

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIAS CLÍNICAS

DISSERTAÇÃO

**Padronização do Teste de Cristalização da Lágrima e Comparação com o
Teste Lacrimal de Schirmer para o Diagnóstico Precoce da
Ceratoconjuntivite Seca em Cães**

Eriane de Lima Caminotto

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA E
COMPARAÇÃO COM O TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER PARA O
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

ERIANE DE LIMA CAMINOTTO

Sob a orientação do Professor Doutor

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 Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

Ao professor e amigo João Telhado, que me trilhou não só no caminho da Oftalmologia Veterinária, mas na vida de maneira geral. Obrigada por todos os ensinamentos e pela confiança durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio e confiança durante todos esses anos longe de casa. Obrigada por tudo!

Aos meus animais: Xuxa, Gabriela e Laís pelo companheirismo e amor incondicional. Obrigada por me mostrarem como é gratificante o convívio diário com os animais.

À Patrícia Souza que me proporcionou o contato com o professor João Telhado e consequentemente com a Oftalmologia Veterinária. Obrigada pela sua presença diária na minha vida e por toda força e confiança depositada em mim.

A todos os cães que participaram deste estudo, pois nada disso aconteceria sem a contribuição de vocês.

Aos amigos Renata Novais, Patrícia Souza, Priscylla Santiago, Francisco Ribeiro e Nelson Júnior por participarem como examinadores no meu estudo.

Aos colegas de Pós-graduação pela companhia e apoio durante esses dois anos de convivência.

Às secretárias do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, Regina e Lorena, muito obrigada por toda paciência e ajuda que me deram durante essa trajetória.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Prof. Fabio Scott pelo suporte oferecido sempre que necessário.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, professor Paulo Botteon, pelo auxílio e disponibilidade com a estatística da minha dissertação e à professora Rita de Cássia Campbell Botteon, pelas dicas e pela incansável ajuda desde o início.

RESUMO

CAMINOTTO, Eriane de Lima. **Padronização do Teste de Cristalização da Lágrima e Comparação com o Teste Lacrimal de Schirmer para o Diagnóstico Precoce da Ceratoconjuntivite Seca em Cães.** 2012. 54p Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O presente trabalho verificou a exequibilidade e padronizou o teste de cristalização da lágrima (TCL), para avaliar a qualidade do filme lacrimal dos cães, visando em conjunto com o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o diagnóstico mais preciso dos tipos de CCS. Os sinais clínicos de cento e dez olhos de cães foram avaliados com o oftalmoscópio direto e todos foram submetidos, nesta ordem, ao TLS e TCL. As fotos do TCL foram analisadas e classificadas, de acordo com o modelo proposto pela Medicina Humana, em padrão I, II, III ou IV, por cinco examinadores com experiências diversas com relação ao TCL. Decorrente da dificuldade apresentada durante essa classificação, já que na espécie canina não há um padrão equivalente ao I dos humanos, um modelo para o TCL nessa espécie foi padronizado. A realização desse teste permitiu o diagnóstico precoce de CCS naqueles animais que mantinham valores normais no TLS e que ainda não apresentavam sinais clínicos dessa patologia.

Palavras-chave: filme lacrimal, cristalização, olho seco.

ABSTRACT

CAMINOTTO, Eriane de Lima. **Standardization of the Tear Crystallization Test and Comparison with the Schirmer test Lacrimal for Early Diagnosis of Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs.** 2012. 54p Dissertation (Master's Degree in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

This study assessed the feasibility and standardized test of crystallization of the tear (TCL), to assess the quality of the tear film of dogs, targeting in conjunction with the Schirmer test Lacrimal (TLS), a more accurate diagnosis of the types of CCS. Clinical signs of one hundred ten eyes of dogs were evaluated with the direct ophthalmoscope and all were submitted in this order, the TLS and TCL. The photos of the TCL were analyzed and classified according to the model proposed by Human Medicine in Standard I, II, III or IV by five examiners with diverse experiences in relation to TCL. Due to the difficulty presented in this classification, as in dogs there is no standard equivalent to the human I, a model for the TCL this species has been standardized. The realization of this test allowed the early diagnosis of CCS in those animals that maintained normal values in the TLS and still no clinical signs of disease.

Keywords: tear film, crystallization, dry eye.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema Lacrimal

2.2 Aparelho Secretor

- 2.2.1 Camada lipídica
- 2.2.2 Camada aquosa
- 2.2.3 Camada mucosa
- 2.2.4 Dinâmica do filme lacrimal

2.3 Aparelho Excretor

2.4 Avaliação Quantitativa do Filme Lacrimal

- 2.4.1 Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

2.5 Avaliação Qualitativa do Filme Lacrimal

- 2.5.1 Teste de ruptura do filme lacrimal (BUT)
- 2.5.2 Teste de cristalização do filme lacrimal

2.6 Ceratoconjuntivite Seca (CCS)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Princípios Éticos na Experimentação Animal

3.2 Animais

3.3 Material utilizado

3.4 Métodos

- 3.4.1 Isolamento dos animais
- 3.4.2 Avaliação oftalmológica dos cães
- 3.4.3 Realização do teste lacrimal de Schirmer (TLS)
- 3.4.4 Realização do teste de cristalização da lágrima (TCL)
- 3.4.5 Análise estatística

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnóstico dos Animais com CCS Quantitativa

4.2 Avaliação do Teste de Cristalização da Lágrima (TCL)

4.3 Padronização do Teste de Cristalização da Lágrima (TCL)

4.4 Comparação entre os casos de CCS Quantitativa e Qualitativa

5 CONCLUSÃO

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

ANEXO D

ANEXO E

ANEXO F

ANEXO G

ANEXO H

1 INTRODUÇÃO

A incidência de ceratoconjuntivite seca (CCS) canina é elevada na Clínica Veterinária. Porém, ainda, são inúmeros os casos erroneamente ou não diagnosticados, o que justifica os esforços para melhoria e adequação de novas técnicas de diagnóstico (CRISPIN, 2002; GIULIANO; MOORE, 2007).

Atualmente, o diagnóstico de CCS é confirmado com base nos sinais clínicos típicos (secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, neovascularização, edema e pigmentação corneana), e através da avaliação qualitativa e quantitativa da lágrima pelo teste de quebra do filme lacrimal (BUT) e Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), respectivamente. No entanto, cães com distúrbios das glândulas tarsais e das células caliciformes conjuntivais podem apresentar sinais clínicos de CCS, mas mantêm as medidas do TLS geralmente dentro do padrão de normalidade (KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

O filme lacrimal pré-corneano é formado por três camadas sobrepostas (mucínica interna, aquosa intermediária e lipídica externa) que são funcionalmente necessárias para a lubrificação, proteção, nutrição e garantia de uma superfície corneana lisa e transparente; quando um dos componentes deste filme é insuficiente ou de qualidade inferior, os sinais de CCS começam a ser observados (KOCH; SYKES, 2002; CRISPIN, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

Muitos casos de CCS não são diagnosticados ou são erroneamente tratados. Visto que o TLS avalia apenas a produção quantitativa da porção aquosa da lágrima e o BUT, exame único na Medicina Veterinária avalia a qualidade das camadas do filme lacrimal, porém é de difícil realização e bastante subjetivo (CRISPIN, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

Considerando as limitações ao diagnóstico da CCS em MV, objetiva-se verificar a exeqüibilidade e padronizar o teste de cristalização da lágrima na espécie canina, face a simplicidade, baixo custo e possibilidade, em Medicina Veterinária, do diagnóstico mais preciso dos casos de CCS em que o TLS se encontra dentro da normalidade, mas a qualidade do filme lacrimal está ruim.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema Lacrimal

O sistema lacrimal é constituído pelos aparelhos secretor e excretor. O secretor formará o filme lacrimal pré-corneano e é composto pela glândula lacrimal principal da órbita, glândula da membrana nictitante, glândulas acessórias, glândulas de Meibômio e células caliciformes da conjuntiva. O excretor drenará o filme lacrimal e é composto pelos orifícios e canalículos lacrimais, ducto nasolacrimal e ponto nasal (SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

2.2 Aparelho Secretor

O filme lacrimal pré-corneano é constituído por três camadas distintas: lipídica (mais externa), aquosa (intermediária) e mucosa (mais interna). Suas funções incluem o suprimento primário de oxigênio para a córnea, lubrificação entre as pálpebras e a superfície ocular, suprimento de proteínas antimicrobianas e remoção de debris e células esfoliativas através da drenagem (KOCH; SYKES, 2002; CRISPIN, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008; PICCIONE, 2009).

Anteriormente se estimava que a espessura do filme lacrimal no centro da córnea era de 7 a 10 μm (GRAHN; STOREY, 2004). Hoje, acredita-se que o componente predominante do filme lacrimal pré-corneano é a camada mucosa, ao invés da aquosa, e a espessura total varia de 35 a 45 μm em humanos; porém, ainda são necessários mais estudos sobre a composição e espessura do filme lacrimal pré-corneano nas demais espécies (GIULIANO; MOORE, 2007).

2.2.1 Camada lipídica

A camada lipídica é a mais superficial do filme lacrimal pré-corneano secretado pelas glândulas de Zeiss e especialmente pelas glândulas Tarsais ou Meibomianas. É composta por uma mistura de lipídeos polares e não polares e permanece fluida a 35° Celsius. Essa camada é constituída por colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios, e a fração polar (fosfolipídeos) fica em contato com a camada aquosa do filme lacrimal e a apolar com o ar (DAVIDSON; KUONEN, 2004; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

A espessura dessa camada é relativamente pequena e varia, no cão, de 0,013 a 0,6 μm . Forma uma única camada elástica que cobre a fase aquosa, ligando o filme lacrimal pré-corneano às margens palpebrais inferior e superior. Devido à sua alta tensão superficial, previne o transbordamento do filme lacrimal pré-corneano. Além disso, diminui a evaporação da camada aquosa, aumenta o tempo de quebra do filme lacrimal e a sua osmolaridade (DAVIDSON; KUONEN, 2004; COLITZ, 2008).

A redução na liberação do componente lipídico desestabiliza o filme lacrimal e gera aumento na sua evaporação, contribuindo para o surgimento ou piora do quadro clínico de CCS (OFRI et al., 2006).

2.2.2 Camada aquosa

A fase aquosa representa 60% do filme lacrimal pré-corneano e é secretada pelas glândulas lacrimal principal, da membrana nictitante e glândulas de Krause e de Wolfring. Em sua composição há 98,2% de água e 1,8% de materiais sólidos como minerais, proteínas, glicose e células sanguíneas (IWATA, 1983; GELATT, 2003; COLITZ, 2008).

Em cães, a concentração de proteínas na fase aquosa da lágrima é de 3,5 a 6,2 mg/mL, e é composta principalmente de globulinas (93%, principalmente de imunoglobulinas A e G); albumina (4%); lisozimas (3%) e lactoferrinas (GUM et al., 1999; GELATT, 2003).

A fase aquosa promove a lubrificação dos epitélios corneano, conjuntival e da membrana nictitante, facilitando a passagem das pálpebras e membrana nictitante sobre a córnea. Possui ainda a função de proteção, pois remove material estranho, metabólitos provenientes da córnea (dióxido de carbono, ácido lático, entre outros) e debris celulares (MOORE, 1999). Tem propriedades antibacterianas por conter células inflamatórias (atraídas por influências quimiotáticas durante a inflamação), anticorpos e enzimas como lactoferrinas e lisozimas (GERMAN et al., 1998; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008). A fase aquosa nutre a superfície corneana ao fornecer glicose, sais minerais e proteínas além de atuar como meio de transferência do oxigênio atmosférico. Contribui, também, em conjunto com as camadas lipídica e mucínica, para que superfície da córnea seja lisa e tenha ótima eficiência óptica. O conteúdo de mucina dispersa atua facilitando a distribuição e aderência da camada aquosa, contribuindo para a viscosidade e o perfeito funcionamento do filme lacrimal (MOORE, 1999; GELATT,

2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008; PICCIONE, 2009).

2.2.3 Camada mucosa

A camada mucosa é formada pela secreção das células caliciformes da conjuntiva (GELATT, 2003; GRAHN; STOREY, 2004; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008). No cão, as células caliciformes são encontradas em maior densidade no fórnix conjuntival e é a principal fonte de mucina, que é uma glicoproteína hidratada (GIULIANO; MOORE, 2007).

Esta camada é composta por mucina, imunoglobulinas, uréia, sais, glicose, leucócitos, debris celulares e enzimas que auxiliam na manutenção da superfície ocular lisa, lubrificam a córnea e a conjuntiva, ancoram a porção aquosa do filme lacrimal ao epitélio da córnea e inibem a aderência de bactérias (MCKENZIE et al., 2000; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

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 corneano (MOORE, 1999), condição na qual surgem sinais clínicos similares de CCS. Conjuntivites, úlcera corneal indolente, ceratite pigmentar, neovascularização e infiltração celular corneana 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).

2.2.4 Dinâmica do filme lacrimal

O filme lacrimal é totalmente renovado em poucos minutos. A secreção basal do filme é de 0,5 a 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, porém esta produção pode variar ligeiramente num mesmo indivíduo ao longo do dia (HAKANSON et al., 1997; BERGER et al., 1998). Variações de 2 milímetros na produção lacrimal ao longo do dia são evidenciadas com o teste de Schirmer; sendo que o pico de produção máxima ocorre as 20:00 horas e a mínima as 08:00 horas. Embora pequena esta variação é significativa e pode ter implicações fisiológicas (PICCIONE, 2008).

O controle da secreção é multifatorial e isto ainda não foi completamente elucidado. A inervação parassimpática estimula as glândulas lacrimais e as 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 andrógenos, 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, como também da motilidade ocular e da integridade anatômica e funcional das pálpebras (14 piscadelas por minuto em cães). Se a oclusão não é completa, a eficácia dos movimentos palpebrais cai a 45% (CARRINGTON, 1987; DEAN, 1997).

A cada piscar de pálpebras, a fração lipídica é secretada e forma uma fina, porém resistente camada entre as duas margens palpebrais (MOORE, 1999). 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 sofre uma força centrípeta que a espalha em direção ao centro da córnea. Os movimentos palpebrais e do globo promovem o aumento e a diminuição do saco conjuntival e o contato entre a conjuntiva palpebral e a córnea; dessa forma a mucina se espalha sobre a córnea preenchendo as microvilosidades e atuando como um elo entre a camada aquosa e a córnea (GUM et al., 1999). Em cães, o papel de distribuição do filme lacrimal é também atribuído à membrana nictitante (GRAHN; STOREY, 2004).

2.3 Aparelho Excretor do Filme Lacrimal

No cão, os pontos lacrimais são aberturas de formato oval de aproximadamente 0,3 mm, localizadas na conjuntiva palpebral, na borda das pálpebras superior e inferior, dois a cinco milímetros do canto medial. Os pontos são as aberturas dos canalículos superior e inferior, os quais possuem aproximadamente 4 a 7 mm de comprimento e 0,5 e 1 mm de diâmetro. Os canalículos se estendem através do músculo orbicular do olho e se unem ventral ao canto medial para formar o saco lacrimal pouco desenvolvido. O ducto nasolacrimal termina em um ponto nasal, que usualmente localiza-se no meato nasal ventrolateral, abrindo-se, aproximadamente, 1 cm para dentro das narinas externas (Figura 1). Em torno de 50% dos cães, o ducto nasolacrimal tem uma segunda abertura na mucosa oral do palato duro central, atrás dos incisivos, no nível dos dentes caninos

(GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

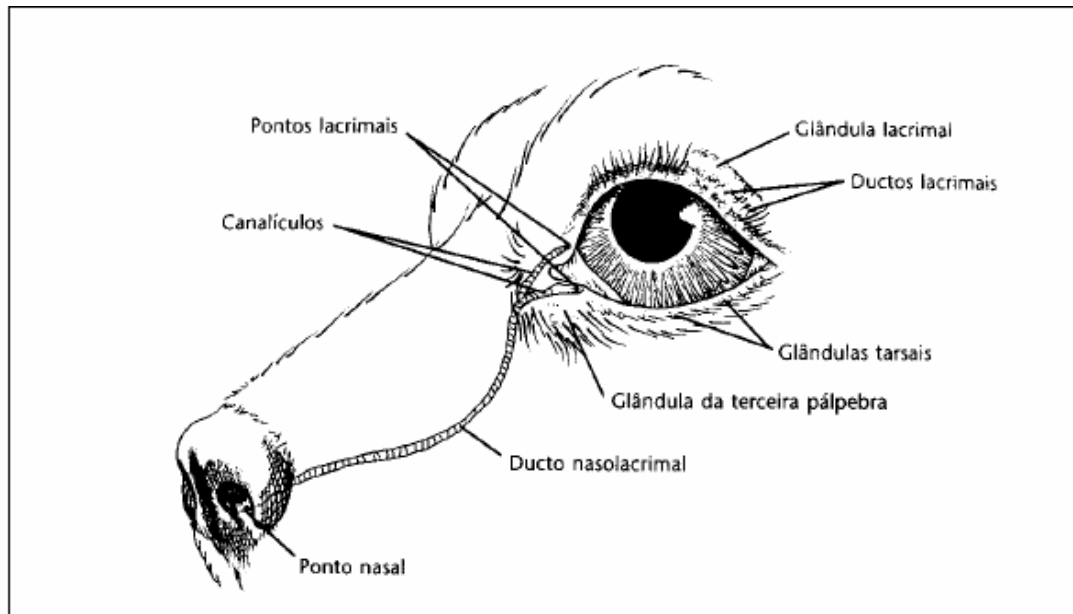


Figura 1: aparelho excretor do filme lacrimal (SLATTER, 2005)

A maior parte do filme lacrimal se acumula, em função da gravidade, no fórnice conjuntival inferior, formando um lago lacrimal. A maior parte deste fluido penetra o ponto lacrimal inferior por capilaridade e pelo movimento das pálpebras (SLATTER, 2005). O músculo orbicular contribui para a drenagem da lágrima pelo ponto lacrimal, durante o fechamento das pálpebras, a parede do saco lacrimal é tensionada, criando uma pressão menor no lúmen, fazendo com que a lágrima o adentre, dando-se a este mecanismo o nome de bomba lacrimal. A produção e secreção 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 (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

2.4 Avaliação Quantitativa do Filme Lacrimal

2.4.1 Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)

Este método foi desenvolvido por Schirmer em 1903 e a partir de 1991 com o uso de tiras de papel Whatman 41 para padronizar o procedimento passou a ser amplamente utilizado (BARABINO et al., 2004). O teste promove a exploração

quantitativa da produção da fase aquosa do filme lacrimal pré-corneano, através do uso de uma tira de papel filtro medindo (0,5 x 5,0 cm) graduada de 5,0 em 5,0 mm. Para a realização do teste insere-se 0,5 cm da tira no fórnix conjuntival inferior (GELATT et al., 1975; STRUBBE; GELATT, 1999).

O teste dura um minuto e os resultados são apresentados em milímetros por minuto. Recomenda-se manter as pálpebras abertas, mas o seu fechamento pouco interfere no resultado da leitura final. A lágrima é absorvida pelo papel graduado, saturando-o. Nos primeiros 10 segundos, 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, visto que inicialmente o papel absorve principalmente a lágrima presente no fórnix conjuntival e depois a produção lacrimal basal e reflexa (causada em parte pela irritação originada pela fita utilizada no teste) (WILLIAMS, 2005).

O teste com tiras de papel Whatman 41 é baseado no Teste de Schirmer I, medindo o total de secreção lacrimal, ou no Teste de Schirmer II onde após a instilação de anestésico tópico e secagem do fórnix conjuntival mede-se principalmente a produção basal de lágrimas (PICIONE et al., 2009).

Mesmo com o uso de colírio anestésico, a presença de secreção lacrimal reflexa tem sido observada (BARABINO et al., 2004). Em cães são considerados normais resultados entre 15 e 25 mm/min., sendo que resultados entre 8 e 15 mm/min. são considerados suspeitos e abaixo de 8 mm/min. é diagnosticado a ceratoconjuntivite seca (SLATTER, 2005).

2.5 Avaliação Qualitativa do Filme Lacrimal

2.5.1 Tempo de ruptura do filme lacrimal (BUT)

O tempo de ruptura do filme lacrimal é medido através da aplicação do colírio de fluoresceína a 0,5% sobre a córnea (BARABINO et al., 2004). Depois se promove algumas batidas palpebrais para que a fluoresceína core todo o filme lacrimal de verde. Usando a lâmpada de fenda com o filtro azul de cobalto, avalia-se o surgimento de manchas escuras logo após a última batida palpebral, que em cães normais da raça Beagle deve ocorrer após $21,53 \pm 7,42$ segundos (SAITO; KOTANI, 2001).

Este teste revela principalmente deficiências de mucina e em menor extensão da fase aquosa, permitindo a avaliação qualitativa do filme lacrimal e da estabilidade da película (GUM, 1999; SAITO et al., 2001).

Na deficiência de mucina o tempo de ruptura do filme lacrimal está diminuído, sendo freqüentemente inferior a 5 segundos. Neste caso, uma hipoplasia das células caliciformes pode ser observada histologicamente. A secreção lacrimal aquosa pode estar normal ou subnormal, com valores do teste lacrimal de Schirmer acima de 10 mm/min. (CULLEN et al., 1999; SAITO; KOTANI, 2001).

Embora este teste apresente baixos custos e aparentemente seja de fácil realização, numerosos vieses são observados: quantidade de fluoresceína aplicada, tempo do começo após a instilação e a intensidade da luz do filtro azul de cobalto usado. (SAITO; KOTANI, 2001).

2.5.2 Teste de cristalização do filme lacrimal

O primeiro estudo sobre a formação de cristais a partir da evaporação de amostras lacrimais humanas data de 1791. No entanto, somente dois séculos depois, após as publicações de outros pesquisadores (ROLANDO, 1958; TABBARA; OKUMOTO, 1982; ROLANDO, 1984; NORN, 1987), esta modalidade de avaliação do filme lacrimal passou a ser mais freqüentemente encontrada nos artigos científicos.

A técnica é simples: a lágrima é coletada do saco conjuntival, com um tubo capilar de vidro e colocada numa lâmina, no centro de um círculo feito previamente com uma caneta azul. A formação de cristais ocorre a partir de componentes da lágrima que se estruturam em formatos variados, lembrando a forma de folhas samambaia na microscopia. Os cristais são avaliados quanto à forma da cristalização e classificados em quatro graus de acordo com a presença e a exuberância das ramificações em formato de folhas (FELDBERG et al., 2008).

A existência de diferenças nos resultados obtidos entre pacientes normais e pacientes com quadros mórbidos lacrimais de diferentes etiologias foi demonstrada por Rolando (1984).

O mecanismo de formação dos cristais, ainda não é consenso (LIOTET et al., 1987). O cloreto de sódio, a mucina ou ambos são fatores sugeridos e importantes na qualidade e osmolaridade da lágrima (ROLANDO et al., 1986; LIOTET et al., 1987;

WYON; WYON, 1987).

No teste *in vitro*, glicoproteínas similares a mucina foram dissolvidas em água destilada, e não demonstraram a formação de ramificações semelhantes a folhas de Samambaia. Acredita-se que a interação entre eletrólitos, principalmente o cloreto de sódio e mucina, e a variação na concentração destes na lágrima sejam a causa desta formação (ROLANDO, 1958).

O teste de cristalização do filme lacrimal vem sendo utilizado, com excelentes resultados, para o diagnóstico e estudo de diferentes doenças oculares humanas (FELDBERG et al., 2008). Entretanto, em Medicina Veterinária ainda não há parâmetros estabelecidos para o mesmo.

2.6 Ceratoconjuntivite Seca (CCS)

A ceratoconjuntivite seca é uma doença comum em cães que pode ocorrer devido à deficiência quantitativa ou qualitativa do filme lacrimal pré-corneano, ou ainda por uma combinação de ambas. Em casos de deficiência quantitativa há uma diminuição na porção aquosa da lágrima. Já os casos de deficiência qualitativa são caracterizados por anormalidades nas porções lipídica e/ou mucínica do filme lacrimal. Esta afecção também pode ocorrer em indivíduos da espécie humana, gatos e eqüinos. No cão, acredita-se que a causa mais comum de CCS seja de origem imunomediada (GELATT 1999; KOCH; SYKES, 2002; SLATTER, 2005, HERRERA et al., 2007); porém diversas outras etiologias são descritas abaixo:

- Causas congênitas por agenesia ou hipoplasia acinar (CRISPIN, 2002; KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA et al., 2007; COLITZ, 2008; WESTERMEYER et al., 2009).

- Iatrogênicas, como CCS induzida por drogas como sulfonamidas e atropina com efeito tóxico sobre a glândula lacrimal e da terceira pálpebra produzindo deficiência primária do componente aquoso da lágrima e pela extração cirúrgica da glândula da terceira pálpebra (CRISPIN, 2002; KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; ALMEIDA et al., 2004; SLATTER, 2005; HERRERA et al., 2007; COLITZ, 2008).

- Trauma ocular ou da região supra orbital resultando em lesão da glândula lacrimal ou do suprimento nervoso (STADES et al., 1999; SLATTER, 2005) e os casos de neoplasias nessas glândulas (STADES et al., 1999; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008).

- Quadros mórbidos infecciosos causando adenites em cães incluindo enfermidades virais, como a cinomose canina, levam a CCS temporária ou permanente (BRITO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009).

- Doenças metabólicas sistêmicas como o diabetes melito, hipotireoidismo e Síndrome de Cushing, podem alterar negativamente a produção lacrimal (CRISPIN, 2002; KOCH; SYKES, 2002; GELATT, 2003; WILLIAMS; MELLOR, 2007).

- Causas idiopáticas, como a atrofia senil das glândulas causando CCS (STADES et al., 1999 CRISPIN, 2002; HARTLEY et al., 2006) e os processos auto-imunes; onde as glândulas lacrimais e da membrana nictitante sofrem uma infiltração linfocitoplasmocitária acompanhada de fibrose importante, levando a uma destruição irreversível da glândula (HARTLEY et al., 2006).

Esta afecção é geralmente bilateral e, apresenta como principais sinais clínicos: desconforto ocular, fotofobia, blefarospasmo, opacificação da córnea, secreção ocular mucopurulenta, hiperemia conjuntival, ceratite pigmentar, neovascularização e úlceras corneanas (KOCH; SYKES, 2002; GELATT 1999; SLATTER, 2005, COLITZ, 2008).

O diagnóstico é baseado no histórico, nos sinais clínicos, no teste de quebra do filme lacrimal e no Teste Lacrimal de Schirmer reduzido. O meio primário de tratamento dessa doença é medicamentoso, através da utilização de agentes imunomoduladores, antiinflamatórios, antibióticos, mucolíticos e substitutos da lágrima. Os casos que não respondem a terapia medicamentosa devem ser reavaliados antes de serem submetidos à terapia cirúrgica (KOCH; SYKES, 2002; GELATT 1999; SLATTER, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Princípios Éticos na Experimentação Animal

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 do bem estar animal conforme a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV. O número do protocolo para submissão do projeto de pesquisa à comissão de ética é 139/2011.

3.2 Animais

Foram empregados 55 cães (*Canis familiares*) da raça Beagle, machos e fêmeas com idade entre 6 meses e 10 anos, todos identificados por chips, pertencentes ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Todos os animais foram mantidos em canis com boas condições de higiene, com abrigo, água e comida à vontade. A seleção dos cães foi feita de forma aleatória, incluindo cães sem alterações oculares e cães com sinais clínicos de CCS de modo a padronizar o teste.

3.3 Material utilizado

A avaliação oftalmológica dos animais e a mensuração da produção do filme lacrimal foram realizadas através do oftalmoscópio direto¹ e do Teste Lacrimal de Schirmer², respectivamente.

Para o Teste de Cristalização da Lágrima foi necessário tubo capilar para micro-hematócrito³, lâminas de vidro para microscopia⁴, microscópio de luz polarizada⁵ e uma câmera fotográfica⁶.

¹ Oftalmoscópio coaxial direto ref.:11720 ® Welch Allyn Ltda.

² Schirmer tear strips® Ophthalmos Ltda., Rio de Janeiro, RJ

³ Tubo capilar de micro-hematócrito® Biocap SA

⁴ Lâmina de vidro para microscopia® Bioglass Ltda.

⁵ Microscópio binocular Laboval 4® Carl Zeiss Ltda.

⁶ Câmera Digital Cyber-shot DSC-H9 8,1 megapixels® Sony Ltda.

3.4 Métodos

3.4.1 Isolamento dos Animais

Os 55 animais foram separados em grupos de cinco, os quais permaneciam por trinta minutos numa sala fechada, pertencente ao Laboratório de Quimioterapia Experimental Parasitológica da UFRRJ, com temperatura e umidade do ar registrada por um aparelho termo-higrômetro⁷. A permanência nesse ambiente foi necessária para que a cristalização da lágrima não sofresse modificações com a oscilação natural da temperatura e umidade do ar no decorrer dos dias do experimento.

Com a temperatura máxima variando entre 26,5 e 27,1°C, a mínima entre 20,4 e 21,8°C e a umidade do ar máxima entre 73 e 88%, a mínima entre 48 e 61%; cada um dos animais passou por uma série de avaliação. Sempre na mesma ordem, começando pelo olho direito e dando um intervalo de trinta minutos entre as avaliações para não haver produção reflexa da lágrima; cada cão passou pelo exame oftalmológico, realização do Teste Lacrimal de Schirmer e coleta do filme lacrimal para a realização do Teste de Cristalização da Lágrima.

3.4.2 Avaliação Oftalmológica dos Cães

O mesmo avaliador realizou o exame clínico oftalmológico de cada um dos animais com auxílio de um oftalmoscópio direto. Sempre iniciando pelo olho direito e anotando a presença e sua respectiva intensidade (Ø, *, **, ***) de secreção mucosa, secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, neovascularização, edema e pigmentação corneana.

3.4.3 Realização do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)

Trinta minutos após a avaliação oftalmológica, o mesmo avaliador realizou o Teste Lacrimal de Schirmer em cada um dos animais (Figura 2), sempre começando pelo olho direito e ainda dentro da sala fechada com temperatura e umidade do ar

⁷ Aparelho Termo-Higrômetro Digital Temperatura Interna/Externa 7666.02® INCOTERM Ltda.

controlada para minimizar as variações climáticas que podem mascarar o resultado do teste.



Figura 2: realização do Teste Lacrimal de Schirmer em um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

A classificação quanto à presença de ceratoconjuntivite seca foi realizada seguindo uma adaptação do modelo proposto por Slatter (2005). Cada um dos olhos avaliados foi considerado positivo quando o TLS desse menor ou igual a 8 mm/min. (independentemente dos sinais clínicos) e quando o valor fosse maior que 8 mm/min. e menor ou igual a 15 mm/min. com presença de pelo menos um sinal clínico oftalmológico. Os casos negativos foram os que apresentavam valores do TLS maior que 15 mm/min. (independentemente dos sinais clínicos) e aqueles com TLS maior que 8 mm/min. e menor ou igual a 15 mm/min. mas sem presença de nenhum dos sinais clínicos oftalmológicos avaliados.

3.4.4 Realização do Teste de Cristalização da Lágrima (TCL)

Trinta minutos após a realização do TLS, o mesmo avaliador realizou a coleta de uma gota do filme lacrimal de cada um dos animais, sempre começando pelo olho direito e ainda dentro da sala fechada com temperatura e umidade do ar controlada.

A gota do filme lacrimal de cada olho, correspondente a dois ou três milímetros de diâmetro, foi depositada na superfície de uma lâmina de vidro, no centro de um círculo marcado previamente com caneta esferográfica azul ou vermelha. A lágrima foi

deixada secar por dez minutos antes de ser realizada a sua leitura, pois a cristalização completa demora alguns minutos para ocorrer (Figura 3).

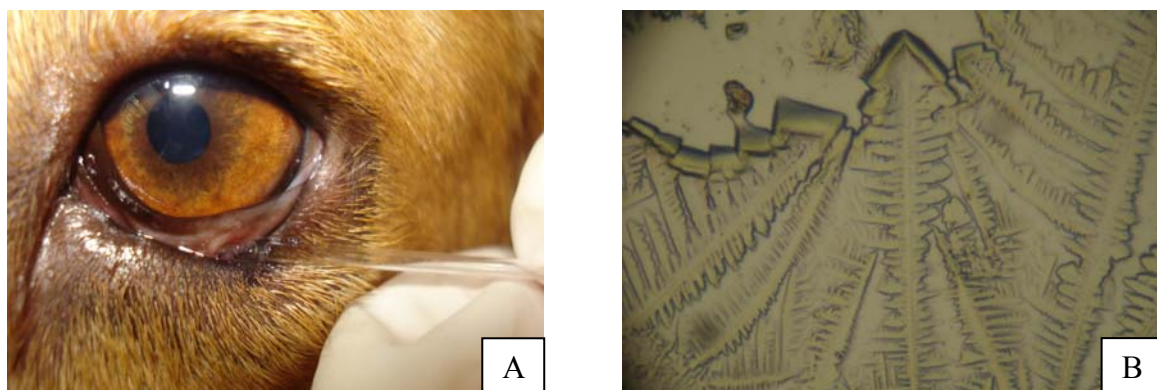


Figura 3: Teste de Cristalização do Filme Lacrimal: coleta da lágrima do saco conjuntival de um cão da raça Beagle (A) e sua respectiva cristalização, em aumento de 10x (B), UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

A leitura das lâminas foi feita com auxílio de um microscópio de luz polarizada. Foram obtidas fotografias digitais do local correspondente à gota de lágrima seca de cada animal, com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio, em aumento de 10 vezes e resolução de 3 megapixels.

A fotografia foi a única alternativa para o registro da cristalização das lágrimas desses cães, pois as mesmas desaparecem da lâmina após, aproximadamente, uma hora de sua completa formação.

Dessa forma, o avaliador selecionou pelo computador uma única fotografia da cristalização da lágrima de cada olho; aquela que representasse o melhor padrão de cristalização dentre as demais.

Em seguida, esse avaliador escolheu cinco examinadores, alguns apresentando experiência prévia com o teste, outros nenhuma experiência. Cada um deles, separadamente, avaliou e classificou as fotos pré-selecionadas conforme o padrão de cristalização proposto por Rolando na Medicina Humana. De acordo com este autor, o padrão I é aquele cuja cristalização da lágrima origina árvores de cristais multi-ramificados, sem espaços entre vazios entre as arborificações (Figura 4). No padrão II os ramos são mais curtos e as arborificações são menores, com mais espaços entre elas (Figura 5). No padrão III os espaços entre as arborificações são amplos e as ramificações são raras (Figura 6) e finalmente o padrão IV é caracterizado por grumos de cristais que raramente formam pequenas arborificações (Figura 7).

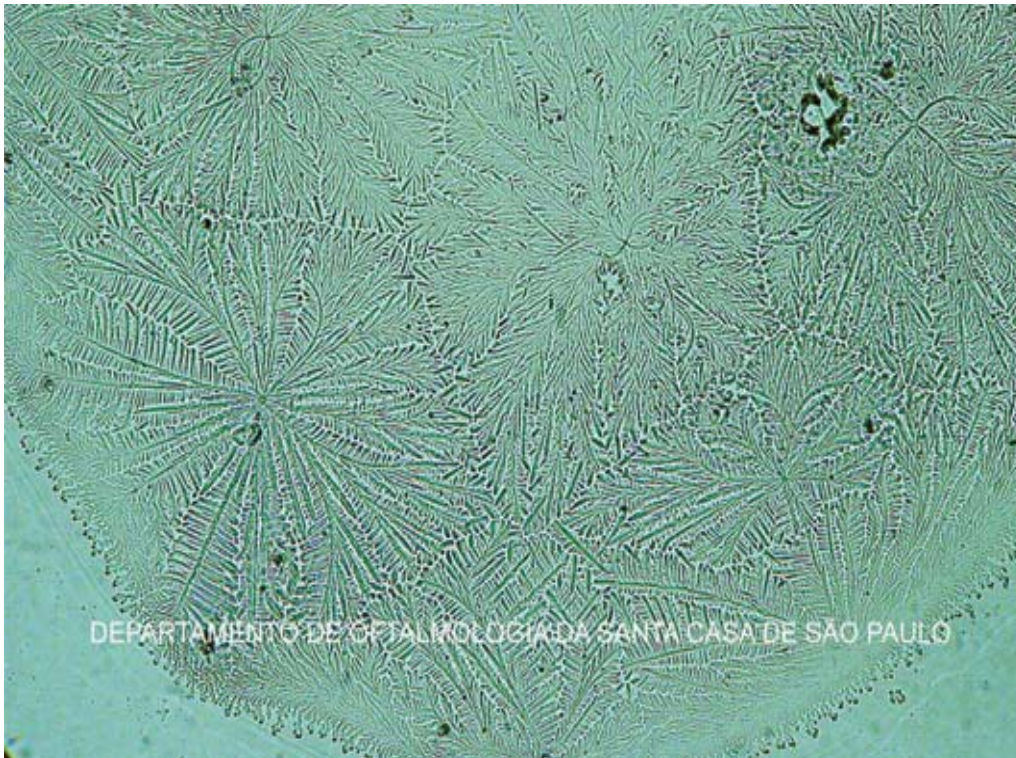


Figura 4: Padrão I de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 5x (ROLANDO, 1984).

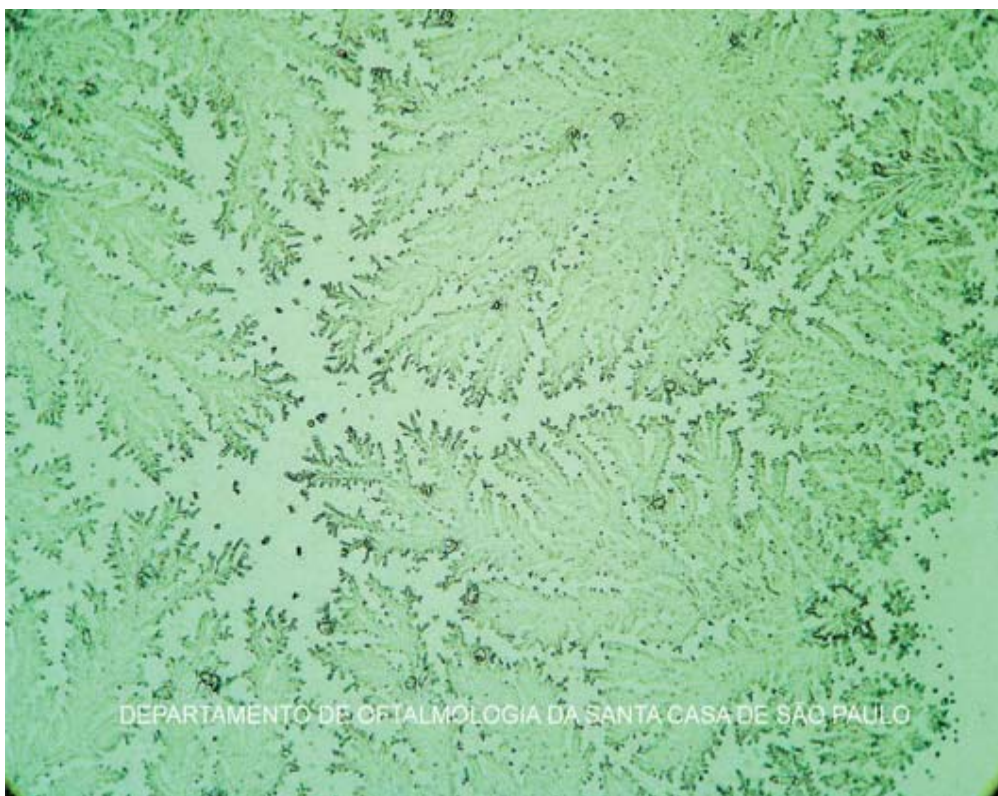


Figura 5: Padrão II de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 5x (ROLANDO, 1984).



Figura 6: Padrão III de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 5x (ROLANDO, 1984).



Figura 7: Padrão IV de cristalização do filme lacrimal humano, em aumento de 5x (ROLANDO, 1984).

3.4.5 Análise Estatística

Os escores dos cinco examinadores foram analisados descritivamente pelas frequências simples. A correlação entre as classificações atribuídas aos mesmos pacientes pelos cinco examinadores diferentes foi obtida com coeficiente de concordância Kappa, que assumiu valores entre -1 (completa discordância) e +1 (completa concordância);

Para a interpretação dos valores de Kappa, utilizou-se a caracterização em faixas de valores para os graus de concordância, que correlacionam valores acima de 0,80 a uma concordância excelente, valores entre 0,60 e 0,79 como substancial, entre 0,40 e 0,59 como moderada, entre 0,20 e 0,39 como considerável, entre 0 e 0,19 como ligeira e menores que 0 com uma concordância pobre.

A Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi utilizada para a determinação do melhor “ponto de corte” que define o paciente como sendo portador ou não da ceratoconjuntivite seca (CCS). Para significância estatística considerou-se p menor que cinco por cento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnóstico dos Olhos com CCS Quantitativa

Uma comparação entre os valores do Teste Lacrimal de Schirmer e a presença dos sinais clínicos observados no exame oftalmológico (como secreção mucosa, secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, neovascularização, edema e pigmentação corneana) foi realizada para classificar os animais positivos e negativos para ceratoconjuntivite seca quantitativa.

A classificação quanto à presença de ceratoconjuntivite seca foi realizada seguindo uma adaptação do modelo proposto por Slatter (2005). Cada um dos olhos avaliados foi considerado portador de CCS, quando o TLS desse menor ou igual a 8 mm/min. (independentemente dos sinais clínicos) e quando o valor fosse maior que 8 mm/min. e menor ou igual a 15 mm/min. com presença de pelo menos um sinal clínico oftalmológico. Os casos de não portadores de CCS foram os que apresentavam valores do TLS maior que 15 mm/min. (independentemente dos sinais clínicos) e aqueles com TLS maior que 8 mm/min. e menor ou igual a 15 mm/min. mas sem presença de nenhum dos sinais clínicos oftalmológicos avaliados (Quadro 1).

Quadro 1. Continuação

Número	Olho	Secreção mucosa	Secreção mucopurulenta	Hiperemia conjuntival	Neovascularização	Edema corneano	Pigmentação corneana	TLS	CCS quantitativa
267388	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
267388	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
278555	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	16	NP
278555	OE	Ø	*	Ø	Ø	Ø	Ø	7	P
279853	OD	Ø	Ø	Ø	*	*	Ø	15	P
279853	OE	Ø	*	Ø	Ø	Ø	Ø	15	P
280610	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	24	NP
280610	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	19	NP
283023	OD	Ø	*	Ø	Ø	Ø	Ø	10	P
283023	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	11	NP
287293	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	12	NP
287293	OE	**	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	18	NP
288786	OD	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	14	P
288786	OE	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	11	P
290901	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	14	NP
290901	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	11	NP
291074	OD	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	24	NP
291074	OE	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	24	NP
291310	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	23	NP
291310	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	26	NP
293700	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
293700	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
296603	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	21	NP
296603	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
298877	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
298877	OE	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
299972	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	10	NP
299972	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	15	NP
385615	OD	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	23	NP

Quadro 1. Continuação

Número	Olho	Secreção mucosa	Secreção mucopurulenta	Hiperemia conjuntival	Neovascularização	Edema corneano	Pigmentação corneana	TLS	CCS quantitativa
419834	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	15	NP
419834	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	13	NP
419842	OD	Ø	*	Ø	Ø	*	Ø	13	P
419842	OE	Ø	*	Ø	Ø	*	Ø	10	P
420437	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
420437	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
420438	OD	**	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	18	NP
420438	OE	**	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	18	NP
421754	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	21	NP
421754	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
422903	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	19	NP
422903	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	22	NP
425403	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	9	NP
425403	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	13	NP
427070	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	13	NP
427070	OE	Ø	*	Ø	Ø	Ø	Ø	6	P
filhote 1	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
filhote 1	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
filhote 2	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	21	NP
filhote 2	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	18	NP
filhote 3	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
filhote 3	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
filhote 4	OD	**	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	26	NP
filhote 4	OE	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	23	NP
filhote 5	OD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	20	NP
filhote 5	OE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	23	NP

OD: olho direito, OE: olho esquerdo, TLS: Teste Lacrimal de Schirmer, CCS: ceratoconjuntivite seca, Ø: ausência, *: pouca, **: moderada, ***: intensa, P: portador de ceratoconjuntivite seca, NP: não portador de ceratoconjuntivite seca.

Essa correlação mostrou que todos os olhos com o TLS menor ou igual a 8 mm/min. apresentaram secreção mucopurulenta, associada ou não a outros sinais clínicos no exame oftalmológico; evidenciando, assim, que olhos com esse tipo de secreção são fortes candidatos a serem portadores de CCS quantitativa.

Nos casos em que o TLS foi maior que 15 mm/min., mesmo não sendo portadores de CCS quantitativa, alguns apresentam um tipo de secreção; porém, esta, de característica apenas mucosa, que pode ser originada de uma alta produção lacrimal com uma baixa eficiência do sistema de drenagem, o que contribui para a cristalização da lágrima, de aspecto mucoso, no canto nasal do saco conjuntival.

Por fim, os olhos positivos para CCS com valores de TLS maior que 8 mm/min. e menor ou igual a 15 mm/min. apresentaram ora secreção mucosa, ora mucopurulenta, ora ambas. Para uma melhor eficácia no diagnóstico do tipo de CCS, quantitativa e/ou qualitativa, presente em cada olho é necessário um exame mais específico dessa secreção; como o Teste de Cristalização da Lágrima realizado rotineiramente na Medicina Humana.

Dessa forma, vale ressaltar a importância desse tipo de análise da secreção ocular, seguido da realização do TLS da maneira mais fidedigna possível, ou seja, removendo a secreção acumulada e realizando o teste numa sala refrigerada e sem aditivos que mascarem a produção do filme lacrimal como ventiladores, iluminação excessiva, instilação de colírios ou solução fisiológica.

4.2 Avaliação do Teste de Cristalização da Lágrima (TCL)

Embora existam diversas publicações utilizando o teste de cristalização na avaliação do filme lacrimal de pacientes humanos com doenças da superfície ocular, nenhum trabalho estudou a reprodutibilidade na classificação dos achados na Medicina Veterinária. Como a decisão pela escolha de cada escore do padrão do teste de cristalização (I, II, III e IV) envolve certa subjetividade, este estudo teve a intenção de avaliar, independentemente da experiência prévia de cada examinador com o teste, a capacidade de classificarem os mesmos achados nos cães, de forma idêntica ou semelhante aos propostos por Rolando (1984) e seguido por Feldberg (2008).

Após a realização da primeira etapa do Teste de Cristalização da Lágrima nos 55 cães da raça Beagle, descrita anteriormente; uma análise descritiva dos escores e sua correlação entre as classificações atribuídas aos mesmos pacientes pelos cinco

examinadores diferentes foi obtida (Tabela 1), seguindo o mesmo modelo de pesquisa de Feldberg na Medicina Humana em 2008 (Anexo A). Essa tabela contém as estimativas para os coeficientes Kappa para cada par de examinadores com os escores analisados separadamente (I, II, III e IV), evidenciando correlação substancial a excelente entre as análises de cada um dos padrões quando comparadas entre cada par de examinadores.

Tabela 1: Coeficiente de concordância Kappa, erro padrão (EP) e nível descritivo da comparação entre os 5 examinadores das lâminas do teste de cristalização das lágrimas de cães da raça Beagle com e sem ceratoconjuntivite seca, utilizando os escores não agregados, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

EXAMINADOR	EXAMINADOR	KAPPA	EP	Valor p
1	2	0.847	0.026	0.269
1	3	0.883	0.024	0.138
1	4	0.657	0.030	0.773
1	5	0.725	0.031	0.933
2	3	0.776	0.025	0.785
2	4	0.745	0.031	0.215
2	5	0.771	0.031	0.303
3	4	0.691	0.029	0.118
3	5	0.726	0.028	0.174
4	5	0.827	0.009	0.499

EP – erro padrão

No estudo de Feldberg, a maior discordância entre os examinadores foi encontrada entre as classificações I e II; e sua justificativa para isso foi que o padrão I e II determinado por Rolando pode não estar bem claro para os avaliadores. Visando minimizar tais discordâncias, Feldberg agregou e separou esses padrões dos III e IV e observou que dessa forma a concordância de classificação entre os cinco examinadores foi mais alta para ambos os grupos, do que quando analisados separadamente (I, II, III, IV)

A tabela abaixo (Tabela 2), referente ao estudo em cães, apresenta as estimativas para os coeficientes Kappa para cada par de examinadores com os escores agregados I com II e III com IV, assim como a realizada no estudo de Feldberg (Anexo B). A correlação manteve-se dentro da faixa considerada substancial a excelente quando cada par de examinadores avaliou os escores agregados I com II e III com IV; porém quase todos os valores de Kappa decresceram quando comparados aos valores encontrados na análise separada de cada escore (I, II, III, IV) e o erro padrão aumentou em todas as correlações.

Tabela 2: Coeficiente de concordância Kappa, erro padrão (EP) e nível descritivo da comparação entre os 5 examinadores das lâminas do teste de cristalização das lágrimas de cães da raça Beagle com e sem ceratoconjuntivite seca, utilizando os escores agregados (I com II e III com IV), UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

EXAMINADOR	EXAMINADOR	KAPPA	EP	Valor p
1.0	2.0	0.777	0.048	0.342
1.0	3.0	0.804	0.043	0.293
1.0	4.0	0.665	0.058	0.845
1.0	5.0	0.607	0.055	0.838
2.0	3.0	0.649	0.051	1.000
2.0	4.0	0.827	0.052	0.513
2.0	5.0	0.745	0.052	0.513
3.0	4.0	0.644	0.059	0.565
3.0	5.0	0.727	0.056	0.542
4.0	5.0	0.827	0.032	1.000

EP – erro padrão

A explicação para tais variações numéricas observadas neste estudo em que dois escores são agregados e separados dos outros (I com II e III com IV) foi a presença de uma discordância entre os examinadores nas classificações II e III; diferentemente da ocorrida entre os examinadores da espécie humana. Isso aconteceu porque o padrão I não foi observado nos cães da mesma maneira que a proposta por Rolando (com a formação de árvores de cristais multi-ramificados e sem espaços vazios entre as arborificações), o que dificultou uma correlação dos padrões humanos com os caninos.

Como todas as cristalizações das lágrimas dos cães apresentam espaços vazios entre as arborificações, cada um dos examinadores desse estudo acabou criando uma maneira própria para classificar as fotos de acordo com os quatro escores propostos, mesmo sem saber quais fotos pertenciam aos pacientes normais ou aos portadores de ceratoconjuntivite seca.

De acordo com esse modelo individual criado para avaliar a cristalização da lágrima, quando os padrões encontrados no teste entre pacientes normais e portadores de CCS foram comparados, todos os pacientes que receberam classificação I de todos os examinadores pertenciam ao grupo dos indivíduos normais enquanto os que receberam classificação IV pertenciam ao grupo dos portadores da síndrome. Os escores II e III foram atribuídos aos pacientes de ambos os grupos, embora uma frequência maior do escore II tenha sido evidenciada no grupo dos normais e do escore III no grupo dos doentes (Quadro 2).

Quadro 2: classificação quanto ao padrão de cristalização da lágrima (I, II, III, IV) de cada um dos olhos dos cães da raça Beagle realizada por cada um dos cinco examinadores, seguido da análise do padrão de maior repetição entre os examinadores, para diagnosticar a presença ou não da ceratoconjuntivite seca qualitativa. (Continua)

Número	Olho	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	PMR	CCS qualitativa
35811	OD	I	I	I	I	I	I	NP
35811	OE	II	II	II	II	II	II	NP
44126	OD	II	II	II	II	II	II	NP
44126	OE	II	II	II	II	II	II	NP
44220	OD	III	III	II	II	II	II	NP
44220	OE	II	II	II	II	II	II	NP
44450	OD	II	II	II	II	II	II	NP
44450	OE	I	I	I	I	I	I	NP
78122	OD	II	II	II	II	II	II	NP
78122	OE	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
247112	OD	II	II	II	II	II	II	NP
247112	OE	II	II	II	II	II	II	NP
247335	OD	III	III	III	III	III	III	P
247335	OE	II	II	II	II	II	II	NP
251534	OD	I	I	I	I	I	I	NP
251534	OE	I	I	I	I	I	I	NP
260688	OD	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
260688	OE	III	III	III	III	III	III	P
261090	OD	II	II	II	II	II	II	NP
261090	OE	I	I	I	I	I	I	NP
261106	OD	II	II	II	I	I	II	NP
261106	OE	I	I	I	I	I	I	NP

261153	OD	II	II	II	II	II	II	NP
--------	----	----	----	----	----	----	----	----

Quadro 2: Continuação.

Número	Olho	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	PMR	CCS qualitativa
261153	OE	II	II	II	II	II	II	NP
262031	OD	I	I	I	I	I	I	NP
262031	OE	I	I	I	I	I	I	NP
267388	OD	II	II	II	II	II	II	NP
267388	OE	II	II	II	II	II	II	NP
278555	OD	II	II	II	II	II	II	NP
278555	OE	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
279853	OD	II	II	II	III	III	II	NP
279853	OE	II	II	II	II	II	II	NP
280610	OD	I	I	I	I	I	I	NP
280610	OE	I	I	I	I	I	I	NP
283023	OD	III	II	II	III	III	III	P
283023	OE	III	III	III	III	III	III	P
287293	OD	II	III	II	III	II	II	NP
287293	OE	II	II	II	II	II	II	NP
288786	OD	II	II	II	II	II	II	P
288786	OE	II	II	II	II	II	II	P
290901	OD	II	II	II	I	I	II	NP
290901	OE	III	III	III	II	II	III	P
291074	OD	I	I	I	I	I	I	NP
291074	OE	I	I	I	I	I	I	NP
291310	OD	II	II	II	II	II	II	NP
291310	OE	II	III	II	III	III	III	P
293700	OD	II	II	II	II	II	II	NP
293700	OE	II	II	II	II	II	II	NP
296603	OD	II	III	II	III	III	III	P
296603	OE	I	I	I	I	I	I	NP
298877	OD	II	II	II	II	II	II	NP
298877	OE	I	I	I	I	I	I	NP
299972	OD	III	III	III	III	III	III	P
299972	OE	II	II	II	I	II	II	NP
385615	OD	II	II	II	II	II	II	NP
385615	OE	I	I	I	I	I	I	NP
389049	OD	I	I	I	I	I	I	NP
389049	OE	II	II	II	II	II	II	NP
392630	OD	III	III	III	III	III	III	P
392630	OE	III	III	III	III	III	III	P
393540	OD	II	II	III	III	III	III	P
393540	OE	II	II	II	II	II	II	NP
393776	OD	II	II	II	II	II	II	NP
393776	OE	II	III	II	II	III	II	NP
397470	OD	II	II	II	II	II	II	NP
397470	OE	III	III	II	II	III	III	P
405565	OD	II	II	II	II	II	II	NP
405565	OE	II	II	II	II	II	II	NP
405662	OD	II	II	II	II	II	II	NP

Quadro 2: Continuação.

Número	Olho	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	PMR	CCS qualitativa
405662	OE	II	II	II	II	II	II	NP
409813	OD	III	III	III	III	III	III	P
409813	OE	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
411429	OD	II	II	II	II	II	II	NP
411429	OE	II	II	II	III	III	II	NP
415022	OD	II	III	II	III	III	III	P
415022	OE	III	III	III	III	III	III	P
415434	OD	II	III	II	III	III	III	P
415434	OE	I	I	I	I	I	I	NP
415998	OD	II	II	II	II	II	II	NP
415998	OE	II	II	II	II	II	II	NP
416929	OD	I	I	I	I	I	I	NP
416929	OE	III	III	III	III	III	III	P
417245	OD	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
417245	OE	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
419834	OD	II	II	II	III	III	II	NP
419834	OE	III	III	III	III	III	III	P
419842	OD	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
419842	OE	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
420437	OD	I	I	I	I	I	I	NP
420437	OE	II	II	II	II	II	II	NP
420438	OD	I	II	II	I	II	II	NP
420438	OE	II	II	II	II	II	II	NP
421754	OD	II	II	II	II	II	II	NP
421754	OE	II	III	III	II	II	II	NP
422903	OD	I	I	I	I	I	I	NP
422903	OE	II	II	II	II	II	II	NP
425403	OD	III	III	III	III	III	III	P
425403	OE	II	II	II	I	I	II	NP
427070	OD	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
427070	OE	IV	IV	IV	IV	IV	IV	P
filhote 1	OD	II	II	II	II	II	II	NP
filhote 1	OE	II	III	II	III	II	II	NP
filhote 2	OD	I	I	I	I	I	I	NP
filhote 2	OE	II	II	II	II	II	II	NP
filhote 3	OD	III	III	II	III	II	III	P
filhote 3	OE	III	III	III	II	III	III	P
filhote 4	OD	II	II	II	I	II	II	NP
filhote 4	OE	II	II	II	I	I	II	NP
filhote 5	OD	I	I	I	I	I	I	NP
filhote 5	OE	II	III	II	III	III	III	P

OD: olho direito, OE: olho esquerdo, Ex.1: examinador 1, Ex.2: examinador 2, Ex.3: examinador 3, Ex.4: examinador 4, Ex.5: examinador 5, PMR: padrão de maior repetição, CCS: ceratoconjuntivite seca, I: padrão I no TCL, II: padrão II no TCL, III: padrão III no TCL, IV: padrão IV no TCL, P: portador, NP: não portador.

Esses dados foram usados para construir a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) e, assim, determinar o melhor “ponto de corte” que define o paciente como sendo portador ou não da ceratoconjuntivite seca (Tabela 4).

Tabela 4: Coordenadas da curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Sensibilidade e especificidade para diversos pontos de corte para cada examinador do teste de cristalização da lágrima realizado nos cães da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011. (Continua)

Examinador	Critério	Sensibilidade	Especificidade	1-Especificidade
1	>= I	100.00	0.00	100.00
	> I	100.00	26.14	73.86
	> II *	59.09	84.09	15.91
	> III	40.91	98.86	1.14
	> IV	0.00	100.00	0.00
2	>= I	100.00	0.00	100.00
	> I	100.00	25.00	75.00
	> II	59.09	75.00	25.00
	> III *	40.91	98.86	1.14
	> IV	0.00	100.00	0.00
3	>= I	100.00	0.00	100.00
	> I	100.00	25.00	75.00
	> II	50.00	84.09	15.91
	> III *	40.91	98.86	1.14
	> IV	0.00	100.00	0.00
4	>= I	100.00	0.00	100.00
	> I	100.00	32.95	67.05
	> II *	63.64	77.27	22.73
	> III	40.91	98.86	1.14
	> IV	0.00	100.00	0.00
5	>= I	100.00	0.00	100.00
	> I	100.00	29.55	70.45
	> II *	63.64	77.27	22.73
	> III	40.91	98.86	1.14

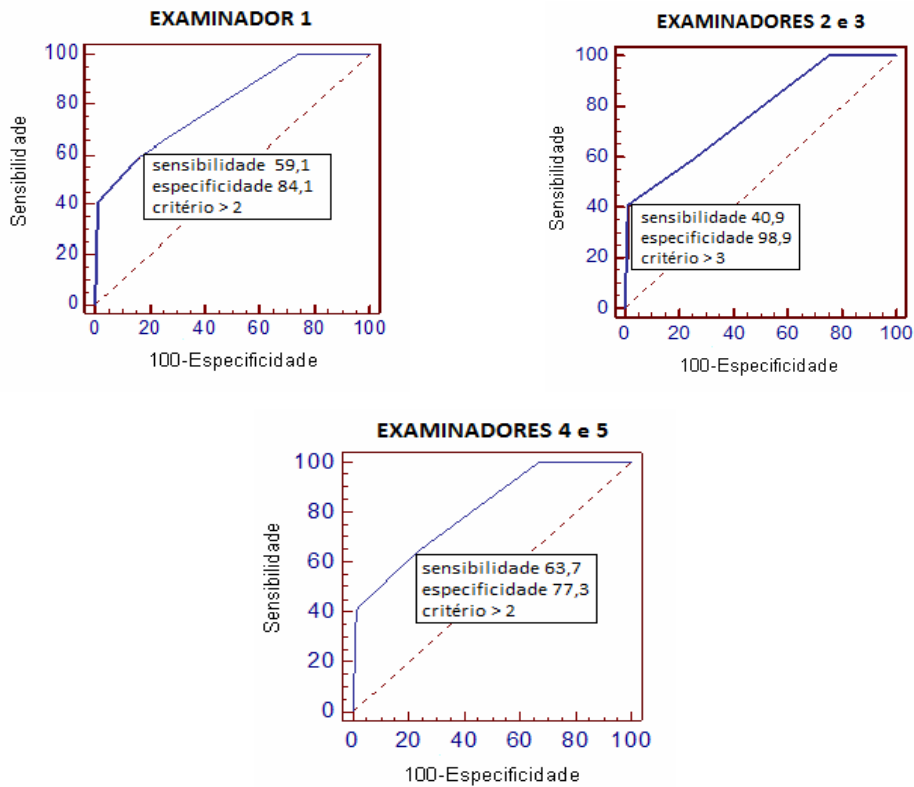
> IV	0.00	100.00	0.00
------	------	--------	------

Observa-se que o ponto que melhor separou pacientes normais dos portadores da CCS variou entre maior que dois e maior que três de acordo com cada examinador, ou seja, do total de cinco examinadores, três consideraram olhos positivos para CCS aqueles com padrões III e IV e, dois deles consideraram somente os olhos com padrão IV como portadores da CCS. Esse “corte” variando entre o padrão maior que II e maior que III obtido com a curva ROC representa uma boa relação entre sensibilidade e especificidade do teste, mas que não coincide com o sugerido por Rolando (Anexo C).

Essa variação no ponto de corte foi oriunda da experiência prévia de alguns dos examinadores com o teste, somado ao poder individual de observação sobre as diferenças das fotos da cristalização da lágrima canina com as do modelo proposto por Rolando.

A curva ROC de cada um dos examinadores foi traçada a partir de um diagrama que representa a sensibilidade em função da proporção de falsos positivos (100 - especificidade) para um conjunto de valores de ponto de corte (Gráfico 1).

Gráfico 1: representa a curva ROC dos examinadores (1,2,3,4 e 5) construída a partir dos seus respectivos ponto de corte obtidos com os valores de sensibilidade e especificidade, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.



À medida que a sensibilidade mede a capacidade do teste em identificar corretamente a doença entre aqueles que a possuem e, a especificidade mede a capacidade do teste em excluir corretamente aqueles que não possuem a doença; um classificador perfeito corresponderia a uma linha horizontal no topo do gráfico, que dificilmente será alcançada. Na prática, curvas consideradas boas estarão entre a linha diagonal e a linha perfeita, onde quanto maior a distância da linha diagonal, melhor o sistema (Anexo D).

Embora a curva de cada um dos examinadores desse estudo seja considerada boa, com certeza elas estariam bem mais próximas da perfeição se os examinadores fossem orientados quanto à inexistência do padrão I para os cães e, dessa forma, participassem de um treinamento para melhor distinguirem os padrões para essa espécie.

4.3 Padronização do Teste de Cristalização da Lágrima (TCL)

Para facilitar o diagnóstico de ceratoconjuntivite seca qualitativa de maneira específica para cães, uma padronização do Teste de Cristalização da Lágrima foi realizada baseado em todos os dados e fotos obtidas nesse estudo. No padrão I a cristalização da lágrima origina de um único ponto, a formação de diversas e longas folhas de samambaia (Figura 8) com alguns espaços vazios entre elas e que são

visivelmente compostas por várias pinas bem próximas, sendo que algumas se alongam mais que as outras e se dividem em diversas pínulas também muito próximas (Figura 9) (Anexo E). No padrão II a cristalização não se assemelha tanto com uma samambaia, pois existem mais espaços em branco entre as folhas; elas nem sempre saem de um mesmo ponto e quando isso ocorre, elas não são tão numerosas e nem tão grandes, mas são visivelmente compostas por pinas, distantes umas das outras e, às vezes, possuem pínulas também distantes entre elas (Figura 10) (Anexo F). No padrão III as folhas são bem curtas, não se assemelham à samambaia; elas possuem poucas ou nenhuma pina, não existem pínulas, existem muitos espaços vazios e presença de grumos de cristais (Figura 11) (Anexo G). No padrão IV há somente grumos de cristais com espaços em branco entre eles (Figura 12) (Anexo H).

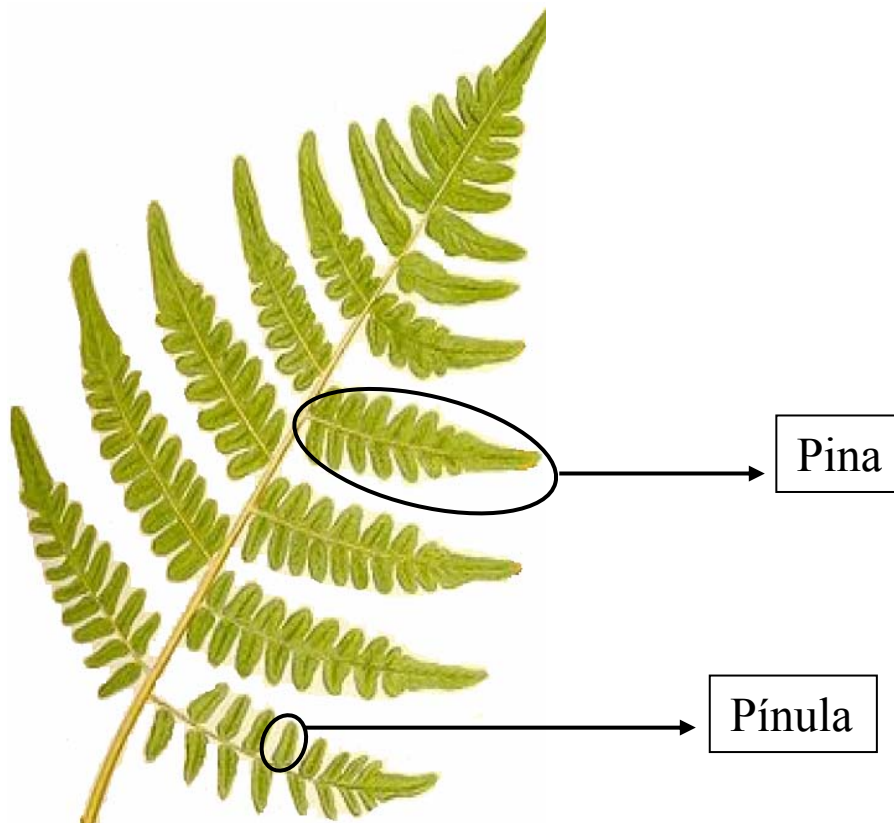


Figura 8: desenho esquemático de uma folha de samambaia mostrando suas pinas e pínulas (Disponível em: www.varbak.com.)

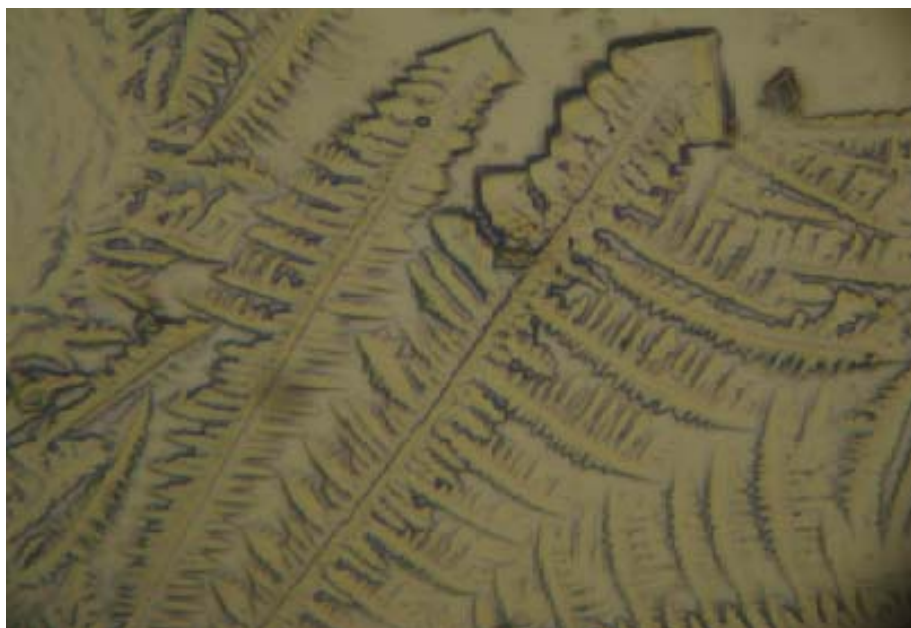


Figura 9: padrão I de cristalização do filme lacrimal, de um cão da raça Beagle, em aumento de 10x, mostrando a semelhança com uma samambaia, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

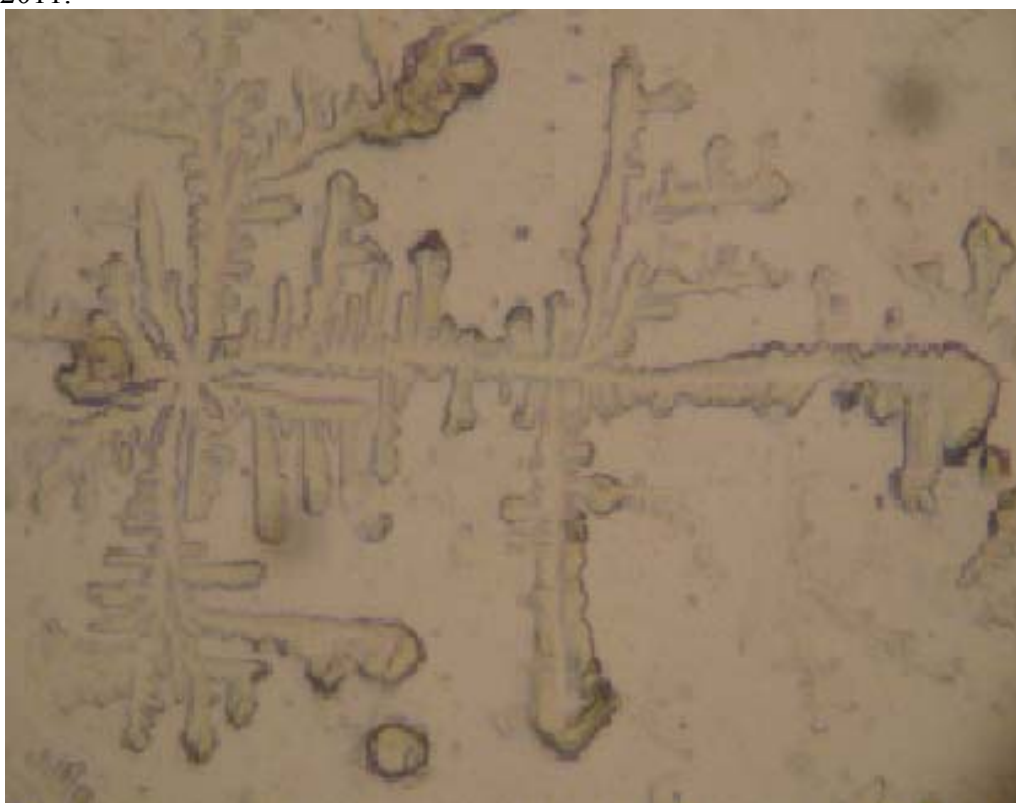


Figura 10: padrão II de cristalização do filme lacrimal, de um cão da raça Beagle, em aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

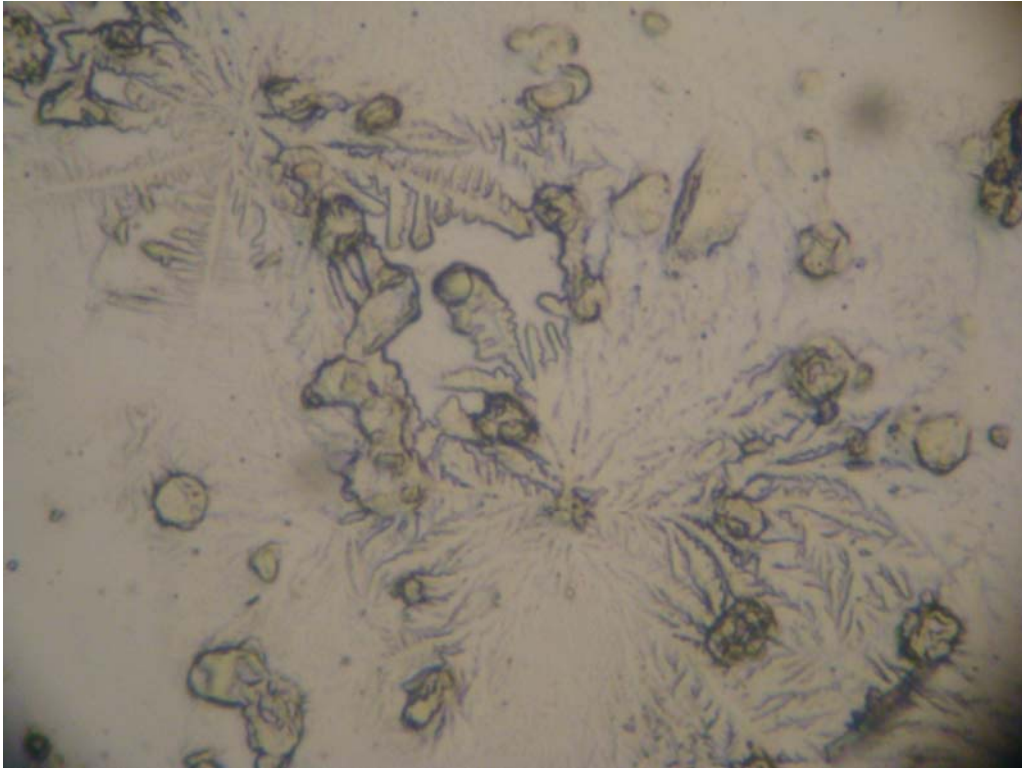


Figura 11: padrão III de cristalização do filme lacrimal de um cão da raça Beagle, e aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

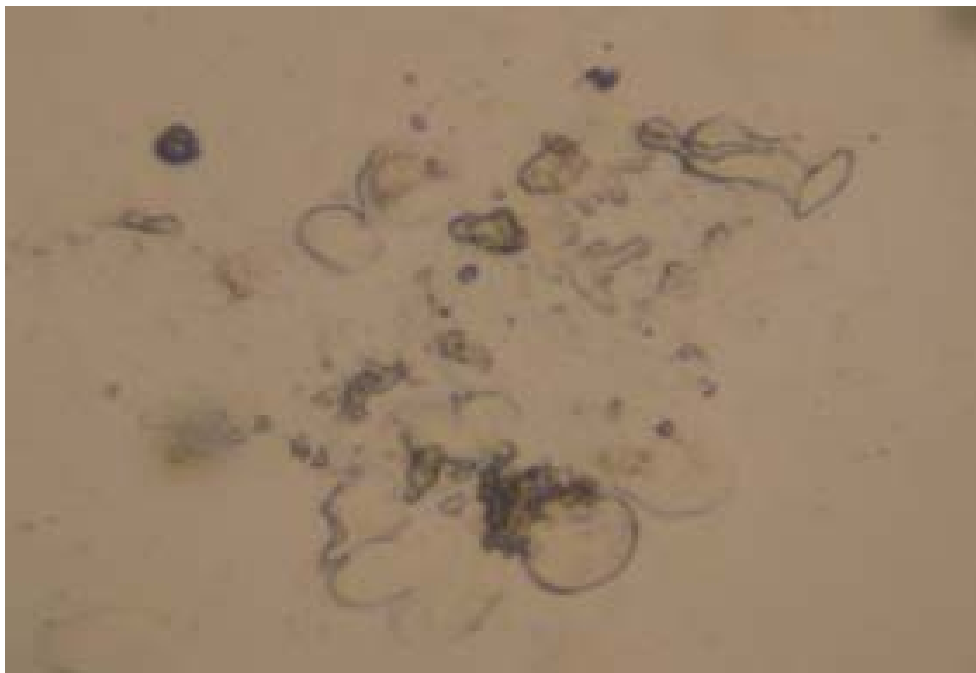


Figura 12: padrão IV de cristalização do filme lacrimal de um cão da raça Beagle, em aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

4.4 Comparação entre os casos de CCS Quantitativa e Qualitativa

A ceratoconjuntivite seca é uma doença comum em cães que pode ocorrer devido

à deficiência quantitativa ou qualitativa do filme lacrimal pré-corneano, ou ainda por uma combinação de ambas. Em casos de deficiência quantitativa há uma diminuição na porção aquosa da lágrima. Já os casos de deficiência qualitativa são caracterizados por anormalidades nas porções lipídica e/ou mucínica do filme lacrimal. (GELATT 1999; KOCH; SYKES, 2002; SLATTER, 2005, HERRERA et al., 2007).

Como o filme lacrimal pré-corneano é constituído por três camadas distintas: lipídica, aquosa e mucosa, dispostas nesta ordem, sendo a camada lipídica superficial ligada à camada aquosa e a mucínica à camada aquosa e à córnea (KOCH; SYKES, 2002; CRISPIN, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008; PICCIONE, 2009); qualquer anormalidade na quantidade ou na qualidade de uma delas afetará na dinâmica do filme lacrimal e conseqüentemente no diagnóstico de ceratoconjuntivite seca.

Na Medicina Veterinária, como o diagnóstico de CCS é fechado basicamente com a presença de sinais clínicos e com a realização do TLS; muitos casos de CCS não são diagnosticados ou são erroneamente tratados. Isso ocorre, porque o TLS mensura apenas a porção aquosa do filme lacrimal, sem indicar qualquer correlação com as demais camadas do mesmo.

Qualquer alteração no componente lipídico, por exemplo, desestabiliza o filme lacrimal e gera aumento na evaporação da camada aquosa, contribuindo para o surgimento ou piora do quadro clínico de CCS (OFRI et al., 2006). Já a deficiência na produção de mucina leva a perda de sua função protetora e lubrificante, perda na estabilidade do filme lacrimal e conseqüente ressecamento corneano, condição na qual também surgem sinais clínicos similares de CCS (MOORE, 1999; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008; PICCIONE, 2009). Portanto, nesses casos, se além do TLS, fosse realizado também o teste de cristalização da lágrima inicialmente à alteração lipídica ou mucínica; seria possível visualizar uma cristalização de padrão inferior com valores de TLS ainda normais ou levemente diminuídos, contribuindo, assim, para um diagnóstico precoce e mais preciso de CCS.

Em busca desse tipo de diagnóstico, foi realizado o estudo com 110 olhos de cães da raça Beagle, no qual observou alguns casos, como o animal de número 392630 (Quadro 3), em que o TLS estava dentro da normalidade (acima de 15 mm/min.), mas o padrão de cristalização da lágrima o incluía no grupo de animais portadores de CCS (padrão III). Embora, esses olhos ainda não apresentassem sinais clínicos de CCS; com a realização do TCL, detectou-se um filme lacrimal de qualidade ruim que deve ser

melhorado medicamentosamente para que, no futuro, não apresentem alterações oculares que causam desconforto e até a cegueira.

Quadro 3: comparação entre os olhos portadores de ceratoconjuntivite seca qualitativa e quantitativa, baseado nos padrões com maior repetição no TCL e nos valores do TLS.
(Continua)

Número	Olho	PMR	CCS qualitativa	TLS	CCS quantitativa
35811	OD	I	NP	21	NP
35811	OE	II	NP	18	NP
44126	OD	II	NP	25	NP
44126	OE	II	NP	24	NP
44220	OD	II	NP	12	P
44220	OE	II	NP	14	P
44450	OD	II	NP	25	NP
44450	OE	I	NP	25	NP
78122	OD	II	NP	16	NP
78122	OE	IV	P	0	P

Quadro 3: Continuação.

Número	Olho	PMR	CCS qualitativa	TLS	CCS quantitativa
247112	OD	II	NP	15	NP
247112	OE	II	NP	18	NP
247335	OD	III	P	15	P
247335	OE	II	NP	15	P
251534	OD	I	NP	16	NP
251534	OE	I	NP	20	NP
260688	OD	IV	P	9	P
260688	OE	III	P	14	NP
261090	OD	II	NP	21	NP
261090	OE	I	NP	25	NP
261106	OD	II	NP	22	NP
261106	OE	I	NP	22	NP
261153	OD	II	NP	20	NP
261153	OE	II	NP	18	NP
262031	OD	I	NP	24	NP
262031	OE	I	NP	23	NP
267388	OD	II	NP	22	NP
267388	OE	II	NP	22	NP
278555	OD	II	NP	16	NP
278555	OE	IV	P	7	P
279853	OD	II	NP	15	P
279853	OE	II	NP	15	P
280610	OD	I	NP	24	NP
280610	OE	I	NP	19	NP

283023	OD	III	P	10	P
283023	OE	III	P	11	NP
287293	OD	II	NP	12	NP
287293	OE	II	NP	18	NP
288786	OD	II	P	14	P
288786	OE	II	P	11	P
290901	OD	II	NP	14	NP
290901	OE	III	P	11	NP
291074	OD	I	NP	24	NP
291074	OE	I	NP	24	NP
291310	OD	II	NP	23	NP
291310	OE	III	P	26	NP
293700	OD	II	NP	22	NP
293700	OE	II	NP	22	NP
296603	OD	III	P	21	NP
296603	OE	I	NP	22	NP
298877	OD	II	NP	22	NP
298877	OE	I	NP	20	NP
299972	OD	III	P	10	NP
299972	OE	II	NP	15	NP
385615	OD	II	NP	23	NP
385615	OE	I	NP	24	NP

Quadro 3: Continuação.

Número	Olho	PMR	CCS qualitativa	TLS	CCS quantitativa
389049	OD	I	NP	16	NP
389049	OE	II	NP	16	NP
392630	OD	III	P	28	NP
392630	OE	III	P	23	NP
393540	OD	III	P	17	NP
393540	OE	II	NP	16	NP
393776	OD	II	NP	16	NP
393776	OE	II	NP	15	NP
397470	OD	II	NP	27	NP
397470	OE	III	P	28	NP
405565	OD	II	NP	14	P
405565	OE	II	NP	11	P
405662	OD	II	NP	19	NP
405662	OE	II	NP	22	NP
409813	OD	III	P	11	P
409813	OE	IV	P	8	P
411429	OD	II	NP	13	NP
411429	OE	II	NP	15	NP
415022	OD	III	P	22	NP
415022	OE	III	P	17	NP
415434	OD	III	P	15	P
415434	OE	I	NP	16	NP
415998	OD	II	NP	22	NP
415998	OE	II	NP	18	NP

416929	OD	I	NP	26	NP
416929	OE	III	P	24	NP
417245	OD	IV	P	0	P
417245	OE	IV	P	0	P
419834	OD	II	NP	15	NP
419834	OE	III	P	13	NP
419842	OD	IV	P	13	P
419842	OE	IV	P	10	P
420437	OD	I	NP	22	NP
420437	OE	II	NP	20	NP
420438	OD	II	NP	18	NP
420438	OE	II	NP	18	NP
421754	OD	II	NP	21	NP
421754	OE	II	NP	22	NP
422903	OD	I	NP	19	NP
422903	OE	II	NP	22	NP
425403	OD	III	P	9	NP
425403	OE	II	NP	13	NP
427070	OD	IV	P	13	NP
427070	OE	IV	P	6	P
filhote 1	OD	II	NP	20	NP
filhote 1	OE	II	NP	20	NP

Quadro 3: Continuação.

Número	Olho	PMR	CCS qualitativa	TLS	CCS quantitativa
filhote 2	OD	I	NP	21	NP
filhote 2	OE	II	NP	18	NP
filhote 3	OD	III	P	20	NP
filhote 3	OE	III	P	20	NP
filhote 4	OD	II	NP	26	NP
filhote 4	OE	II	NP	23	NP
filhote 5	OD	I	NP	20	NP
filhote 5	OE	III	P	23	NP

OD: olho direito, OE: olho esquerdo, PMR: padrão de maior repetição, CCS: ceratoconjuntivite seca, TLS: Teste Lacrimal de Schirmer, I: padrão I no TCL, II: padrão II no TCL, III: padrão III no TCL, IV: padrão IV no TCL, P: portador, NP: não portador.

Ainda neste estudo, todos os olhos com o TLS abaixo de 8 mm/min. apresentaram também, o padrão III ou IV no TCL e a presença de secreção mucopurulenta entre outros sinais clínicos oftalmológicos; confirmando, assim, o quadro de CCS quantitativa e qualitativa crônico.

A maior discussão foi gerada com relação aos olhos em que o TLS está entre 8 e 15 mm/min., pois segundo Slatter (2005) eles seriam considerados como suspeitos de CCS e, o que determinaria sua presença ou não, seria as alterações oftalmológicas

visualizadas durante o exame básico. Porém, alguns casos apresentaram o TLS nessa faixa de valores e sem sinais clínicos, mas o padrão do TCL variou entre I e II para uns e III e IV para outros. Segundo Slatter, todos esses casos seriam considerados não portadores de CCS, mas o TCL permite classificar alguns deles como portadores de CCS de maneira mais precisa. Aqueles que obtiveram padrão I ou II, no TCL, produzem a parte aquosa da lágrima em menor quantidade, mas, provavelmente, também produzem uma menor quantidade da porção lipídica e mucínica, porém todas são de qualidade excelente, além de possuírem uma anatomia e fluídica lacrimal excelente; o que permite classificar esses olhos como não portadores de CCS quantitativa ou qualitativa. Já aqueles que obtiveram padrão III ou IV, no TCL, deverão passar por mais estudos para poder explicar como um olho com TLS de 10 mm/min. e padrão III no TCL já padronizado para a espécie canina, por exemplo, pode não apresentar nenhum sinal clínico de CCS.

O estudo mostrou também alguns olhos com o TLS entre 8 e 15 mm/min., com presença de sinais clínicos de CCS e padrão no TCL que variou entre I ou II para uns e III e IV para outros. Segundo Slatter, todos estes seriam portadores de CCS; porém, o TCL permite, mais uma vez, uma classificação bem mais precisa do tipo de CCS. Por exemplo, aqueles em que o padrão variou entre I e II no TCL, não são portadores de ceratoconjuntivite seca qualitativa; mas como há presença de sinais clínicos e o TLS está nessa faixa de valores, confirma-se o quadro de CCS quantitativa. Já os que obtiveram padrão III ou IV no TCL, como apresentam sinais clínicos de CCS, o TLS se encontra dentro dos valores suspeitos para CCS quantitativa e o padrão do TCL comprova se tratar de uma CCS qualitativa; deve considerar como portadores de ambos os tipos de CCS.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos com a pesquisa, conclui-se que:

1. O Teste de Cristalização da Lágrima (TCL) é exequível na Medicina Veterinária, com um baixo custo e fácil realização.
2. Os padrões determinados pela Medicina Humana diferem dos encontrados nos cães (*Canis familiares*) da raça Beagle.
3. A padronização do TCL comparada com o resultado do TLS possibilitou o diagnóstico precoce e mais preciso de CCS quantitativa e/ou qualitativa para essa espécie.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como uma maneira de facilitar a análise da cristalização da lágrima, outros trabalhos deverão criar: um meio para a fixação das lâminas e um modelo de padronização do TCL com apenas três padrões (I: não portador de CCS, II: suspeito de CCS, III: portador de CCS) para facilitar ainda mais essa classificação; visto a dificuldade apresentada neste estudo quanto à diferenciação dos padrões II e III.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, D. E. Iatrogenic Keratoconjunctivitis sicca in a dog. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 921-924, 2004.

ALMEIDA, D. E. Conjunctival effects of canine distemper virus-induced Keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, p. 211-215, 2009.

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.

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

BRITO, F. L. C. Microalterations in the third eyelid of dogs with Keratoconjunctivitis sicca secondary to distemper. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 340-344, 2007.

CARRINGTON, S. D. Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film I. The normal tear film of the dog. **Journal Small Animal Practice**, v. 28, p. 605-622, 1987.

COLITZ, C. M. H. Doenças do sistema lacrimal. In: BIRCHARD, S.J., SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Roca, cap. 139, p. 1416-1421, 2008.

CRISPIN, S. The lacrimal system. In: PETERSEN-JONES, S.; CRISPIN, S. (Eds.) **BSAVA manual of small animal ophthalmology**. 2nd. ed. England: BSAVA, cap. 6, p. 105-123, 2002.

CULLEN, C. L.; NJAA, B. L.; GRAHN, B. H. Ulcerative keratitis associated with qualitative tear film abnormalities in cats, Blackwell Publishing Inc., **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, issue 3, p. 197-204, 1999.

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

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

FELDBERG, S.; CORDEIRO, H.; SATO, E.H.; FILHO, D.M.; NISHWAKI-DANTAS, M.C.; ENDO, R.M.; DANTAS, P.E.C. Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjogren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 71, p. 228-233, 2008.

GIULIANO, E. A.; MOORE, C. P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**, 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, v.2, cap. 13, p. 633-661, 2007

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.

GELATT, K. N. Doenças e cirurgia da terceira pálpebra do cão. In: _____. **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, cap. 6, p. 113-124, 2003.

GELATT, K. N. Doenças e cirurgia dos sistemas lacrimal e nasolacrimal do cão. In: _____. **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, cap. 4, p. 73-94, 2003.

GELATT, K.N. Manifestações oftálmicas de doenças sistêmicas. In: _____. **Manual de**

oftalmologia veterinária. São Paulo: Manole, cap. 17, p. 459-508, 2003.

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.

GRANH, B. H.; STOREY, E. S. Lacrimostimulants and lacrimomimetics, **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 34, p. 739-753, 2004.

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, 1991.

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.; MILLINMS, 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, 2006.

HERRERA, H. D. Severe, unilateral, unresponsive Keratoconjunctivitis sicca in 16 juvenile Yorkshire Terriers. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, p. 285-288, 2007.

IWATA, S. Chemical composition of the aqueous phase. **International Ophthalmology Clinics**, v. 13, p. 29-46, 1983.

LIOTET, S.; KOGBE, O.; SCHEMANN, J. F. Crystallization of tears: a test of the quality of the lacrimal film? **Bull Society Ophthalmology France**, v. 87, n. 3, p. 321-324, 1987.

KOCH, S. A.; SYKES, J. Keratoconjunctivitis sicca. In: RIIS, R.C. **Small animal ophthalmology secrets**. Philadelphia: Hanley & Belfus, cap. 10, p. 57-60, 2002.

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. 710-708, 2000.

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.

NORM, M. Ferning in conjunctival-cytologic preparations. crystallization in stained semiquantitative pipette samples of conjunctival fluid. **Acta Ophthalmology** (Copenh), v. 65, n. 1, p. 118-122, 1987.

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.; GINNETO, C.; FAZIO, F.; ASSENZA, A.; CAOLA, G. Daily rhythm of tears 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.

ROLANDO, M. The fern test; a critical analysis. **Obstet Gynecol**, v. 11, n. 1, p. 30-34, 1958.

ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. **Chibret International Journal Ophthalmology**, v. 2, n. 4, p. 32-41, 1984.

ROLANDO, M.; BALDI, F.; CALABRIA, G. A. Tear mucus ferning test in keratoconjunctivitis sicca. In: Holly FJ, editor. The precocular tear film in health disease, and contact lens wear. Lubbock, Texas; **Dry Eye Institute**, p. 203-210, 1986.

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

SLATTER, D. Lacrimal System. **Fundamentals of Ophthalmology Veterinary**. 3rd. W.B. Saunders Company, cap. 10, p. 259-282, 2005.

SOUZA. C.R. Análise de Poder Discriminativo Através de Curvas ROC. Disponível em: <<http://www.crsouza.blogspot.com/2009/07/analise-de-poder-discriminativo-atraves.html>>

Acesso em 27/12/2011.

STADES, F. C. Aparelho lacrimal. In: _____. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, cap. 6, p. 54-63, 1999.

STILES, J.; MCDERMOTT, M.; BIGSBY, D.; WILLIS, M.; MARTIN, 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, 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.

TABBARA, K. F.; OHUMOTO, M. Ocular ferning test. A qualitative test for mucus deficiency. **Ophthalmology**, v. 89, n. 6, p. 712-714, 1982.

WESTERMEYER, H. D.; WARD, D. A.; ABRAMS, K. Brees predisposition to congenital alacrima in dogs, Blackwell Publishing , Ltd, **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, issue 1, p. 1-5, 2009.

WILLIAMS, D.L. Analysis of tears uptake by the schirmer tears test strip in the canine eye. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 5, p. 325-330, 2005.

WYON, N. M.; WYON, D. P. Measurement of acute response to draught in the eye. **Acta Ophthalmol** (Copenh), v. 65, n. 4, p. 385-392, 1987.

8 ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1A: Coeficiente de concordância Kappa, erro padrão (EP), teste t de Student e nível descritivo da comparação entre os 5 examinadores das lâminas de cristalização das lágrimas de pacientes humanos com e sem síndrome de Sjogren, utilizando os escores não agregados (FELDBERG, 2008).

Examinador	Examinador	Kappa	EP	t	p
1	2	0,72	0,07	9,40	<0,0001
1	3	0,41	0,08	5,76	<0,0001
1	4	0,45	0,09	5,86	<0,0001
1	5	0,40	0,09	5,14	<0,0001
2	3	0,54	0,08	7,19	<0,0001
2	4	0,61	0,08	8,12	<0,0001
2	5	0,56	0,08	7,18	<0,0001
3	4	0,62	0,08	8,75	<0,0001
3	5	0,51	0,08	6,86	<0,0001
4	5	0,67	0,07	8,74	<0,0001

EP= erro padrão; t= t de Student

ANEXO B

Tabela 1B: Coeficiente de concordância Kappa, erro padrão (EP), teste t de Student e nível descritivo da comparação entre os 5 examinadores das lâminas de cristalização das lágrimas de pacientes humanos com e sem síndrome de Sjogren, utilizando os escores agregados (I com II e III com IV) (FELDBERG, 2008).

Examinador	Examinador	Kappa	EP	t	p
1	2	0,92	0,05	7,47	<0,0001
1	3	0,82	0,08	6,71	<0,0001
1	4	0,85	0,07	6,95	<0,0001
1	5	0,92	0,05	7,47	<0,0001
2	3	0,82	0,08	6,67	<0,0001
2	4	0,86	0,07	6,92	<0,0001
2	5	0,93	0,05	7,46	<0,0001
3	4	0,97	0,03	7,79	<0,0001
3	5	0,89	0,06	7,24	<0,0001
4	5	0,93	0,05	7,50	<0,0001

EP= erro-padrão; t= t de Student

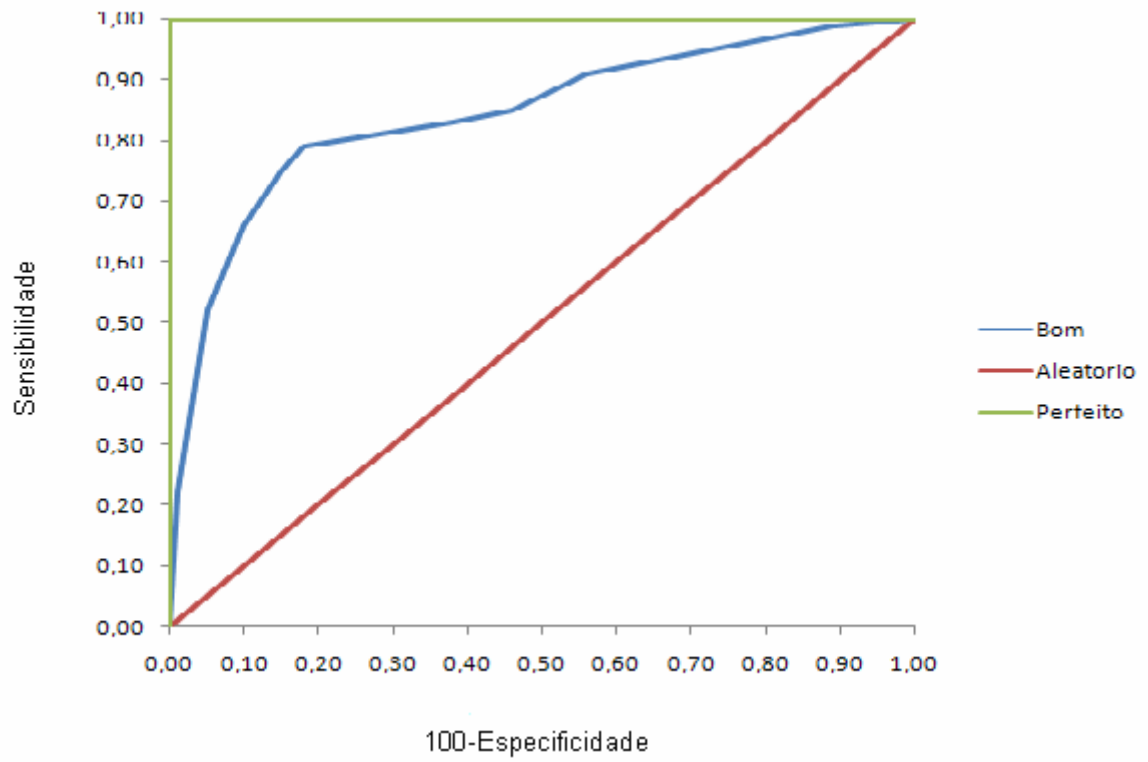
ANEXO C

Tabela 1C: Coordenadas da curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Sensibilidade e especificidade para diversos pontos de corte para cada examinador do teste de cristalização da lágrima realizado em pacientes humanos (FELDBERG, 2008).

	Ponto de Corte	Sensibilidade	Especificidade	1 - Especificidade
Examinador 1	0,00	1,00	0,00	1,00
	1,50	1,00	0,64	0,36
	2,50	0,85	1,00	0,00
	3,50	0,50	1,00	0,00
	5,00	0,00	1,00	0,00
Examinador 2	0,00	1,00	0,00	1,00
	1,50	1,00	0,47	0,53
	2,50	0,90	0,98	0,02
	3,50	0,65	1,00	0,00
	5,00	0,00	1,00	0,00
Examinador 3	0,00	1,00	0,00	1,00
	1,50	1,00	0,31	0,69
	2,50	0,95	0,93	0,07
	3,50	0,70	1,00	0,00
	5,00	0,00	1,00	0,00
Examinador 4	0,00	1,00	0,00	1,00
	1,50	0,95	0,56	0,44
	2,50	0,95	0,96	0,04
	3,50	0,65	1,00	0,00
	5,00	0,00	1,00	0,00
Examinador 5	0,00	1,00	0,00	1,00
	1,50	1,00	0,56	0,44
	2,50	0,95	1,00	0,00
	3,50	0,75	1,00	0,00
	5,00	0,00	1,00	0,00

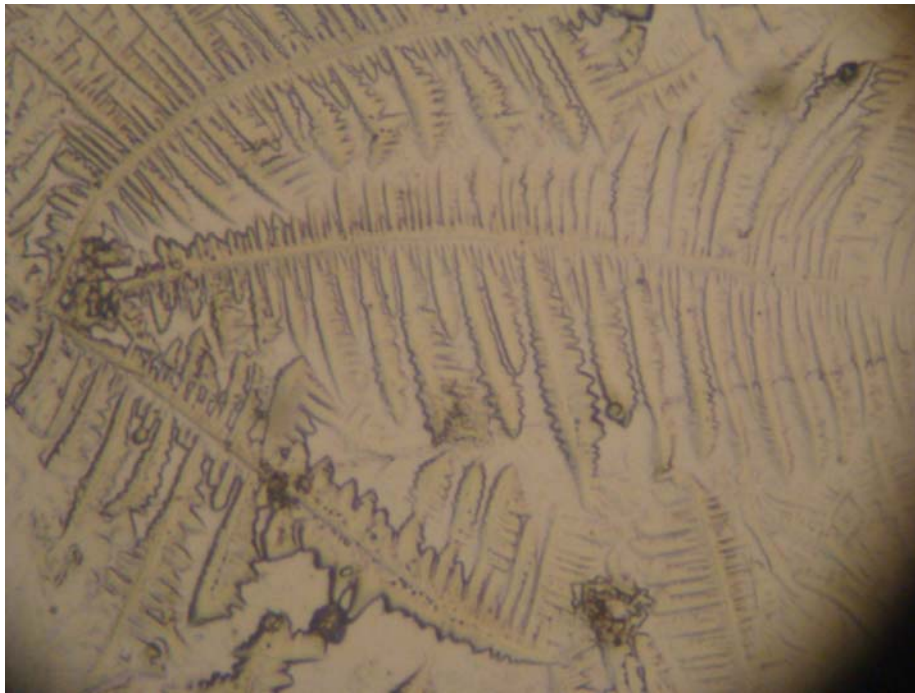
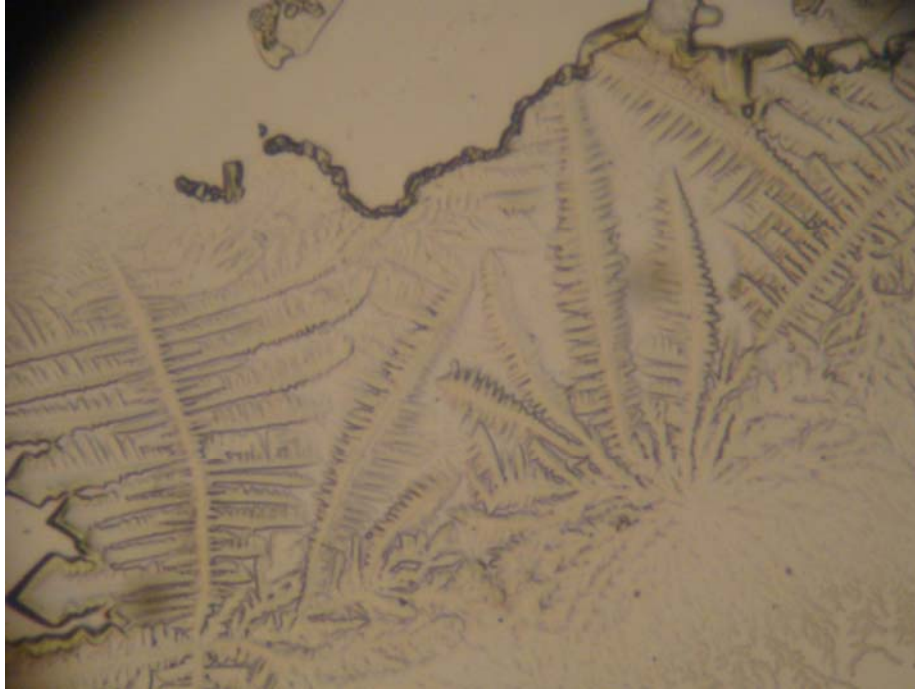
ANEXO D

Gráfico 1D: exemplos de curvas ROC com diferentes classificadores: bom, aleatório e perfeito (SOUZA, 2009).



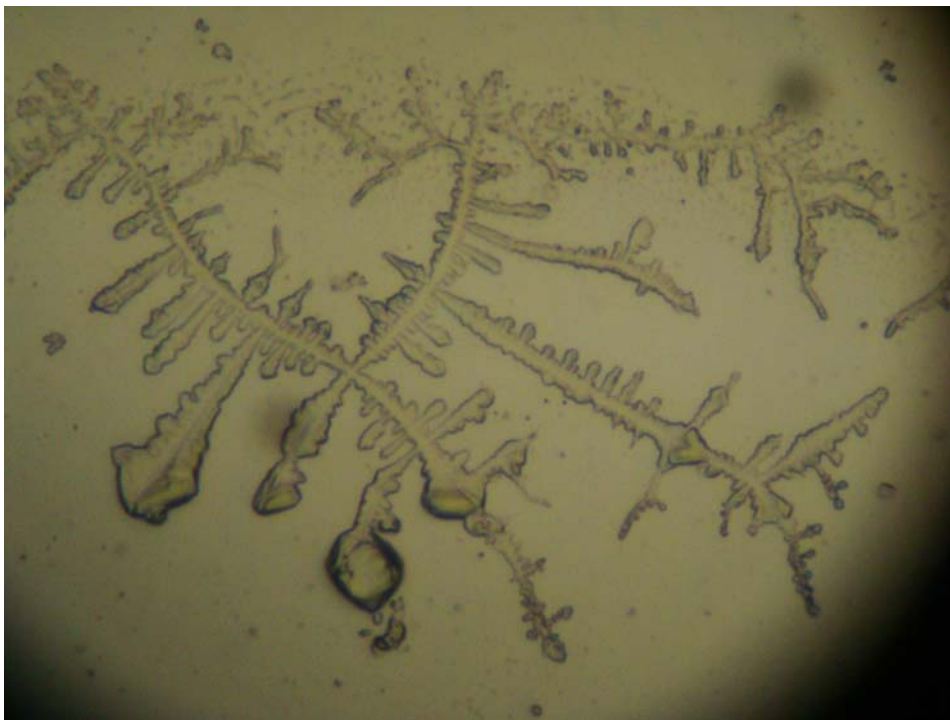
ANEXO E

Figura 1E: duas fotos representando o padrão I do TCL em cães da raça Beagle, em aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.



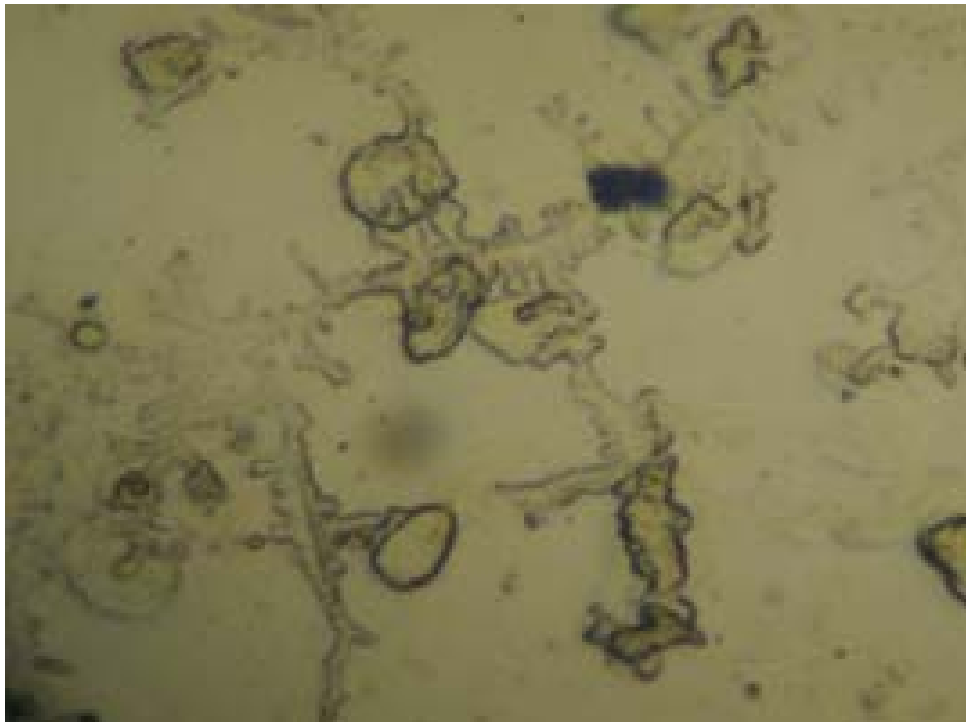
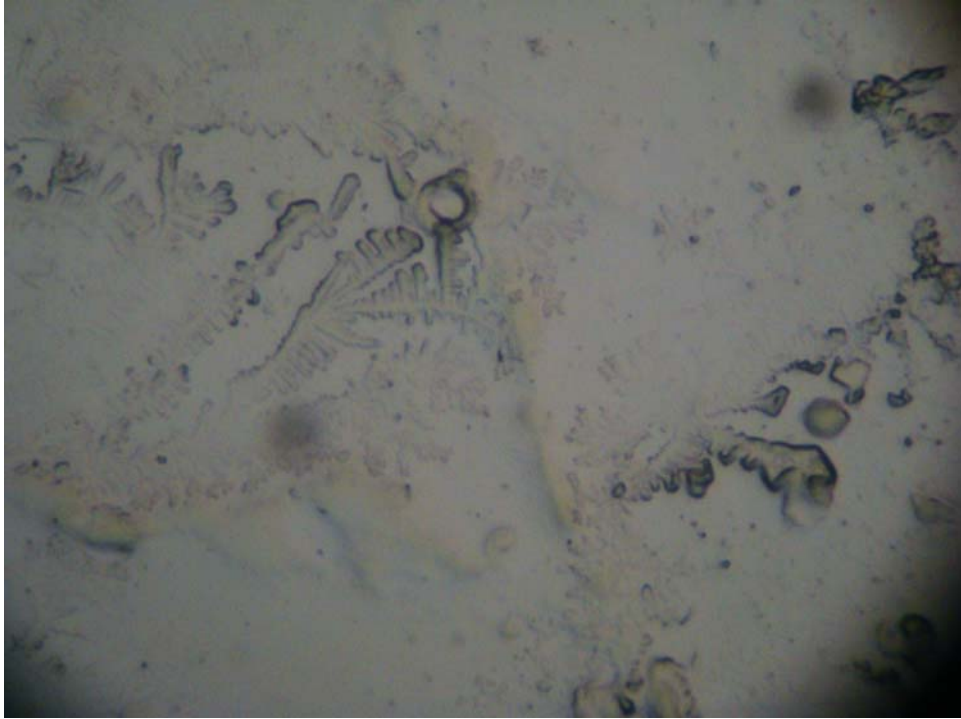
ANEXO F

Figura 1F: duas fotos representando o padrão II do TCL em cães da raça Beagle, em aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.



ANEXO G

Figura 1G: duas fotos representando o padrão III do TCL em cães da raça Beagle, em aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.



ANEXO H

Figura 1H: duas fotos representando o padrão IV do TCL em cães da raça Beagle, em aumento de 10x, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

