmeo), blefaroconjuntivites crônicas (SANSON & BARNETT, 1985).
- Quadros mórbidos infecciosos causando adenites em cães incluindo enfermidades virais, como a cinomose canina, levam a CCS temporária ou permanente (SANSON & BARNETT, 1985; ALMEIDA et. al., 2009).
- Doenças metabólicas sistêmicas como o diabetes melito (CULLEN et. al., 2005), hipotireoidismo e síndrome de Cushing, podem alterar negativamente a produção lacrimal (WILLIAMS & MELLOR, 2007).
- Causas idiopáticas, como a atrofia senil das glândulas, com o avançar da idade, produção lacrimal decresce, desenvolvendo CCS (HARTLEY et. al., 2006) e processo auto-imune, onde as glândulas lacrimais e da membrana nictitante sofrem uma infiltração linfocitoplasmocitária acompanhada de fibrose importante, levando a uma destruição irreversível da glândula (BARNETT, 1998; KASWAN et. al., 1985).

## **3.2. Défices Qualitativos**

### **3.2.1. Deficiência de Mucina**

A deficiência na produção de mucina leva a perda de sua função protetora e lubrificante, e a quebra rápida do filme lacrimal sobre a córnea. Ocorre perda na estabilidade do filme lacrimal e conseqüente ressecamento corneal (MOORE, 1999), condição na qual surgem sinais clínicos similares a CCS. Conjuntivites, úlcera corneal indolente, ceratite pigmentar, vascularização e infiltração celular na córnea, são os sinais mais apresentados (GRAHN & STOREY, 2004). Sua etiologia ainda é pouco conhecida e tem sido associada com vários graus de inflamação conjuntival, suspeita-se de hipoplasia conjuntival (CULLEN et. al., 1999)

### **3.2.2. Deficiência Lipídica**

A redução na liberação do componente lipídico desestabiliza o filme e gera aumento na sua evaporação, contribuindo para o surgimento ou piora do quadro clínico da CCS. Em estudos sobre a produção da secreção lipídica pelas glândulas meibomianas, a raça Schnauzers miniaturas, que é predisposta a CCS, apresentou menor produção em comparação a outras raças (OFRI R. et. al., 2006). Tem como etiologias, blefarites, blefaroconjuntivites e meibomites extensas (CULLEN et. al., 1999). Não há correlação entre a patologia, idade e sexo no cão (OFRI R. et. al., 2006).

### **3.2.3. Epífora**

È um aumento progressivo da secreção lacrimal reflexa pela estimulação nervosa da córnea, mucosa conjuntival e nasal (SAITO & KOTANI, 1999) ou interrupção na drenagem (SCOTTI et. al., 2007). São normalmente associados com inflamação ocular (SCOTTI et. al., 2007). Anormalidades de pálpebra e cílios; desordens mecânicas ou funcionais do ponto, canalículo ou ducto nasolacrimal; e quadros mórbidos do epitélio corneal são importantes fatores causadores (SAITO & KOTANI, 1999).

## **3.3. Avaliação Qualitativa do Filme Lacrimal**

### **3.3.1. Tempo de Quebra do Filme Lacrimal**

O tempo de ruptura do filme lacrimal pré-corneano, é um método amplamente utilizado par avaliar a estabilidade do filme lacrimal, medido através da aplicação de fluoresceína sobre a córnea (BARABINO et. al., 2004). Após permitir o cerramento das margens palpebrais, para que a

fluoresceína core todo o filme lacrimal de verde, em seguida ao afastá-las, e usando uma lâmpada de fenda com filtro azul de cobalto, procura-se o surgimento de manchas escuras, em Beagles normais isto deve ocorrer após  $21,53 \pm 7,42$  segundos (SAITO & KOTANI., 2001). Este teste revela deficiências principalmente de mucina e em menor extensão da fase aquosa, permitindo a avaliação qualitativa do filme lacrimal através da estabilidade do mesmo (GUM, 1999; SAITO et. al., 2001). Na deficiência de mucina o tempo de ruptura do filme lacrimal está diminuído, sendo frequentemente muito baixo (inferior a 5 segundos), há hipoplasia das células caliciformes (exame histológico) e a secreção lacrimal aquosa está, em geral, normal ou subnormal com valores do teste lacrimal de Schirmer acima de 10 mm/min (CULLEN et. al., 1999; SAITO & KOTANI., 2001).

Este teste tem numerosos vieses como: quantidade de fluoresceína aplicada, tempo de começo após a instilação e a intensidade da luz do filtro azul de cobalto usado. Apesar disto, vem sendo relatada como muito útil para a avaliação da lagrima em cães (SAITO et. al., 2001).

## 6.2. Anexo 2

### 6.2.1. Parecer da Comissão de Ética sobre o Projeto de Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
DECANATO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo n°.

#### PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “Estudo e Padronização da Avaliação Quantitativa do Filme Lacrimal pelo Teste do Fio com Vermelho Fenol”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Telhado Pereira, atende os princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.

UFRRJ, 24 de março de 2010

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aurea Echevarria Aznar Neves Lima'.

**Profa. Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima**  
Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ

## 7. Referências Bibliográficas:

ADAMS A. D., Conjunctival surface mucus. In. Holly F. J., **The Preocular Tear Film in Health, Disease, and Contact Lens Wear**, Dry Eye Institute, Inc, Lubbock, Texas, p. 304–311, 1986.

AGUIRRE G.; RUBIN L.F.; BISTNER S. I., The development of the canine eye. **American journal of veterinary research** v. 33, p. 2399–2414, dez.1972.

AGUIRRE G. D., RUBIN L. F., HARVEY C. E. Keratoconjunctivitis sicca in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 158, p. 1566–1579, Mai. 1971.

ALMEIDA D. E., ROVERATTI C., BRITO F. L. C., GODOY G. S., DUQUE J. C. M., BECHARA G. H. and LAUS J. L.; Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca, Blackwell Publishing, Ltd. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, issue 4, p. 211–215, 2009.

AMIN A. S., Quantitative determination of some pharmaceutical veterinary formulations using bromocresol purple and bromocresol green. **Analitical Letters**, vol 30, nº14, p. 2503-2513

ASHUTOSH S. Energetics of corneal epithelial cell-ocular mucus–tear film interactions: some surface-chemical pathways of corneal defense. **Biophysical Chemistry**, v. 47, p. 87–99, 1993.

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**, v. 79, p. 613–621, 2004.

BARNETT K.C., CRISPIN S.M., Lacrimal System, **Feline ophthalmology**, WB Saunders, London, p. 61–68, 1998

BERGER S.L.; KING V.L. The fluctuation of tear production in the dog. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 79–83, jan/fev 1998.

BROWN M.H. The phenol red tear test in healthy cats. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, v. 7, p. 249-252, 1997.

CARRINGTON S.D. Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film.1 .

The normal tear film of the dog. **Journal Small Animal Practice**, v. 28, p. 605–622, 1987.

CHANDLER J. W., GILLETTE T. E., Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. **Ophthalmology**, v. 90, p. 585–591, 1983.

CLERC B. Epiphora et larmoiement ou « l'oeil qui pleure ». **Point Vétérinaire**, v. 18, p. 255–261 and 369-380, 1986.

CORFIELD A. P., CARRINGTON S. D., HICKIS S. J. et al. Ocular mucins: purification, metabolism, and functions. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 16, p. 627–656, 1997.

CULLEN C. L., NJAA B. L. and GRAHN B. H., Ulcerative Keratitis associated with qualitative tears film abnormalities in cats , Blackwell Publishing Inc., **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, issue 3, p. 197 – 204, Sep. 1999.

CULLEN C. L., IHLE S. L., WEBB A. A. and MC CARVILLE C., Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs, Blackwell Publishing, Ltd., **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, issue 4, p. 215–224, Jul-Ago 2005.

DARTT D. A., Regulation of tear secretion. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v 350, p. 1-10, 1994.

DARTT D. A., MCCARTHY D. M., MERCER H. J., KESSLER T. L., CHUNG E. H., ZIESKE J. D. Localization of nerves adjacent to goblet cells in rat conjunctiva. **Current Eye Research**, v. 14, p. 993–1000, 1995.

DAVIDSON H. J., KUONEN V. J., The tear film and ocular mucins, **Veterinary Ophthalmology** Blackwell Publishing Ltd., p. 7, issue 2, p. 71–77, 2004.

DEAN E. Techniques d'examen de l'oeil. In. **Ophthalmologie Du Chien**, Pratique Médicale & Chirurgicale d l'animal de compagnie; v. 32, p. 21–28, 1997.

DILLY P. N., Conjunctival cells, subsurface vesicles, and tear film mucus. In. Holly F. J., **The Preocular Tear Film in Health, Disease, and Contact Lens Wear**, Dry Eye Institute, Inc, Lubbock, Texas, p. 677–687, 1986



DRIVER P. J., LEMP M. A., Meibomian gland dysfunction. **Survey of Ophthalmology**, v. 40, p. 343–363, 1996.

EVANS H.E.; Christensen G.C. **Miller's anatomy of the dog**. 2<sup>a</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; p. 256–259, 1979.

GELATT K.N.; PEIFFER Jr. R.L.; ERICKSON J.L.; GUM G.G. Evaluation of tear formation in the dog using a modification of Schirmer tear test. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 166, p. 368–370, 1975.

GERMAN A. J., HALL E. J., DAY M. J. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 107–121, 1998.

GRAHN B. H., STOREY E. S., Lacrimostimulants and lacrimomimetics, **Veterinary Clinical Small Animal**, 34 (2004) 739–753

GUM G.G.; GELATT K. N.; OFRI R., Physiology of the eye. In: GELATT K. N., editor. **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: LEA and FEBIGER; p. 124–161, 1999.

HAKANSON N.W.; ARNESSON K. Temporal variation in tear production in normal beagle dogs as determined by Schirmer tear test. **Veterinary and Comparative Ophthalmology** v. 7, p. 196–203, 1997.

HARTLEY C., WILLINMS D. L., ADAMS V. J., Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs, **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, p. 53–57, Jan-Feb 2006.

HELPER L. The effect of lacrimal gland removal of the conjunctiva and cornea of the dog. **American Journal Veterinary Medical Association**. v. 157, p. 72–75, 1970.

HIDA R. Y., NISHIWAKI-DANTAS M. C., HIDA M. M., TSUBOTA K. Quantitative tears study using the red phenol test in the Brazilian population. Departamento de oftalmologia – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, n°4, July./Aug. 2005.

- HOLT E., ROSENTHAL K., and SHOFER F. S. The phenol red thread tear test in large Psittaciformes, **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n° 2, p. 109–113, 2006.
- IWATA S. Chemical composition of the aqueous phase. **International Ophthalmology Clinics**, v. 13, p. 29-46, 1983.
- KASWAN R.L., MARTIN C.L., DAWE D.L., Keratoconjunctivitis sicca: immunological evaluation of 62 canine cases. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 376-383, 1985.
- MARTIN C. L., ANDERSON C. B. Ocular anatomy. In: GELATT K. N., editor. Textbook of veterinary ophthalmology. Philadelphia: LEA and FEBIGER; 1981. p. 12–121.
- MCKENZIE R. W., JUMBLATT J. E., JUMBLATT M. M., Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, p. 703–708, 2000.
- MCLAUGHLIN S. A., BRIGHTMAN 2nd A. H., HELPER L. C., PRIMM N. D., BROWN M. G., GREELEY S. Effect of removal of lacrimal and third eyelid glands on Schirmer tear test results in cats. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 820–822, 1988.
- MOORE C. P. Qualitative tear film disease in small animal ophthalmology. **Veterinary Clinical North American Small Animal**, v. 20, p. 565–581, 1990.
- MOORE C. P. Diseases and Surgery of the Lacrimal Secretory System, . In: GELATT K. N., editor. **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: LEA and FEBIGER; p. 583-608, 1999.
- NICHOLS B.A., CHIAPPINO M.L., DAWSON C.R. Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 26, p. 464–473, 1985.
- OFRI R., ORGAD K., Philip H. KASS P. H., DIKSTEIN S., Canine meibometry: Establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs, **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 536–540, 2007.

PICCIONE G. GIANNETTO, C., FAZIO F., ASSENZA A., CAOLA G. Daily rhythm of tear production in normal dog maintained under different Light/Dark cycles **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 521–524, 2009.

POWELL C. C, MARTIN C. L. Distribution of cholinergic and adrenergic nerve fibers in the lacrimal glands of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 2084–2088, 1989.

PRINCE J. H., DIESEN C. D., EGLITIS I., RUSKELL G. L., **Anatomy and histology of the eyes and orbit in domestic animals**. Springfield: CC Thomas; p. 220–225, 1960.

RIOS J. D., FORDE K., DIEBOLD Y. et al. Development of conjunctival goblet cells and their neuroreceptor subtype expression. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, p. 2127–2137, 2000.

ROLANDO M. D., ZIERHUT M. D., The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease, **Survey of Ophthalmology**, v. 45, issue 2, p. S203-S209, Mar. 2001.

SAITO A., IZUMISAWA Y., YAMASHITA K., KOTANI T. The effect of third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, p. 13–18, mar. 2001.

SAITO A, KOTANI T., Stimulation of lacrimal level and testing methods on normal Beagle, **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, p. 7-11, 2001.

SAMUELSON D. A. Ophthalmic Anatomy, In: GELATT K. N., editor. **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: LEA and FEBIGER; p. 31-150, 1999

SANSOM J., BARNETT K. C. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 26, p. 121–131, 1985.

SCOTTI S., KLEIN A., ANORE M. V., HIDALGO A., AYOLLE P. F AND MOISSONNIER P., A new surgical method for the control of the epiphora in dogs: modified parotid duct transposition, **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, issue 5, p. 279–282, May. 2007.

SLATTER D., Lacrimal System. **Fundamentals of Ophthalmology Veterinary** 3rd. W. B. Saunders Company, 2005, p.259-282

STILES J, MCDERMOTT M, BIGSBY D, WILLIS M, MATIN C, ROBERTS W, GREENE C. Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpes virus in ocular tissues from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 338–342, Apr. 1997.

STRUBBE D. T., GELATT K. N., Ophthalmic Examination and Diagnostic Procedures, In: GELATT K. N., editor. **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: LEA and FEBIGER; p. 427-466, 1999.

TERCI D. B. L. AND ROSSI A. V., Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?. **Química Nova**. Vol. 25, nº 4, 684-688

TROST K., SKALICKY M. AND 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.

WESTERMEYER H. D., WARD D. A. and ABRAMS K., Breed predisposition to congenital alacrima in dogs, Blackwell Publishing Inc., **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, issue 1, p. 1–5 Jan-Feb. 2009.

WILLIAMS D. L., Analysis of tear uptake by the Schirmer tear test strip in the canine eye, Blackwell Publishing, Ltd., **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, nº 5, p. 325–330, Sep. 2005.

WILLIAMS D. L, PIERCE V., ELLOR P. M. and HEATH M. F., Reduced tear production in three canine endocrinopathies, **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, issue 5, p. 252–256, May. 2007.