

DANIELA DA SILVA PEREIRA CAMPINHO

**EFEITO DA OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA SOBRE PRODUÇÃO
LACRIMAL, CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL DE CADELAS**

RECIFE
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

DANIELA DA SILVA PEREIRA CAMPINHO

**EFEITO DA OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA SOBRE PRODUÇÃO LACRIMAL,
CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL DE CADELAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina de O. C. Coelho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Flaviane M. F. M. Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabricio Bezerra Sá

RECIFE
2016

Ficha catalográfica

C196i Campinho, Daniela da Silva Pereira
 Efeito da ovariosalpingohisterectomia sobre a produção
 lacrimal, citologia e microbiota conjuntival de cadelas /
Daniela da
 Silva Pereira Campinho. – Recife, 2016.
 66 f. : il.

 Orientadora: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho.
 Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2016.
 Inclui referências e apêndice(s).

 1. BUT 2. Olho 3. Estradiol 4. Testosterona 5. CCS I.
Coelho,
 Maria Cristina de Oliveira Cardoso, orientadora II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA SOBRE PRODUÇÃO LACRIMAL,
CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL DE CADELAS**

Tese de Doutorado elaborada por Daniela da Silva Pereira Campinho

Aprovada em 30/06/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho - Presidente
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dra. Ana Luiza Guimarães Bessa
Universidade Mauricio de Nassau

Profa. Dra. Ana Paula Monteiro Tenório
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Fabrício Bezerra Sá
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Dra. Priscilla Bartolomeu de Araújo
Clínica de Bovinos de Garanhuns da UFRPE

A minha FAMÍLIA, meu chão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da Vida.

Agradeço minha orientadora e amiga, Professora Maria Cristina de O. C. Coelho, pela orientação, compreensão, paciência, disponibilidade, ajuda e apoio durante os anos de execução deste trabalho. Que ultrapassaram a barreira acadêmica e se entremearam na vida pessoal. Serei sempre grata pelos frutos diretos e indiretos que esta pesquisa me trouxe, e que irei levar por toda vida. Muitíssimo obrigada.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante os primeiros anos do Doutorado.

À UFRPE, que me oportunizou diversos momentos de aprendizagem nesses últimos 15 anos, momentos estes que nortearam minha vida profissional e pessoal. Sou muito grata a esta casa e as pessoas que dela fazem parte.

Ao Prof. Fabrício Bezerra de Sá, pela co-orientação, pela disponibilidade, por toda ajuda direta na execução desse trabalho. Obrigada é pouco por tudo que aprendi, e pelos resultados que isso me trouxe.

À amiga Luciana Coutinho, pela imensa ajuda: sem você a execução dessa pesquisa seria bem mais difícil!

À Professora Flaviane Maria Florêncio, por toda disponibilidade, ajuda e apoio durante estes anos e pelo acolhimento no momento de minha chegada à UNIVASF. Obrigada, hoje e sempre.

A todos os amigos do Hospital Veterinário da UFRPE, muitos contribuíram de alguma forma para que esta pesquisa se tornasse viável.

A todos os amigos do Laboratório de Oftalmologia Experimental da UFRPE.

A Professora e amiga Grazielle Aleixo, pela ajuda e apoio amigo incansável durante esses anos. Muito obrigada!

À Priscilla Araújo, amiga, comadre e irmã, pela parceria e cumplicidade de sempre, pela ajuda direta e indireta na construção deste trabalho.

A Daniel Nunes, pela ajuda e disponibilidade na realização das avaliações hormonais!

Aos colegas e amigos da UNIVASF, por emprestarem ombros e ouvidos, por compreenderem as ausências.

Agradeço especialmente a Adalberto Campinho, sempre ao meu lado, sempre me ajudando a encontrar soluções para as dificuldades que surgiram. Por cuidar e zelar dos nossos filhos durante tantos momentos de ausência. Agradeço o companheirismo, o carinho, a lealdade, o cuidado. Obrigada!

Aos meus Pais, Ana e Enildo, por me apoiarem e me ajudarem imensamente em mais esta etapa, meus exemplos de vida.

As minhas irmãs Amanda e Viviane pelo companheirismo, incentivo e apoio.

As famílias Pereira e Campinho, pelo apoio, em especial aqueles que cuidaram dos meus filhos na minha ausência, como se fossem seus, a MINHA ETERNA GRATIDÃO!

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho acontecesse: muito obrigada! Hoje avanço mais um degrau em minha formação, e muitos foram os que tornaram possível esse avanço.

Quem faz o bem, conquista paz interior.

Autor desconhecido.

EFEITO DA OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA SOBRE PRODUÇÃO LACRIMAL, CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL DE CADELAS

RESUMO: Objetivou-se avaliar a efeito da ovariosalpingohisterectomia sobre a produção lacrimal, citologia e microbiologia de cadelas. Foram utilizadas 56 cadelas castradas, sendo submetidas a exames clínico e oftálmico, avaliação microbiológica e citologia conjuntival esfoliativa da conjuntiva palpebral e dosagens séricas de estradiol e testosterona. Avaliou-se animais com idade entre um e quatro, sendo dividido em grupos de animais inteiros e animais castrados, respeitando o intervalo de um a quatro anos entre os grupos. Verificou-se que cadelas com produção lacrimal reduzida houve predominância de células epiteliais superficiais e um aumento das células queratinizadas, na citologia conjuntival. No estudo microbiológico da conjuntiva palpebral foi observado que não há mudança na microbiota, sendo *Staphylococcus sp* o agente bacteriano mais encontrado e entre os fungos *Candida sp*. Foi observado que 59,9% dos animais castrados apresentam diminuição no Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), e destes 39,5% apresentaram valores inferiores a 10 mm, em relação ao Tempo de Ruptura do Filma Lacrimal (TRFL), 98,8% dos animais pertencentes aos grupos de indivíduos castrados apresentaram diminuição. Quando comparada a eficiência dos testes empregados para detecção de olho seco, o TRFL mostrou-se mais eficiente. Houve uma correlação fraca entre o TLS e os níveis de testosterona assim como no TRFL e os níveis de testosterona, por outro lado houve uma correlação positiva forte entre os mesmos testes e os níveis de estradiol. Conclui-se que as alterações dos níveis dos hormônios sexuais que ocorrem após as cadelas serem submetidas à castração afetam quantitativamente e qualitativamente o filme lacrimal. O que caracteriza que estes animais tem uma maior predisposição ao desenvolvimento de olho seco.

PALAVRAS-CHAVE: TRFL, olho, estradiol, testosterona, CCS.

EFFECT ON OVARIOSALPINGOHISTERECTOMY TEAR PRODUCTION, CYTOLOGY AND BITCHES MICROBIOTA CONJUNCTIVAL

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the effect of ovariosalpingohysterectomy on tear production, cytology and microbiology bitches. They were used 56 castrated bitches, being subjected to clinical and ophthalmic examinations, microbiological evaluation and conjunctival exfoliative cytology of eyelid conjunctiva and serum levels of estradiol and testosterone. We evaluated animals aged between one and four, divided into whole groups of animals and neutered animals, respecting the range of one to four years between the groups. It was found that dogs with reduced tear production predominated superficial epithelial cells and increased keratinized cells in the conjunctival cytology. In the microbiological study of the palpebral conjunctiva it was observed that there is no change in the microbiota, and *Staphylococcus* sp bacterial agent found and among the fungi *Candida* sp. It was observed that 59.9% of castrated animals show a decrease in Schirmer Tear Test (TLS), and of these 39.5% had values below 10 mm, in relation to Break Time Shoots Lacrimal (TRFL) 98.8 % of animals belonging to the castrated groups of individuals showed a decrease. Compared the effectiveness of tests used for dry eye detection, TRFL was more efficient. There was a weak correlation between TLS and testosterone levels as in TRFL and testosterone levels, on the other hand, there was a strong positive correlation between these tests and estradiol levels. It concludes that changes in sex hormone levels that occur after the dogs were subjected to castration quantitatively and qualitatively affect the tear film. What characterizes these animals have a greater predisposition to the development of dry eye.

KEYWORDS: TRFL, estradiol, testosterone, KCS, eye.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

- Figura 1** Fotomicrografias de células conjuntivais de cão colhidas por meio de abrasão com escova. (A) Célula Caliciforme. (B) Célula Basal. (C) Células Intermediárias. (D) Células Superficiais. (E) Célula Escamosa. Giemsa, 400x. 54

LISTA DE QUADROS E TABELAS

ARTIGO 1

- Quadro 1** Comparação entre os valores obtidos nos testes teste lacrimal de Schirmer e tempo de ruptura do filme lacrimal e dosagens de testosterona e estradiol por grupo. 43
- Quadro 2** Correlação de Spearman entre as variáveis do estudo. 44

ARTIGO 2

- Tabela 1** Resultados do teste lacrimal de Schirmer, citologia conjuntival e exame microbiológico de animais sem alteração na produção lacrimal e animais com produção lacrimal diminuída. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS - Ceratoconjuntivite Seca

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DMFA – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

E2 - Concentração Sérica Estradiol

IgA - Imunoglobulina A

sIgA - Imunoglobulina A secretada

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IgE - Imunoglobulina E

IgD - Imunoglobulina D

LH - Hormônio Luteinizante

MMPs - Metaloproteinases de Matriz

n – número de amostras

OMS - Organização Mundial de Saúde

OSH – Ovariosalpingohisterectomia

OV – Ovariectomia

P4 – Progesterona

SRD – Sem Raça Definida

SS - Síndrome de Sjögren

TLS - Teste Lacrimal de Schirmer

TLS I - Teste Lacrimal de Schirmer sem utilização de anestésico local

TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento- β

TRFL - Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Esterelização	18
3.2	O sistema lacrimal	19
3.3	O filme lacrimal	20
3.4	Receptores de hormônios sexuais no olho	23
3.5	Ceratoconjuntivite Seca	26
4.	REFERÊNCIAS	32
5.	ARTIGOS	38
5.1	ARTIGO 1 – Influencia da Ovariosalpingohisterectomia na produção lacrimal de cadelas	39
5.2	ARTIGO 2 – Aspectos citológicos e microbiológicos da mucosa conjuntival de cadelas com produção lacrimal reduzida	48
6.	APÊNDICE A – Ficha clínica das pacientes	63

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde afirma que o controle da população de cães e gatos deve atuar na procriação animal sem controle e na falta de responsabilidade do ser humano quanto à sua guarda (WHO, 1990). Visando esse controle populacional muitos tutores optam pela esterilização dos seus animais evitando assim a procriação sem controle. Outras indicações clínico-cirúrgicas da esterilização seriam o tratamento e/ou prevenção de neoplasias ovarianas e mamárias, piometra e pseudogestação, hiperplasia vaginal recorrente, eliminação da possibilidade de transmissão de doenças hereditárias como a demodicose generalizada. (HEDLUND, 2002; OLIVEIRA et al., 2003; VAN GOETHEM et al., 2006; SANTOS et al., 2009).

A ovariosalpingohisterectomia (OSH) é um procedimento cirúrgico que promove a esterilização das fêmeas, sendo a cirurgia eletiva mais realizada em clínicas e hospitais veterinários (HOWE, 2006). Paralelamente à necessidade de controle populacional, questões éticas correlacionando procedimentos cirúrgicos invasivos e bem-estar animal tem sido muito discutidas. Embora a ovariosalpingohisterectomia seja considerada um método contraceptivo que auxilia no controle da população de cães, bem como na prevenção de doenças associadas ao sistema reprodutor, esta pode trazer algumas desvantagens como a incontinência urinária e a obesidade, havendo também relatos de cistite, obstrução urinária, retardo de crescimento (castração pediátrica) e tumores de glândulas adrenais. (MACEDO, 2011; SOUZA e BARROS, 2013). Vem sendo observados clinicamente em animais que foram submetidos ao procedimento de esterilização, sinais de possíveis ceratoconjuntivite seca (CCS), incluindo secreção ocular mucopurulenta e hiperemia de conjuntiva.

Estudos relacionados com a Síndrome de Sjögren, enfermidade que afeta principalmente mulheres que se encontram na menopausa e/ou pós-menopausa, mostra que há um declínio da produção de hormônios sexuais, o que pode levar a um quadro de xerostomia e olhos secos (SEAMON et al., 2008). A esterilização de animais envolve a exérese dos ovários, levando a um declínio de hormônios sexuais circulantes semelhantes a mulheres na pós-menopausa o que embasa a hipótese de que o declínio de hormônios sexuais também poderia levar a um quadro de olho seco em cadelas.

Estudos realizados em humanos, ratos e coelhos descrevem o papel dos andrógenos, na função das glândulas meibomianas e lacrimais, onde sua presença em níveis abaixo do

normal pode ter por consequência uma disfunção nestas glândulas, levando a um quadro de CCS por insuficiência qualitativa do filme lacrimal (KRENZER et al., 2000; ROCHA et al., 2000; SULLIVAN et al., 2000).

A CCS é uma enfermidade ocular frequente em cães. Caracteriza-se por uma deficiência na formação do componente aquoso da lágrima, o que produz uma desidratação e inflamação tanto da conjuntiva como da córnea. Os sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca variam dependendo do tempo decorrido do surgimento da afecção e da extensão do ressecamento corneano, podendo estar presente: desconforto ocular, fotofobia, blefarospasmo, secreção ocular mucopurulenta, hiperemia conjuntival crônica, vascularização na córnea, úlceras corneanas e ceratite pigmentar. Em algumas ocasiões pode aparecer uma forma muito aguda e grave de CCS, nestes casos os olhos sofrem um processo doloroso agudo associado com uma ulceração corneal axial, a enfermidade corneal progressiva e redução da visão, podendo levar a perda da visão (GELATT, 2003).

A etiologia exata da ceratoconjuntivite seca é desconhecida, mas acredita-se ser multifatorial (BIRCHARD e SHERDING, 1998). A CCS pode ocorrer por meio de três mecanismos principais, são eles: diminuição da quantidade de lágrima, modificação da qualidade e/ou diminuição da estabilidade da lágrima (MALKI, 2012).

Estudos em humanos remetem a um novo conceito relacionado a ceratoconjuntivite, indicando que andrógenos estariam relacionados supostamente indutores do acúmulo de citocinas anti-inflamatórias nas glândulas lacrimais (DEWS, 2007). Algumas condições como a senilidade e fatores idiopáticos podem reduzir a produção de andrógenos, o que leva a mudanças na imunomeostase da conjuntiva, pela redução na produção de Fator de transformação de crescimento- β (TGF- β). Isso altera a detecção local de antígenos, favorecendo a atuação dos linfócitos efetores e desta forma desencadeando a inflamação local (SMITH, 2005; FRIDMAN et al., 2004; BREWITT & SISTANI, 2001). Considerando a alta frequência com a qual a OSH é realizada, especialmente com fins de controle populacional, e a escassez de pesquisas de sua correlação com a produção lacrimal, dentro da Medicina Veterinária, torna-se importante investigar as consequências das alterações hormonais induzidas pelo procedimento cirúrgico visando a prevenção de distúrbios fisiopatológicos que possam se manifestar.

Baseado na hipótese de que a esterilização pode levar a um quadro de olho seco, propõe-se uma investigação com o intuito de detectar se as baixas taxas hormonais

desencadeadas pela OSH são capazes de causar um distúrbio na produção lacrimal, levando assim a sinais característicos de uma CCS em cadelas. Estes resultados podem ser úteis na prevenção deste quadro, indicando a necessidade de administração de colírios para reposição hormonal ou a estimulação da produção lacrimal após a cirurgia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência da ovarioalpingohisterectomia em cadelas na produção de lágrimas e no aparecimento da ceratoconjuntivite seca.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citologia conjuntival de animais com a diminuição da produção lacrimal;
- Investigar a microbiota presente na conjuntiva de animais com a produção lacrimal reduzida;
- Avaliar os níveis séricos de estradiol e testosterona, relacionando-os com a produção lacrimal;
- Avaliar alterações oftálmicas em fêmeas caninas submetidas à OSH.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Esterilização

Existem diversos métodos de intervenção na capacidade reprodutiva de cães e gatos, sejam por procedimentos cirúrgicos ou não. A esterilização cirúrgica por sua vez é um dos procedimentos cirúrgicos mais realizados na prática veterinária (HOWE, 2006), por ser o meio mais confiável de controle populacional, bem como o procedimento preferencial no tratamento das doenças do sistema reprodutor (VAN GOETHEM, 2006). Muitas técnicas cirúrgicas de esterilização têm sido descritas, incluindo a ovariosalpingohisterectomia (OSH) pela linha média, a OSH pelo flanco, ovariectomia, OSH e ovariectomia laparoscópica, em fêmeas, e orquiectomia e vasectomia em machos (HOWE, 2006).

Em fêmeas a esterilização é realizada principalmente pela técnica de ovariosalpingohisterectomia e ovariectomia. O acesso mais comum da OSH é pela linha mediana ventral, todavia o acesso lateral também está sendo bastante usado nas campanhas de esterilização cirúrgica em massa, obtendo-se a exposição dos órgãos onde os pedículos ovarianos são unidos, transfixados e seccionados. O corpo uterino é perfurado em ambos os lados perto da cérvix para ligar as artérias e as veias uterinas. Em seguida, secciona-se o corpo uterino. Na técnica da OV o ovário é identificado e tracionado à ferida cirúrgica, estes são ligados e em seguida é realizada a exérese do mesmo (HEDLUND, 2002).

Nas fêmeas a esterilização tem diversas indicações devido a enfermidades relacionadas ao sistema reprodutor, tais como, prevenção de doenças ovarianas, no tratamento de doenças hormônios-dependentes (pseudociese, piometra, hiperplasias mamárias, hiperplasia vaginal, prolapso vaginal), doenças relacionadas à gestação (distorcia, aborto, retenção placentária), piometra, além da redução do risco de neoplasias uterinas, ovarianas e sobre tudo neoplasias mamárias (ROMAGNOLI, 2008). É reconhecido que a idade, na qual a OSH é realizada nas fêmeas, se relaciona com o risco de desenvolver o tumor de mama. Assim, sendo realizada antes do primeiro estro reduz a incidência da neoplasia mamária para 0,5%, mas esse efeito benéfico diminui gradualmente após o primeiro ciclo estral (FONSECA, & DALECK, 2000). Auxilia ainda no tratamento para a epilepsia, doenças endócrinas como diabetes, eliminação da possibilidade de transmissão de doenças hereditárias

como a demodicose generalizada e doenças não relacionadas ao sistema reprodutor (SIEGL, BÖHM e FERGUSON, 1994).

Por vezes o tutor opta pela esterilização para suprimir o estro, seja pelo incomodo de suas manifestações bem como para prevenir uma gestação indesejada e posterior prole (OLIVEIRA, 2007). Estudo realizado por Van Goethem et al. (2006), com cadelas que foram submetidas a OSH, revelou que 82% dos procedimentos foram realizados com o objetivo de esterilização eletiva e enquanto apenas 18% foram para resolução de enfermidades reprodutivas e/ou como terapia adjuvante de neoplasias mamárias.

Muito embora o procedimento de OSH seja tecnicamente simples, deve-se considerar que pode-se ter complicações como qualquer procedimento cirúrgico (POLLARI, BONNETT e BAMSEY, 1996). As mais comumente citadas são as hemorragias intraoperatórias, trauma no ureter e desenvolvimento de fistulas e granulomas uterinos (SANTOS et al., 2009).

Embora existam diversas indicações para a esterilização, é descrito na literatura efeitos colaterais indesejáveis do procedimento cirúrgico, tais como obesidade, cálculos uretrais (HOWE et al., 2000), alterações na pelagem, incontinência urinaria, inatividade, vaginites e dermatites peri-vulvares (STUBBS et al., 1996).

Estudos têm relacionado a exérese dos ovários com o aparecimento do olho seco. A ovariectomia elimina a principal fonte de andrógenos e estrógeno circulantes. O efeito do estrógeno na glândula lacrimal ainda é controverso. Um estudo realizado por Wickham et al (1998), demonstrou expressão de receptores de estrógeno na glândula lacrimal de ratos, coelhos e seres humanos.

3.2 O sistema lacrimal

O aparelho lacrimal é constituído por porções secretoras e excretoras, respectivamente responsáveis pela produção e drenagem do filme lacrimal (GELATT, 2003). A porção secretora é constituída por um conjunto de glândulas, que juntas vão produzir o filme lacrimal pré-corneano. A glândula lacrimal principal e a glândula da terceira pálpebra são responsáveis por quase toda a produção da fase aquosa da lágrima, já as glândulas lacrimais acessórias, não visíveis macroscopicamente, vão produzir as outras fases (lipídica e mucóide) do filme lacrimal pré- corneano (CRISPIN, 2002).

As glândulas lacrimais da órbita e da terceira pálpebra são histologicamente constituídas por unidades secretórias, ductos e tecido conjuntivo de sustentação. Os componentes epiteliais (ductos e unidades secretórias) compõem o parênquima glandular. Tecido conjuntivo, incluindo vasos sanguíneos e fibras nervosas, compõe o estroma glandular (CORMACK, 1996). No cão, três a cinco ductos da glândula lacrimal orbitária abrem-se no fórnice conjuntival dorsolateral, enquanto a glândula da terceira pálpebra libera as lágrimas aquosas na superfície corneana através de múltiplos ductos entre os folículos linfóides na face interna da terceira pálpebra (SLATTER, 2007).

O complexo glandular palpebral é composto pelas glândulas meibomianas (tarsais), as glândulas de Zeis, as glândulas de Moll, as glândulas lacrimais acessórias. As glândulas meibomianas são macroscopicamente visíveis através da delgada conjuntiva palpebral. São glândulas halócrinas em forma de tubos, arranjadas linearmente na margem ocular palpebral, que desembocam na face palpebral interna (GELATT, 2003). No cão, há cerca de 20 a 40 aberturas tarsais na margem palpebral, as quais são mais numerosas na pálpebra superior que na inferior. As glândulas de Zeis e de Moll são Moll e Zeiss estão situadas na borda palpebral onde desembocam. As de Moll são glândulas sudoríparas modificadas e as de Zeiss são glândulas sebáceas rudimentares, acessórias do sistema ciliar (SLATTER, 2007).

Uma parte do filme é evaporada e o restante é removido pelo sistema de drenagem (LAVACH, 1998). O sistema de drenagem é composto pelos pontos lacrimais superior e inferior, localizados, respectivamente, nas pálpebras inferiores e superiores por canalículos superior e inferior, saco lacrimal e ducto nasolacrimal (LIEBICH e KÖNIG, 2004; RIBEIRO et al., 2008)

3.3 O filme lacrimal

Ao abrir os olhos, a lágrima (filme lacrimal) se espalha por toda a superfície corneana tornando esta superfície lisa, transparente, opticamente clara, capaz de proporcionar uma boa visão. A homogeneidade do filme lacrimal é essencial para a integridade da córnea transparente. Ela produz um ambiente umidificado para as células epiteliais, lubrificando, removendo partículas e células mortas da superfície ocular, fornecendo, também, nutrientes e oxigênio, além de ação bactericida (ALVES, 2010).

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. O filme lacrimal é totalmente renovado em poucos minutos (BERGER; KING, 1998). O mesmo atua como barreira que protege a córnea do meio exterior e a sua espessura no centro da córnea é de 7 a 9 μm . O filme lacrimal em cães possui pH entre 6,8 a 8,0 com uma média de 7,5 (CRISPIN, 2002).

O filme lacrimal é um fluido trilaminar complexo, importante do ponto de vista clínico para a integridade ótica e a função normal do olho, distribuído sobre a superfície ocular pelo ato de piscar dos olhos. Composto por três camadas que diferem na sua secreção e composição, uma camada mais superficial lipídica, uma camada intermediária aquosa, e uma mais interna a camada de mucina (GUILLON e MAISSA, 2010). Alguns autores atualmente tendenciam a classificar em duas camadas: lipídica e aquosa-mucosa (ALVES, 2010). Onde, uma fina camada lipídica teria a função principal de retardar a evaporação e manter o filme lacrimal uniforme sobre a camada interna e mais espessa, contendo muco diluído que vai se concentrando em direção ao epitélio. Nessa divisão não haveria camada aquosa delimitada como descrito anteriormente (FONSECA et al., 2010).

Uma camada superficial externa e oleosa, que se torna fluida com a temperatura corporal e estabelece o contato entre o ar e a lágrima, composta por uma mistura de lipídeos polares e não polares. 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 e KUONEN, 2004; SLATTER, 2005; COLITZ, 2008). É secretada pelas glândulas de meibomianas (glândulas tarsais), de Zies e Moll, fornecendo cobertura oleosa para a camada lacrimal aquosa assim retardando a evaporação e promovendo a distribuição estável das lágrimas sobre a córnea, aumentando a tensão superficial (ALVES, 2010; SWAMYNATHAN, 2013).

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 e KUONEN, 2004; COLITZ, 2008). A diminuição da tensão superficial promove uma maior solubilidade em água, reduz a espessura do filme lacrimal e faz com que os lipídeos permaneçam dispersos mesmo após o ato de piscar. A ausência da camada promove evaporação da porção aquosa da lágrima, o que resulta em diminuição do tempo de ruptura do filme lacrimal, condição de extrema importância na patogênese da síndrome do olho seco em todas as espécies (DAVISSON e KUONEM, 2004).

A fase aquosa representa 60% do filme lacrimal e é ligeiramente alcalina (COLITZ,

2008). É secretada pela glândula lacrimal principal (61%), pela glândula lacrimal da terceira pálpebra (35%) e pelas glândulas acessórias de Kraus e Wolfring (3%) (CABRAL et al., 2005). O componente em maior quantidade é a água (95%), possui também em sua composição materiais sólidos como minerais, proteínas, glicose e células sanguíneas. Estudos identificaram 491 proteínas na lágrima, que incluem lisozima, lactoferrina, imunoglobulinas secretora A, albumina entre outras, e glicoproteínas representadas pelas imunoglobulinas sintetizadas pelas células do plasma com atividade de anticorpo, como a imunoglobulina A secretada (sIgA), Imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina D (IgD), sendo a IgA principal imunoglobulina da lágrima (DE SOUZA et al., 2006).

A fase aquosa possui propriedades antibacterianas por conter células inflamatórias, anticorpos e enzimas, tais como lactoferrina e lisozima, além de remover os metabólitos da córnea e debrís celulares (SLATTER, 2005). Promove ainda a lubrificação dos epitélios conjuntival e corneano, fornece nutrientes e fatores de crescimento para os mesmos. Em conjunto com as demais camadas do filme lacrimal, propicia uma superfície corneana lisa e opticamente eficiente (PICCIONE, 2009).

A camada interna, que é mucosa, é produzida pelas células caliciformes da conjuntiva. No cão, as células caliciformes são encontradas em maior densidade no fórnix conjuntival e é a principal fonte de mucina (GIULIANO; MOORE, 2007). Além de mucina essa camada é composta por imunoglobulinas, ureia, sais, glicose, leucócitos, debrís celulares e enzimas (DAVIDSON e KUONEN, 2004). Sua função é proteger e lubrificar a superfície ocular para prevenir seu ressecamento e sua contaminação por bactérias, ela preenche qualquer irregularidade da superfície corneal e desse modo fornece uma superfície ocular lisa. Bactérias e partículas estranhas são aprisionadas pelas mucoproteínas, ajudando na proteção da córnea (DARTT, 2004; GELATT, 2003;). A camada mucosa também fornece proteção mecânica, evitando possíveis danos à superfície corneana por fricção das pálpebras no ato de piscar (DAVIDSON e KUONEN, 2004).

Moore (1999) refere que a deficiência na produção de mucina compromete sua função protetora e lubrificante da superfície ocular, e interfere na quebra rápida do filme lacrimal sobre a córnea. Ocorre perda na estabilidade do filme lacrimal e conseqüente ressecamento corneano, 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 e STOREY, 2004).

Anormalidades em quantidade ou qualidade de qualquer uma das camadas do filme lacrimal pré-ocular podem comprometer sua dinâmica e suas funções primordiais (MOORE, 1999). Hipertonicidade, desidratação e hipóxia do epitélio e estroma são os eventos fisiopatológicos associados à deficiência de lágrima. A lubrificação inadequada resulta em irritação ocular decorrente da fricção exercida pelas pálpebras, bem como o acúmulo de metabólitos tissulares potencialmente tóxicos. Nestas condições, a colonização da superfície ocular por microrganismo acontece rapidamente, resultando em infecção (MOORE, 1999; DAVIDSON e KUOEN, 2004).

3.4 Receptores de hormônios sexuais no olho

Hormônios sexuais, ou seja, andrógenos, estrógenos e progestágenos, são hormônios esteroides, sintetizados e secretados para a circulação sanguínea, principalmente, pelas gônadas (ovários ou testículos) e nas glândulas adrenais, os quais exercem influência na produção e estabilidade do filme lacrimal (TRUONG, 2014). A presença de receptores nas glândulas lacrimais e meibomianas, tanto em humanos, quanto em animais sugere que esses tecidos estão predispostos a influência dos hormônios sexuais (AZZAROLO et al., 1999). Os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, também exercem profundo impacto sobre a estrutura e a função da glândula lacrimal (SULLIVAN et al., 2002). A hipofisectomia ou a ablação da hipófise anterior induz atrofia da glândula lacrimal (AZZAROLO et al., 1995). Estudos realizados por Sullivan et al. (2000), demonstram que a glândula Meibomiana é um órgão alvo de andrógeno, tendo a sua secreção de conteúdo lipídico influenciada por estes hormônios.

O andrógeno estimula a expressão de genes associados com a ativação de vias de síntese, metabolismo, transporte e secreção dos lipídios (SCHIRRA et al., 2006), na arquitetura glandular e dinâmica das células epiteliais (AZAROLLO et al. 2004) e na atividade imunológica (MANTELLI et al., 2007).

Estudo com ratos, coelhos e seres humanos identificou a presença de receptores de andrógeno em núcleos acinares de células epiteliais da glândula Meibomiana, reconhecendo que os andrógenos regulam a função destas, melhorando a qualidade e/ou quantidade de lipídios produzidos por este tecido, o que contribuiria para a formação da camada lipídica do

filme lacrimal. A deficiência de andrógenos seria então um fator etiológico fundamental na patogênese da disfunção das glândulas meibomianas e olho seco evaporativo. (KRENZER et al., 2000; ROCHA et al. 2000; SULLIVAN et al., 2000).

As glândulas lacrimais também sofrem ação dos andrógenos, uma vez que estudos mostraram que estas rapidamente regrediram em ratas e coelhas quando hipofisectomizadas (AZAROLLO et al., 1995) e ovariectomizadas (AZAROLLO et al., 1999), respectivamente. A ovariectomia levou a atrofia funcional e bioquímica da glândula lacrimal em coelhos. Além disso, diminuiu os níveis de testosterona e androstenediona em 88,5% e 35,9%, respectivamente (AZAROLLO et al., 1999). Sugere-se que a função secretora da glândula lacrimal depende dos níveis de andrógenos circulantes e que o declínio dos níveis de androgênio abaixo do valor mínimo necessário para suportar a função normal provocaria regressão glandular (AZAROLLO et al., 1997; AZAROLLO et al., 1999).

Luo et al. (2001) em estudo realizado com coelhos demonstraram que a castração provoca atrofia das células epiteliais da glândula lacrimal, a regressão das vesículas de muco das células acinares e diminuição significativa no número de células caliciformes da conjuntiva. Tudo isso leva à diminuição na quantidade e qualidade do filme lacrimal, observadas nos teste lacrimal de Schirmer e no teste de ruptura do filme lacrimal, respectivamente.

O efeito do estrógeno na glândula lacrimal ainda é controverso. Um estudo realizado por Wickham et al., (1998), demonstrou expressão de receptores de estrógeno na glândula lacrimal de ratos, coelhos e seres humanos.

Azarollo et al., (2003) demonstraram em seu estudo que a ovariectomia teria efeito na morte das células glandulares e na infiltração linfocítica, sugerindo assim, que a integridade da glândula lacrimal e a prevenção da resposta inflamatória dependem também de níveis circulantes de estrógenos. Estes poderiam estar atuando de forma independente nos dois tipos de células das glândulas lacrimais, células acinares e intersticiais. Uma vez que a expressão de receptores de estrógenos não foi definitivamente encontrada nas células acinares, é possível que ação do estrógeno possa direta sobre as células intersticiais, as quais lançariam um fator necessário para manutenção da estrutura e função das células acinares.

A influência do estrogênio na glândula meibomiana está associada ao antagonismo da ação do andrógeno, com efeitos resultantes na supressão da síntese e promoção de disfunção da glândula meibomiana e olho seco, por levar a uma instabilidade da lágrima e consequente

evaporação por falha na porção lipídica (SULLIVAN et al., 2009). Estes efeitos antagonistas do estrógeno podem ajudar a explicar a exacerbação dos sinais e sintomas de olho seco em mulheres pós-menopáusicas usando terapia de reposição hormonal, no entanto, a influência direta de estrogênio e progesterona na glândula meibomiana está clara (TRUONG, 2014).

Mostafa et al. (2012), refere que os efeitos da diminuição dos níveis de hormônios sexuais sob as glândulas lacrimais podem estar associado a uma predisposição genética, uma vez que em seu estudo com camundongos ovariectomizadas, foi demonstrado que houve um aumento significativo no número de células T CD4 e células B B220, após três a sete dias, enquanto não foi observada alteração de células T CD8, nem alterações de degradação do DNA. O que sugere que a ausência de alterações de células T CD8, seria relacionada a não predisposição a desenvolver doença autoimune, logo, a diminuição dos hormônios sexuais causaria apenas um pequeno e transitório aumento do número de células T CD4 insuficiente para ativar as células CD8, sugerindo que outros fatores além da diminuição hormonal seriam necessários para do desenvolvimento doenças autoimunes, como a Síndrome de Sörjen (SS), em mulheres pós-menopáusicas.

Outros componentes que podem estar relacionados com as alterações nas glândulas lacrimais seriam as metaloproteinases de matriz (MMPs). Estas são enzimas proteolíticas que participam fisiologicamente na angiogênese, inflamação, arteriosclerose, invasão maligna, metástase tumoral, e reparação de feridas (SONG et al., 2014). Estudos demonstraram que MMP estão relativamente aumentados nas lágrimas e na saliva de pacientes com SS (KONTTINEN et al., 1998; SUZUKI et al., 2005). Dentre os fatores que regulam a expressão de MMPs estariam os hormônios sexuais, o que foi confirmada em estudo em fêmeas ovariectomizadas, onde houve o aumento da expressão de MMP-2 na glândula lacrimal (SONG et al., 2014).

O mecanismo pelo qual a diminuição dos níveis de hormônios sexuais pode desencadear infiltração linfocítica na glândula lacrimal é ainda desconhecido, porém estudos demonstraram que as células epiteliais, células T CD4 e células T reguladores estão relacionadas com a liberação de imunomediadores que suprimem a proliferação de células do sistema imunológico desempenhando assim papel na imunoregulação da glândula (DE SAINT et al., 2009; MOSTAFA et al, 2009).

3.5 Ceratoconjuntivite seca

3.5.1 Fisiopatogenia

A Ceratoconjuntivite (CCS) seca é uma enfermidade ocular frequente em cães, reconhecida como síndrome do olho seco. Caracteriza-se por uma deficiência na formação do componente aquoso da lágrima, o que produz uma desidratação e inflamação tanto da conjuntiva como da córnea. Também produz dor ocular, enfermidade corneal progressiva e redução da visão. A incidência de CCS em cães é de aproximadamente 1% e acomete com maior frequência as raças Shihtzu, Lhasa Apso, Pequinês, Buldogue Inglês, Yorkshire Terrier, Pug, Cocker Spaniel Americano, West Highland White Terrier e Schnauzer miniatura (GELATT, 2003).

A etiologia da CCS é complexa, mas está relacionada principalmente com inflamação, apoptose celular e desequilíbrio de hormônios sexuais. Tem sido reconhecido que os hormônios sexuais podem ter impacto na incidência e curso da síndrome do olho seco, podendo os níveis de estrógeno (SONG et al., 2014) e de andrógeno (OPERA et al., 2004) estarem associados com o desenvolvimento e progressão de olho seco.

A CCS pode ocorrer por meio de três mecanismos principais, são eles: diminuição da quantidade de lágrima, modificação da qualidade e/ou diminuição da estabilidade da lágrima (MALKI, 2012). Fonseca et al. (2010), divide em duas fases o desenvolvimento dessa síndrome do olho seco. Na primeira fase um ou mais estímulos ambientais iniciam, em indivíduos susceptíveis, a agressão aos tecidos envolvidos. Na segunda, os desdobramentos, sejam neuropáticos, metabólicos e/ou inflamatórios levam à instabilidade do filme lacrimal, à diminuição da secreção lacrimal, aumento da evaporação ou alteração da composição da lágrima. Estas ações na superfície ocular estariam envolvidas na perpetuação desse processo.

Os pacientes com olho seco possuem a osmolaridade do filme lacrimal maior do que em pacientes normais. Esse aumento na osmolaridade causa mudanças morfológicas e bioquímicas no epitélio da córnea e da conjuntiva (doença da superfície ocular), especialmente perda das células caliciformes. A hiperosmolaridade causa danos ao epitélio da superfície corneana por aumentar a osmolaridade das células epiteliais e pela ativação de eventos da cascata inflamatória na superfície ocular, com liberação de fatores inflamatórios (citocinas) na lágrima (DEWS, 2007).

O dano epitelial, causado pela liberação de fatores inflamatórios devido à hiperosmolaridade lacrimal, estimula as terminações nervosas da córnea, levando a sintomas de desconforto ocular, aumento do ato de piscar e secreção lacrimal reflexa compensatória. A secreção reflexa é encarada como um mecanismo compensatório inicial, mas com o tempo, a inflamação que acompanha a disfunção secretória crônica e a diminuição na sensação corneana, comprometem a resposta reflexa, tendo como consequência maior a instabilidade do filme lacrimal. Esse aumento da secreção lacrimal reflexa tem sido sugerido como a base da inflamação neurogênica no interior da glândula lacrimal. Esta inflamação causa tanto destruição tecidual como um bloqueio neurosecretório que pode ser potencialmente reversível (DEWS, 2007).

A inflamação da superfície ocular pode ser a causa ou a consequência do olho seco, uma vez que a disfunção das glândulas lacrimais leva a uma alteração na composição da lágrima, resultando num estado de hiperosmolaridade estimulando a produção de mediadores inflamatórios, que por sua vez levam à disfunção das glândulas secretórias (FONSECA et al., 2010).

O processo inflamatório pode também ser desencadeado por doenças sistêmicas autoimunes ou ainda pelo estresse oxidativo, com a liberação de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio que podem levar a apoptose e necrose celular. Além ainda de variações fisiológicas que se desenvolvem com o envelhecimento que incluem diminuição de volume e fluxo lacrimal, aumento da osmolaridade, perda da estabilidade do filme lacrimal e alterações na composição lipídica das glândulas de Meibômio (WAKAMATSU et al., 2008; FONSECA et al., 2010).

Há então um ciclo vicioso inflamatório na superfície ocular, levando à gradual disfunção das células responsáveis pela secreção ou retenção da lágrima, independente do fator desencadeador da inflamação (FONSECA et al., 2010).

No cão, a ceratoconjuntivite seca possui diversas etiologias, porém, acredita-se que a causa imunomediada seja a mais comum. Outras etiologias incluem, por exemplo, o vírus da cinomose canina, causas iatrogênicas, radioterapia local para neoplasias na cabeça, trauma orbital ou supra-orbital, problemas neurológicos, neoplasias, doenças metabólicas sistêmicas e alacrimia congênita ou hipoplasia congênita de acinos lacrimais, protrusão da glândula da terceira pálpebra, lesões traumáticas, uso de drogas como as sulfonamidas, remoção da glândula da terceira pálpebra, lesão de nervo facial, doenças metabólicas como

hipotireoidismo e hiperadrenocorticismo, radioterapia, entre outras (KOCH e SYKES, 2002; GELATT, 2003; SLATTER, 2005; PIGATTO et al., 2007).

3.5.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca variam dependendo do tempo decorrido do surgimento da afecção e da extensão do ressecamento corneano e também se a condição é uni ou bilateral, aguda ou crônica e temporária ou permanente. Podendo estar presente desconforto ocular, fotofobia, blefarospasmo, secreção ocular mucopurulenta, hiperemia conjuntival crônica, vascularização na córnea, úlceras corneanas e ceratite pigmentar. Em algumas ocasiões podem aparecer uma forma muito aguda e grave de CCS. Nestes casos os olhos sofrem um processo doloroso agudo associado com uma ulceração corneal axial (GELATT, 2003). A inflamação supurativa pode resultar em doença corneana progressiva (GIULIANO; MOORE, 2007), ocasionando ulcerações superficiais, profundas e até a perfuração da córnea afetando o epitélio corneano (LAUS e ORIÁ, 1999).

A característica mais comum da CCS é a presença de secreção mucosa que faz com que os olhos aparentem uma conjuntivite bacteriana primária ou irritante, que é a causa de subdiagnóstico (HERRERA, 2008). A camada aquosa do filme lacrimal, geralmente está severamente diminuída ou ausente, o que leva ao acúmulo de muco que normalmente o muco acumulado é parte integrante do filme lacrimal que não é drenado pelo sistema lacrimal. Este muco, por sua vez, difere do encontrado na conjuntivite, é mais espesso e de coloração amarronzada. Com o agravamento da CCS, há comprometimento corneano e da conjuntiva, observa-se, então, secreção ocular mucopurulenta (SLATTER, 2005; PIGATTO et al., 2007). Nos estágios mais avançados ocorre maior ressecamento da superfície ocular, neovascularização e pigmentação da córnea, e, muitas vezes resultam em perda da visão (PIGATTO et al., 2007).

3.5.3 Diagnóstico

Uma combinação de informações da anamnese e do exame oftalmológico define o diagnóstico da CCS, que quanto mais precoce for estabelecido evita as complicações da CCS. Para isso é necessário conhecer a história clínica completa do paciente, desde doenças

sistêmicas, ao uso de medicamentos e até mesmo possíveis cirurgias oculares que tenham envolvido a glândula da terceira pálpebra (KOCH E SYKES, 2005; ALMEIDA, et al., 2004). As anormalidades do filme lacrimal em cães podem ser classificadas quanto ao seu aspecto quantitativo, qualitativo ou ambos, e assim também é realizado o diagnóstico da CCS. Fundamentado basicamente nos sinais clínicos típicos, e nos testes que avaliam quantitativamente e qualitativamente o filme lacrimal, representados pelo teste de Schirmer (TLS) e os testes de coloração com corantes vitais, respectivamente (SAITO e KOTANI, 2001).

O teste com corantes vitais avalia a gravidade do olho seco corando células da superfície ocular desvitalizadas. O rosa bengala é um corante largamente empregado na clínica diária e em pesquisas oftalmológicas para evidenciar lesão da superfície ocular (PFLUGFELDER, 1998). O padrão da coloração pela rosa Bengala 1%, que se liga às células epiteliais normais e proteínas do filme lacrimal, mas cora os pontos onde o filme lacrimal está comprometido, pode ser extremamente útil para se estabelecer diagnóstico (QUEIROGA e DINIZ, 2008). Assim, foi incorporado aos padrões internacionais de diagnóstico do olho seco e a positividade de coloração da zona exposta interpalpebral pelo corante passou a ser considerada um critério global para o diagnóstico dessa entidade clínica (BRON, 2001).

O tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) é um teste diagnóstico não invasivo que auxilia no diagnóstico presuntivo de anormalidade qualitativa do filme lacrimal por meio da mensuração indireta dos componentes lipídicos, auxiliando na observação da estabilidade do filme lacrimal (CULLEN, 2005). Após a instilação de uma gota de fluoresceína sódica a 1%, o paciente pestaneja inúmeras vezes e posteriormente examina-se o filme lacrimal utilizando lâmpada de fenda com filtro azul de cobalto. O tempo entre o último pestanejar e o aparecimento do(s) primeiro(s) pontos secos é o TRFL. O tempo normal de quebra do filme lacrimal em cães é de aproximadamente 20 segundos ou mais (SAITO e KOTANI, 2001). Os valores menores que 20 segundos são indicativos de CCS, quando associados com sinais clínicos, estando esse diretamente relacionado com a qualidade do filme lacrimal (BARABINO et al., 2004). De acordo com Herrera (2008), um filme lacrimal de qualidade não deve formar um pontilhado visível de fluoresceína num tempo inferior a 15 segundos.

O teste lacrimal de Schirmer é o mais utilizado para o diagnóstico de olho seco, 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. O teste dura um minuto e os resultados são apresentados em milímetros por minuto. A lágrima é absorvida pelo papel graduado, saturando-o. 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). São reconhecidos dois TLS, o teste de Schirmer I, que não inclui o uso de anestésico tópico, mensura o lacrimejamento basal e reflexo, já o teste lacrimal de Schirmer II, que inclui o uso de colírio anestésico, avalia o lacrimejamento reflexo (GELATT, 2003). Segundo Barabino et al. (2004), o valor médio normal para o TLS em cães é de 20mm min⁻¹, valores entre 10 e 15mm min⁻¹ indicam uma suspeita de CCS e animais que apresentam valores inferiores a 10mm min⁻¹ pode ser considerada CCS

3.5.4 Tratamento

O tratamento da CCS pode ser clínico e/ou cirúrgico, segundo Grahn e Storey (2004). O tratamento tópico é o mais apropriado para o controle da ceratoconjuntivite seca devendo ser adaptado a cada paciente. Os objetivos do tratamento clínico incluem o estabelecimento da umidade dos tecidos oculares ressecados e o tratamento dos transtornos secundários como conjuntivite bacteriana, ceratite ulcerativa e ceratite (PIGATTO et al., 2009; ANGELICO et al., 2011).

A base do tratamento medicamentoso inclui principalmente lacrimogênicos, lacrimomiméticos, mucolíticos e antibacterianos tópicos. A estimulação da produção natural de lágrimas parece causar uma grande melhora dos sinais clínicos evitando a progressão da doença e a perda da visão (BERDOULAY et al., 2005). A utilização da Ciclosporina A tópica tem sido comumente utilizada como tratamento de eleição para estimular a produção lacrimal em cães. (PIGATTO et al., 2009)

Estudos demonstraram que a Ciclosporina A exerce efeitos terapêuticos por meio da inibição e proliferação de linfócitos-T helper nos ácinos da glândula lacrimal, permitindo a regeneração da glândula e o regresso da função secretória (BERDOULAY et al., 2005; OFRI, 2008). A ação antiinflamatória da Ciclosporina A exerce efeitos estimulatórios sobre as

glândulas lacrimais, inibitório sobre a apoptose das células lacrimais, além do efeito multiplicador das células caliciformes (BERDOULAY et al., 2005).

Estudos com novas drogas têm demonstrado bons resultados na terapêutica do olho seco, novas drogas imunossupressoras como pimecrolimus e tacrolimus podem ser alternativas no tratamento de pacientes com ceratoconjuntivite seca, que não respondem a ciclosporina A tópica (LAUS et al., 2008). Tais drogas mostraram-se mais efetivas que a ciclosporina na inibição da produção de citocinas pelos linfócitos T, sendo altamente efetivo no alívio dos sinais clínicos da ceratoconjuntivite seca em cães que apresentam inflamação da superfície ocular (NELL et al. 2005; OFRI et al. 2007) .

Os casos que não respondem a terapia medicamentosa devem ser avaliados antes de serem submetidos a tratamento cirúrgico. Os tratamentos cirúrgicos existentes para cães incluem a transposição do ducto parotídeo da cavidade oral ao saco conjuntival inferior (PIGATTO et al., 2009), o transplante de glândulas salivares para o fórnice conjuntival que substituem a lágrima pela secreção salivar (SOARES E FRANÇA, 2005) e a tarsorrafia parcial permanente que reduzem a área exposta da superfície ocular e, conseqüentemente, diminuem a evaporação da lágrima (GOMES, 2000) .

Tratamentos complementares tem sido utilizado no tratamento da CCS, como o uso de ácidos graxos essenciais (AGE), ômega 3 (ω -3) e ômega 6 (ω -6), principalmente no tratamento de pacientes portadores de diversas formas de deficiência lacrimal, como na Síndrome de Sjögren humana e na suplementação oral (RONCONE et al., 2010; WOJTOWICZ et al., 2011). Os principais efeitos terapêuticos do ω -3 e ω -6 são imunomodulador e anti-inflamatório (HASSANZADEH et al., 2008).

4. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. E. et al. Iatrogenic keratoconjunctivitis sicca in a dog. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.921-924, 2004.
- ALVES, J. S. **Olho seco: uma abordagem didática**. Rio de Janeiro: E-papers, 2010, p. 120.
- ANDRADE, A. L. Semiologia do sistema visual dos animais domésticos. In: _____Feitosa F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico de cães, gatos, equinos, ruminantes e silvestres**, São Paulo: Roca, 2004, p. 345-380.
- AZZAROLO, A. M.; BJERRUM, K.; MAVES, C. A.; BECKER, L.; WOOD, R. L.; MIRCHEFF, A. K.; WARREN, D. W. Hypophysectomy-induced regression of female rat lacrimal glands: partial restoration and maintenance by dihydrotestosterone and prolactin. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St Louis, v. 36, n. 1, p. 216-226, 1995.
- AZZAROLO, A. M.; STANCZYK, F. Z.; GENTSCHIN, E.; BECKER, L.; NASSIR, B.; WARREN, D. W. Androgen support of lacrimal gland function. **Endocrine**, New York, v. 6, n. 1, p. 39-45, 1997.
- AZZAROLO, A. M.; WOOD R. L.; MIRCHEFF A. K.; RICHTERS A.; OLSEN E.; BERKOWITZ M.; BACHMANN, M.; HUANG Z. M.; ZOLFAGARI, R.; WARREN D. W. Androgen influence on lacrimal gland apoptosis necrosis, and lymphocytic infiltration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St Louis, v. 40, n. 3, p. 592-602, 1999.
- 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**, Cleveland, v. 79, n. 5, p. 613-621, 2004.
- BARNETT, K. C. Keratoconjunctivitis sicca: sex incidence. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 531-534, 1988.
- BERDOULAY, A.; ENGLISH, R. V.; NADELSTEIN, B. Effect of Topical 0.02% Tacrolimus Aqueous Suspension on Tear Production in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. **Veterinary Ophthalmology**, vol.8, n. 4, pag.225-232, 2005
- BERGER, S. L.; KING, V. L. The fluctuation of tear production in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 79-83, 1998.
- CABRAL, V. P. et al. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands macroscopic and morphometric characteristics. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 391-397, 2005.
- CARNEIRO, L. F. **Oftalmologia veterinária: clínica e cirurgia**. São Paulo: Roca, 2004, p. 248.
- COLITZ, C. M. H. Doenças do sistema lacrimal. In: BIRCHARD, S.J., SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 3ª ed. São Paulo: Roca, cap. 139, p. 1416-1421, 2008.

- COUSINS, S. W. MARIN-CASTAÑO, M. E.; ESPINOSA-HEIDMANN D. G.; ALEXANDRIDOU A.; STRIKER L.; ELLIOT, S. Female Gender, Estrogen Loss, and Sub-RPE Deposit Formation in Aged Mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St Louis, v. 44, n. 3, p. 1221-1229, 2003.
- CRISPIN, S. The lacrimal system. In: PETERSEN-JONES, S.; CRISPIN, S. (Eds.) **BSAVA manual of small animal ophthalmology**. 2ª. ed. England: BSAVA, cap. 6, p. 105-123, 2002.
- CRUZ, A. A. V.; CHAHUD, F.; GUIMARÃES, F. C. Patologia dos anexos oculares, In: **Simpósio de oftalmologia para o clínico**, Ribeirão Preto-SP, v. 30, p. 36-51, 1997.
- CULLEN, C.L.; LIM, C. SYKES, J. Tear film breakup times in young healthy cats before and after anesthesia. **Veterinary Ophthalmology**. n. 8, v.3, p.159-165, 2005.
- CUNHA, O. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. Palotina: UFPR, 2008, p. 88.
- DAVIDSON, H. J.; KUONEN, V. J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, Blackwell Publishing LTD, v. 7, n.2, p. 71-77, 2004.
- DE SOUZA, G. A.; GODOY, L. M.; MANN, M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. **Genome biology**, v. 7, n. 8, p. 72, 2006.
- DEWS – International Dry Eye WorkShop – Report. **The Ocular Surface**, v. 5, n. 2, p. 142, Abr. 2007.
- DÍAZ GONZÁLEZ, F. H. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2002, p. 145.
- DIESEM, C. Órgãos dos sentidos do carnívoro e tegumento comum. In: ___GETTY, R. Sisson/Grossman. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 813.
- EVANS, H. E.; De LAHUNTA, A. **Miller's Anatomy of the Dog**. 4ª ed. Toronto: WB Saunders, 1993, p. 872.
- FONSECA, E. C.; ARRUDA, G. V.; ROCHA, E. M. Olho seco: etiopatogenia e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.
- FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 472.
- GAO, J.; SCHWALB, T. A.; ADDEO, J. V.; GHOSN, C. R.; STERN, M. E. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy. **Cornea**, v. 6, n. 17, p. 654-663, Nov. 1998.
- GELATT, K. N., Doenças e cirurgia dos Sistemas Lacrimal e Nasolacrimal do Cão. In: **Manual de Oftalmologia Veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

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

GOMES, J.A.P. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites superficiais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63, n.1, 2000.

GUILLON, M.; MAISSA, C. Tear film evaporation – Effect of age and gender. **Contact Lens & Anterior Eye**, v. 33, p. 171-175, 2010.

GUSSONI, F. R. A., BARROS, P. S. M. Epífora no cão: mensuração do pH da lágrima. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, n. 40, p. 87-94, 2003.

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

HASSAN-ZADEH, A.; SAHARI, M.A.; BARZEGAR, M. Optimization of the -3 extraction as a functional food from flaxseed. **Int. J. Food Sci. Nutrit.** v.59, p.526-534, 2008.

KING-SMITH, P. E.; FINK, B. A.; FOGT, N. The thickness of the human pré-corneal tear film: evidence from reflection spectra. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 41, p. 3348-3359, 2000.

KLEIN, B. E.; KLEIN, R.; JENSEN, S.C.; RITTER, L. L.; Are sex hormones associated with age-related maculopathy in women? The Beaver Dam Eye Study. **Transactions of the America ophthalmological Society.**, v. 92, p. 289-297, 1994.

KLEINER, J. A. **Tratamento cirúrgico da epífora crônica em animais de companhia**. 2003. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, 2003.

KLEINER, J.A. Tratamento cirúrgico da epífora crônica em animais de companhia. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 23, Ed. 128, Art. 867, 2010.

KOBAYASHI, K. Estrogen Receptor Expression. In: **Bovine and Rat Retinas. Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 11, 1998.

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

KONTTINEN, Y. T.; HALINEN, S.; HANEMAAIJER, R. MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. **Matrix Biology**, v. 17, p. 335-347, 1998.

KRENZER, K. L. Effect of Androgen Deficiency on the Human Meibomian Gland and Ocular Surface. **Jounal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 85, p. 4874-4882, 2000.

LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Doenças Corneanas em Pequenos Animais. **Revista de Educação continuada do CRMV-SP**. São Paulo, v. 2, n. 1, p. 26-33, 1999.

- LAVACH, J. D. Sistema lacrimal. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**, 2ª ed. São Paulo: Manole, v. 2, cap. 84, p. 1414-1427, 1998.
- LIEBICH, H.G.; KÖNIG, H.E. Órgão da Visão (Organum visus). In:_____. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido**. Artmed Editora S.A., 2004. 397p
- LUO, F.; ZHANG, H.; SUN, X. The change of tear secretion and tear film stability in castrated male rabbits. **Chung Hua Yen Ko Tsa Chih**, v. 37, p. 458-61, 2001.
- MANTELLI, F.; MORETTI, C.; MICERA, A.; BONINI, S. conjuntival deficiência de mucina na síndrome de completa insensibilidade andrógeno (CAIS). *Graefes Archives Clinical Experimental Ophthalmology*. v. 245.p. 899-902, 2007.
- MCKENZIC, R. W.; JUMBLATT, J. E.; JUMBLATT, M. M. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 41, p. 703-708, 2000.
- MOORE, C. P.; WILSMAN, N. J.; NORDHEIM, E. V.; MAJORS, L. J.; COLLIER, L. L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. **Investigative ophthalmology and visual science**, St. Louis, v. 28, p. 1925-1932, 1987.
- OFRI, R. Examination of the Blind Animal. World Congress Proceedings.31st **World Small Animal Association**,Prague,Czech Republic,2006.
- OGUETA, S. B. Estrogen Receptor in the Human Eye: Influence of Gender and Age on Gene Expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 9, 1999.
- OLIVEIRA, E. C. S.; MARQUES Jr., A. P.; NEVES, M. M. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.
- OLIVEIRA, E. C. S.; MARQUES Jr., A. P. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Pampulha, v. 30, n. 1/2, p. 11-18, 2006.
- OPREA, L.; TIBERGHIEU, A.; CREUZOT-GARCHER, C.; BAUDOUIN, C. Influence des hormones sur le film lacrymal. **Journal Français. d'Ophthalmologie**, v. 27, n. 8, p. 933-941, Out. 2004.
- 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.
- 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.
- PIGATTO, J. A. T.; PEREIRA, F. Q.; ALMEIDA, A. C. V. R.; REDAELI, R.; FAGANELLO, C. S.; FRANZEN, A. Ceratoconjuntivite seca em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 250-251, 2007.

- PRYDAL, J. L.; CAMPBELL, F. W. Study of precorneal tear thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 33, p. 1996-2005, 1992.
- RIBEIRO, A. P. et al. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 568-575, 2008.
- RIIS, R. C. **Segredos em Oftalmologia de Pequenos Animais**. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 400.
- ROCHA, E. M.; WICKHAM, L. A.; SILVEIRA, L. A.; KRENZER, K. L.; YU, F. S.; TODA, I.; SULLIVAN, B. D.; SULLIVAN, D. A. Identification of androgen receptor protein and 5 α -reductase mRNA in human ocular tissues. **Brasilian Journal Ophthalmol**, v. 84, p.76-84, 2000.
- RONCONE, M.; BARTLETT, H.; EPERJESI, F. Essential fatty acids for dry eye: A review. **Contact Lens & Anterior Eye**, v.33, p.49-54, 2010.
- SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Version of Record Veterinary Ophthalmology**. v. 4, n. 1, p. 7-11, 2001.
- SANSON, J.; BARNETT, K. C. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, n. 26, p. 121-131, 1985.
- SCHIRRA, F.; RICHARDS, S.M.; LIU, M.; SUZUKI, T.; YAMAGAMI, H.; SULLIVAN, D.A. Androgen regulation of lipogenic pathways in the mouse meibomian gland. **Exp Eye Res**, v. 83, p. 291-296, 2006.
- SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3^a ed. São Paulo: Manole, 2007, p. 1369-1522.
- SLATTER, D. Sistema Lacrimal. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3^a ed. São Paulo: Manole, 2005.
- SMITH, R. E. Tear film complex: pathogenesis and emerging therapies. **Cornea**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2005.
- SOARES, E.J.C; FRANÇA, V.P. Transplante de glândulas salivares labiais no tratamento do olho seco grave. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 68, n.4, p.481, 2005.
- STEHLLING, A. C. **Obstrução do canal nasolacrimal em cão (*Canis familiaris*)**. **Relato de caso**. 2009. p. 45. Monografia (Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos). UCB. Rio de Janeiro, 2009.
- STONE, A. E.; Ovário e útero. In: SLATTER. D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3^a ed. São Paulo: Manole, v. 2, p. 1487-1502, 2007.
- SULLIVAN, D.A. et al. Androgen Influence on the Meibomian Gland. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 12, 2000.

SULLIVAN, D. A. et al. Androgen Deficiency, Meibomian Gland Dysfunction, and Evaporative Dry Eye. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 966, p. 211-222, 2002.

SULLIVAN, D. A.; JENSEN, R. V.; SUZUKI, T.; RICHARDS, S. M. Do sex steroids exert sex-specific and/or opposite effects on gene expression in lacrimal and meibomian glands? **Molecular Vision**, v. 15, p. 1553-1572, 2009.

SUZUKI, T.; SULLIVAN, D. A. Estrogen stimulation of proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase gene expression in human corneal epithelial cells. **Cornea**. v. 24, p. 1004-1009, 2005.

SWAMYNATHAN, S. K. Ocular Surface Development and Gene Expression. **Journal of Ophthalmology**, v. 2013, p. 1-22, 2013.

TRUONG, S.; COLE, N.; STAPLETON, F.; GOLEBIEWSKI, B. Sex hormones and the dry eye. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 97, p. 324-336, 2014.

WAKAMATSU, T. H; DOGRU, M; TSUBOTA, K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases, **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 6, p. 72-79, 2008.

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

WOJTOWICZ, J.C.; BUTOVICH, I.; UCHIYAMA, E. et al. Pilot, prospective, randomized, doublemasked, placebo-controlled clinical trial of an omega- 3 supplement for dry eye. **Cornea**, v.30, p.308-314, 2011.

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

ARTIGO 1

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”

Influencia da Ovariosalpingohisterectomia na produção lacrimal de cadelas¹
[Influences of ovariosalpingohisterectomy in tear production bitches]

Daniela S.P. Campinho^{2*}, Maria C.C.O. Coelho³, Flaviane M.F.M Silva⁴, Priscilla B. Araújo⁵, Fabrício B.Sá⁶

ABSTRACT: Campinho, D.S.P.; Coelho, M.C.C.O; Silva, F. M.F.M; Araújo, P.B.; Sá, F.B. 2016. **[Influences of ovariosalpingohisterectomy in tear production bitches]**. Influência da ovariosalpingohisterectomia na produção lacrimal de cadelas. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: danielacampinho@gmail.com

Studies suggest that the sex hormone deficiency can cause inflammation of the lacrimal gland, the aqueous tear deficiency dry eye. In animals, sterilization, excision of ovaries with a similar condition would, with decrease of serum levels of circulating sex hormones. It aimed to verify the influence of ovariosalpingohisterectomy on the production of sex hormones and the subsequent occurrence of dry eye in dogs. The subjects were divided into five groups according to the time castration. All patients were submitted to the cynical and ophthalmic examination, the quantitative and qualitative evaluation of tear production was performed by the tear test Schirmer (TLS) and tear film breakup time (TRFL), respectively. For hormonal determinations of estradiol and testosterone was used to electrochemiluminescence technique using a commercial kit (Kit Reagent Kit Reagent Access Testosterone and Estradiol Acess). It was observed that 59.9% of castrated animals showed a decrease in Schirmer tear test (TLS), and of these 39.5% had values below 10 mm, in relation to tear film rupture test (TRFL), 98 8% of individuals belonging to groups of castrated individuals showed a decrease of the same. When compared the efficiency of dry eye tests used for detection, it was observed that the TRFL was more efficient. There was a weak positive correlation between TLS and testosterone levels and also between TRFL and testosterone levels. On the other hand there was a strong positive correlation between the test and estradiol levels. We conclude that bitches submitted to ovariohysterectomy with compromised in tear production, being predisposed to a dry eye framework for qualitative and quantitative insufficiency of the tear film.

Index terms: dry keratoconjunctivitis, TRFL, TLS, castration.

Index terms: dry keratoconjunctivitis, TRFL, TLS, castration.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

^{2*}Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: danielacampinho@gmail.com

³ Professora Titular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴ Professora Adjunta do Colegiado de Medicina Veterinária da Universidade Federal Do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.

⁵ Clínica de Bovinos de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁶ Professor do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO – Estudos propõem que a deficiência de hormônios sexuais pode ocasionar a inflamação da glândula lacrimal, a deficiência de lágrima aquosa e olho seco. Em animais a esterilização, com a exérese dos ovários levaria a uma condição semelhante, com diminuição dos níveis séricos de hormônios sexuais circulantes. Com isso objetivou-se verificar a influência da ovariosalpingohisterectomia sobre a produção de hormônios sexuais e consequente ocorrência de olho seco em cadelas. Os indivíduos foram divididos em cinco grupos de acordo com o tempo de castração. Todas as pacientes foram submetidas ao exame clínico e oftálmico, a avaliação quantitativa e qualitativa da produção lacrimal foi realizada por meio do teste lacrimal de Schirmer (TLS) e do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), respectivamente. Para determinações hormonais de estradiol e testosterona foi empregada a técnica de eletroquimioluminescência utilizando-se kits comerciais (Kit Reagente Acess Testosterona e Kit Reagente

Acess Estradiol). Observou-se que 59,9% dos animais castrados apresentaram diminuição no teste lacrimal de Schirmer (TLS), e destes 39,5% apresentaram valores inferiores a 10 mm, em relação ao teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), 98,8% dos indivíduos pertencentes aos grupos de indivíduos castrados apresentaram diminuição do mesmo. Quando comparada a eficiência dos testes empregados para detecção de olho seco, observou-se que o TRFL mostrou-se mais eficiente. Houve uma correlação positiva fraca entre o TLS e os níveis de testosterona e também entre o TRFL e os níveis de testosterona. Por outro lado houve uma correlação positiva forte entre os testes e os níveis de estradiol. Conclui-se que cadelas submetidas à ovariectomia apresentam comprometimento na produção lacrimal, estando predispostas a um quadro de olho seco por insuficiência qualitativa e quantitativa do filme lacrimal.

Termos de indexação: Ceratoconjuntivite seca, TRFL, TLS, castração.

INTRODUÇÃO

O olho seco é a enfermidade ocular mais frequente em cães (Gelatt 2003), e se caracterizada pela alteração do filme lacrimal, com diminuição ou evaporação excessiva da lágrima, o que ocasiona lesões na superfície ocular, com sinais de desconforto (Babiae et al. 2011). A etiologia exata do olho seco é desconhecida, contudo acredita-se ser um evento complexo e multifatorial, que envolve três mecanismos principais: diminuição da quantidade de lágrima, modificação da qualidade e diminuição da estabilidade da lágrima (Ashar et al. 2011, Malki 2012).

O diagnóstico do olho seco baseia-se nos sinais clínicos típicos, nos resultados positivos dos testes de coloração com corantes vitais, teste de Schirmer (TLS) e no tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL). O teste com corantes vitais avalia a gravidade do olho seco corando células da superfície ocular desvitalizadas. O teste de Schirmer, por sua vez, promove a exploração quantitativa da produção da fase aquosa do filme lacrimal pré-corneano. Já o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) auxilia a observação da estabilidade do filme lacrimal pré-corneal: quanto mais rapidamente rompe-se o filme lacrimal, revela que a qualidade da lágrima está comprometida (Gelatt 2003).

Estudos têm demonstrado que qualidade e quantidade da lágrima pode ser influenciadas pela ação hormonal (Ashar et al. 2011, Mostafa et al. 2009, de Saint et al. 2009). Os hormônios sexuais desempenham importantes funções em diversos tecidos do corpo, atuando não somente na regulação da função sexual. De acordo com Sullivan et al. (2002) os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal exercem profundo impacto sobre a estrutura e função da glândula lacrimal.

Algumas condições como a senilidade e fatores idiopáticos podem reduzir a produção de hormônios sexuais, o que leva a mudanças na imunomeostase da conjuntiva podendo desencadear a inflamação local (Brewitt & Sistani 2001, Fridman et al. 2004). Estudos recentes relacionados ao olho seco indicam que as células epiteliais da conjuntiva secretam regularmente antígenos e proteínas celulares, e que pode haver uma condição inflamatória resultante de desequilíbrio dos hormônios sexuais (Ashar et al. 2011). O mecanismo pelo qual a diminuição dos níveis de hormônios sexuais pode desencadear infiltração linfocítica na glândula lacrimal é ainda desconhecido, porém estudos demonstraram que as células epiteliais, células T CD4 e células T reguladores estão relacionadas com a liberação de imunomediadores que suprimem a proliferação de células do sistema imunológico desempenhando assim papel na imunoregulação da glândula (Mostafa et al. 2009, de Saint et al. 2009).

Azarollo et al. (2003), demonstraram em seu estudo que a ovariectomia teria efeito na morte das células glandulares e na infiltração linfocítica e o que sugere que a integridade da glândula lacrimal e a prevenção da resposta inflamatória dependem também de níveis circulantes de estrógenos. Estes poderiam estar atuando de forma independente nos dois tipos de células das glândulas lacrimais, células acinares e intersticiais. Uma vez que a expressão de receptores de estrógenos não foi definitivamente encontrada nas células acinares, é possível que ação do estrógeno possa ser através de uma ação direta sobre as células intersticiais, que lançaria um fator necessário para manter a estrutura e função das células acinares.

Estudo com ratos, coelhos e seres humanos identificou a presença de receptores de andrógeno em núcleos acinares de células epiteliais da glândula Meibomiana, reconhecendo que os andrógenos regulam a função destas, melhorando a qualidade e/ou quantidade de lipídios produzidos por este tecido, o que contribuiria para a formação da camada lipídica do filme lacrimal. A deficiência de andrógenos seria então

um fator etiológico fundamental na patogênese da disfunção das glândulas meibomianas e olho seco evaporativo. (Rocha et al. 2000, Sullivan et al., 2000, Krenzer et al. 2000).

Considerando a alta frequência com a qual a ovariosalpingohisterectomia é realizada, especialmente com fins de controle populacional, e a escassez de pesquisas de sua correlação com a produção lacrimal, dentro da Medicina Veterinária, objetivou-se investigar a produção lacrimal em cadelas submetidas a este procedimento.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, sob a licença de número 050/2015.

As pacientes foram avaliadas por meio de exame clínico, hemograma, perfil renal (ureia e creatinina), perfil hepática (alanina-aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e albumina) e teste de glicemia. Os animais com quaisquer tipos de alterações sistêmicas ou com evidências de enfermidades extraoculares foram excluídos da pesquisa. A partir de então foram constituídos cinco grupos experimentais: Grupo controle – C0 (n= 24 olhos) cadelas não castradas com idade entre um e cinco anos; C1 (n=22 olhos) cadelas castradas há um ano; C2 (n= 26 olhos), cadelas castradas há dois anos; C3 (n= 20 olhos), cadelas castradas há três anos e C4 (n=20 olhos), cadelas castradas há mais de quatro anos.

Em seguida todas as pacientes foram submetidos ao exame oftálmico. O teste lacrimal de Schirmer foi realizado através da inserção da tira (Opthalmos®) na porção medial da pálpebra inferior durante um minuto, sem a utilização de anestésico local (TLS). Em seguida, observou-se a quantidade umedecida na tira e sua respectiva marcação à escala em milímetros estabelecida na tira.

Para verificar o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), foi aplicada fluoresceína sódica a 1% no fórnix inferior, aguardando-se o animal piscar por 1 a 2 vezes. Em seguida, as pálpebras eram mantidas abertas através das mãos do operador. Iluminavam-se os olhos utilizando-se lâmpada de fenda com filtro azul de cobalto, e, com o auxílio de um cronômetro, o tempo entre o último pestanejar e o aparecimento dos primeiros pontos secos foi considerado o tempo de quebra do filme lacrimal.

Para determinações hormonais de estradiol e testosterona foram coletadas amostras sanguíneas por venopunção jugular em tubos sem anticoagulante. Realizou-se centrifugação das amostras por um período de 15 minutos a 500 G. Em seguida, as alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos de polietileno, tipo Eppendorf e armazenadas à temperatura de -20 °C até momento da análise. Para mensuração dos valores séricos, foi empregada a técnica de eletroquimioluminescência utilizando-se kits comerciais (Kit Reagente Acess Testosterona e Kit Reagente Acess Estradiol).

Para a análise da normalidade das variáveis utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, as variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelos testes T de Student e Tule HSD. Para as variáveis não paramétricas, empregou-se os testes de Mann-Whitney U, Que-quadrado (X^2) e Exato de Fisher. Para a análise de correlação entre as variáveis utilizou-se o teste de Spearman, adotando-se a seguinte interpretação: 0,10 até 0,30 (fraco); $r = 0,40$ até 0,6 (moderado); $r = 0,70$ até 1 (forte) (Sampaio 1998). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O olho seco é uma enfermidade que sofre muitas influências relacionadas ao meio ambiente e fatores sistêmicos, como doenças ou uso de medicações tópicas e sistêmicas. Assim, doenças autoimunes, cinomose, dermatopatias, doenças metabólicas, alacrimia congênita, hipoplasia congênita de acinos lacrimais, protrusão da glândula da terceira pálpebra, lesões traumáticas, além dos fatores ambientais, como poluição, temperatura e umidade, podem se associar à síndrome do olho seco (Koch & Sykes 2002, Gelatt 2003, Schellini et al. 2004, Slatter 2005, Pigatto et al. 2007). No sentido de minimizar o efeito dessas influências nos grupos estudados, foram selecionados animais livres de doenças sistêmicas pregressas e que não fizessem uso de medicações que pudessem interferir nos resultados, tais como de uso de drogas como as sulfonamidas e atropina que podem interferir na produção lacrimal.

A avaliação ocular para detecção de olho seco inclui vários exames, porém nenhum pode ser considerado eficiente utilizado isoladamente. Entres os testes têm-se o TLS, TRFL, uso de corantes vitais verde lisina e rosa bengala (Schellini et al. 2004), meibometria (Ofri et al. 2007), determinação da osmolaridade lacrimal (Marques et al. 2015). Neste estudo optou-se avaliar o filme lacrimal pelos TLS e o

TRFL, eu são exames clássicos para avaliação deficiência lacrimal além de serem testes de fácil execução podendo serem instituídos na prática clínica.

Estudo demonstrara que a maioria das pessoas que apresentam distúrbios oculares relacionados à produção lacrimal são mulheres, sugerindo o sexo feminino como um fator de risco. Observou-se também que muitas vezes o olho seco ocorre durante a menopausa e envelhecimento (Schaumberg et al. 2001), porém o mecanismo subjacente a esta diferença associada ao sexo na prevalência de síndromes de olho seco é desconhecida (Schaumberg et al. 2001, Sullivan et al. 2002). Nesse sentido, optou-se por avaliar a mesma correlação na medicina veterinária, uma vez que cadelas submetidas à castração possuem decréscimo dos níveis de hormônios sexuais circulantes, assim como as mulheres na menopausa. Ao mesmo tempo, avaliou-se o fator tempo de castração agravaria esta possível situação de olho seco. Para tanto, dividimos os grupos experimentais de acordo com o tempo de castração, respeitando a idade máxima de cinco anos, já que se sabe que indivíduos mais velhos tendem a ter TLS diminuído, e consequentemente maior risco de desenvolver olho seco (Herrera 2008).

A partir dos dados coletados, não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados quando relacionados o tempo de castração e a produção lacrimal (Quadro 1). Por outro lado, quando comparados os animais castrados como um todo, e os não castrados, observou-se que 59,9% dos animais castrados apresentaram diminuição no TLS, e destes 39,5% apresentaram valores inferiores a 10 mm, sugerindo CCS (Grahm & Sore 2004). Os animais pertencentes ao grupo controle, por sua vez, apresentaram valores normais para o referido teste. Segundo Barabino et al. (2004), o valor médio normal pra o TLS em cães é de 20mm min^{-1} , valores entre 10 e 15mm min^{-1} indicam uma suspeita de CCS e animais que apresentam valores inferiores a 10mm min^{-1} são considerados acometidos com CCS.

Em relação ao TRFL, 98,8% dos animais pertencentes aos grupos de indivíduos castrados apresentaram diminuição do mesmo. O tempo considerado dentro do parâmetro normal de quebra do filme lacrimal em cães é de aproximadamente 20 segundos ou mais (Saito & Kotani 2001). Os valores menores que 20 segundos são indicativos de CCS, quando associados com sinais clínicos como desconforto ocular, fotofobia, blefarospasmo, secreção ocular mucopurulenta, úlceras de córnea, vascularização da córnea, hiperemia conjuntival e prurido discreto (Barabino et al. 2004). Dos animais avaliados nesse estudo que apresentaram TRFL inferior a 20 segundos, 20,3% apresentaram alterações oftálmicas sugestivas de CCS, tais como secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival e lesões de córnea. Os resultados encontrados concordam com Barabino et al. (2004), que afirmam que ao utilizar o TRFL, deve-se associar o resultado obtido a apresentação clínica do animal, uma vez que o animal pode apresentar alteração no teste e não ter sinais clínicos de CCS, como foi encontrado em alguns indivíduos da avaliação.

Dentre os animais que apresentaram alteração ocular associada a CCS e TRFL diminuído, todos estavam entre os animais castrados. Essas alterações observadas estão relacionadas com função das glândulas Meibomianas, uma vez que estas são responsáveis pela quantidade e qualidade de lipídios que compõe a camada lipídica do filme lacrimal (Krenzer et al. 2000, Rocha et al. 2000). Por sua vez, as glândulas Meibomianas são órgãos alvo de andrógeno tendo a sua secreção de conteúdo lipídico influenciada por estes hormônios (Sullivan et al., 2000), que exercem um impacto significativo sobre a saúde e integridade do olho (Sullivan et al. 2002; Ebeigbe & Ebeigbe 2014). Pode-se observar essa relação nos achados deste trabalho, uma vez que entre o grupo dos animais que apresentaram TRFL diminuído e sinais clínicos de CCS, eram animais submetidos ao procedimento de castração, sugerindo que estes estão predispostos a desenvolver a síndrome.

Observa-se que no TLS houve diferença significativa entre alguns grupos (Quadro 1). Animais do grupo C4, que foram submetidos à castração há mais de quatro anos, apresentaram valores médios de TLS abaixo do limite mínimo ($9,40 \pm 2,58$) para produção lacrimal proposta por Grahm & Storey (2004), sendo considerados animais acometidos pela CCS. Os demais animais pertencentes aos grupos de animais castrados podem ser considerados suspeitos, uma vez que apresentam valores para o TLS inferiores a 15mm min^{-1} .

Quadro 1. Comparação entre os valores obtidos nos Teste Lacrimal de Shirmer, Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal e dosagens de testosterona e estradiol por grupo.

Grupo		Schimer ^a	TRFL ^a	Testosterona ^b	Estradiol ^b
C0	Valores*	23,00±3,17^A	19,07±3,44^A	0,07±0,12	54,92±29,52
	Mediana	23,00	18,00	0,01^A	44,50^A
C1	Valores*	14,77±5,04^B	10,05±4,00^B	0,09±0,23	18,82±8,22
	Mediana	15,00	8,83	0,00^{ABC}	19,00^B
C2	Valores*	14,40±5,50^B	8,34±3,11^B	0,01±0,01	14,40±4,92
	Mediana	12,00	8,33	0,00^{BC}	13,50^C
C3	Valores*	14,15±6,20^B	9,37±2,56^B	0,01±0,01	12,20±4,32
	Mediana	13,00	9,46	0,00^{BC}	13,50^{CD}
C4	Valores*	9,40±2,58^C	7,47±1,65^B	0,01±0,03	9,50±4,35
	Mediana	9,50	7,33	0,00^C	9,00^D

^a Comparação entre as médias dos grupos pelo teste de Tukey HSD; ^b Comparação entre medianas pelo teste Mann-Whitney U; * Média e desvio padrão para variáveis quantitativas e frequências para as qualitativas; Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Segundo Mengher et al. (1985), um valor de referência de < 10 segundos para o TRFL é utilizado para diagnóstico de olho seco. No entanto, Dews (2007) classifica a gravidade do olho seco por meio de sinais e sintomas e alterações da superfície ocular, e categoriza valores de TRFL abaixo de 10 segundos como nível dois, numa escala de um a quatro. Neste estudo, foi observado que todos os grupos de animais castrados apresentaram uma prematura TRFL, abaixo de 10 segundos, o que sugere que as cadelas castradas tem uma tendência a diminuição no TRFL, o que pode evidenciar uma deficiência qualitativa da estabilidade do filme lacrimal (Barabino et al. 2004).

A diminuição do TRFL é de grande importância no diagnóstico do olho seco em todas as espécies (Davisson & Kuonem 2004), uma vez que a cobertura oleosa retarda a evaporação da porção aquosa promovendo a distribuição estável das lágrimas sobre a córnea, aumentando a tensão superficial (Alves 2010, Gelatt 2003). Esta relação entre as porções aquosa e lipídica do filme lacrimal é reforçada pela observação da correlação positiva entre o TLS e a TRFL que obteve-se neste estudo, logo se observa que deve haver relação de estabilidade entre as camadas componentes do filme lagrimal, a fim de garantir a integridade da córnea. A deficiência ou até mesmo em alguns casos mais graves, a ausência, do filme lacrimal pode representar um sério impacto sobre os olhos, onde a não administração de lágrimas artificiais ou terapia para os distúrbios do filme lacrimal, pode levar ao ressecamento, predispor a infecções microbianas, ulceração e perfuração da córnea, que evoluem para deficiência visual e até mesmo cegueira (Sullivan et al. 2000, Worda et al. 2001).

Observou-se uma correlação entre os níveis hormonais e os testes empregados para detecção do olho seco (Quadro 2). Houve uma correlação fraca entre o TLS e os níveis de testosterona, e entre o TRFL e níveis séricos de testosterona. Por outro lado houve uma correlação positiva forte entre os mesmos testes e os níveis de estradiol. Demonstrando que os animais castrados, que apresentam níveis de estradiol significativamente diminuídos, apresentaram também diminuição do TLS e TRFL.

Luo et al. (2001) demonstraram que a castração de coelhos, provoca atrofia das células epiteliais da glândula lacrimal, a regressão das vesículas de muco das células acinares e diminuição significativa no número de células caliciformes da conjuntiva. O que leva à diminuição na quantidade e qualidade do filme lacrimal, observadas nos teste lacrimal de Schirmer e no teste de ruptura do filme lacrimal, respectivamente.

Assim, a redução dos níveis de estrógenos devido à castração, pode ser a causa do olho seco nos indivíduos estudados. A partir do resultado ficou evidente que o volume e a qualidade da lágrima foram menores nos animais submetidos à castração em comparação com os não castrados. Ebeigbe e Ebeigbe (2014), em estudo realizado com mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa, demonstraram que há uma diferença significativa entre o TLS e o TRFL entre os grupos pré e pós-menopausas, porém por outro lado revelou haver uma correlação positiva entre a produção lacrimal e os níveis séricos de testosterona. O que não foi observado em nesse estudo, uma vez que se observou essa correlação entre os níveis séricos de estradiol.

Quadro 2. Correlação de Spearman entre as variáveis do estudo.

	Idade	Schirmer	TRFL	Testosterona	Estrógeno
Grupo	0,114	0,274	0,401	0,150	0,279
Valor P	0,231	0,004*	<0,001*	0,114	0,003*
Idade		-0,384	-0,330	-0,106	-0,541
Valor P		0,001*	0,001*	0,265	<0,001*
Schirmer			0,708	0,140	0,588
Valor P			<0,001*	0,144	<0,001*
TRFL				0,213	0,604
Valor P				0,023*	<0,001*
Testosterona					0,281
Valor P					0,003*

*Associação significativa ao nível de 5%. TLS: Teste Lacrimal de Schirmer, TRFL: Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal,

Apesar do TRFL e os níveis de testosterona não apresentarem correlação neste estudo, a deficiência de andrógenos é considerada um fator etiológico fundamental na patogênese da disfunção das glândulas meibomianas e olho seco evaporativo (Krenzer 2000, Rocha et al. 2000, Sullivan 2000). Sabe-se que andrógenos estão envolvidos no controle do desenvolvimento, na diferenciação e produção de lipídeos das glândulas sebáceas por todo corpo, atuando sobre tudo nas células acinares dessas glândulas (Imperato-Mcginley et al. 1993). Fatores que induzem a uma deficiência de andrógeno e levam a um perfil lipídico aletrado, como o que ocorre nas doenças auto-imunes e menopausa, são considerados fatores etiológicos importantes no desenvolvimento da disfunção da glândula meibomiana o que resulta na evaporação aumentada e diminuição da estabilidade do filme lacrimal (Worda et al. 2001). Além da sua ação nas glândulas lacrimais, onde o declínio dos níveis de androgênio provocaria regressão glandular (Azarollo et al. 1995, Azarollo et al. 1997; Azarollo et al. 1999).

CONCLUSÃO

A diminuição dos níveis séricos de testosterona e de estradiol em cadelas submetidas à castração afetam quantitativamente e qualitativamente o filme lacrimal, o que indica uma maior predisposição ao desenvolvimento de olho seco. Tal resultado enfatiza a importância do acompanhamento clínico a fim de prevenir os sinais característicos de uma CCS, atuando de forma preventiva por meio de administração da terapêutica adequada para cada paciente.

REFERÊNCIAS

- Alves, J. S. Olho seco: uma abordagem didática. Rio de Janeiro: E-papers. 2010.120 p.
- Ashar, J.N., Mathur, A., Sangwan, V. 2011. CF101 for Dry Eye. *Ophthalmology*. 118: p.1011-1012.
- Azzarolo, A.M., Mircheff, A. K., Kaswan, R. L., Stanczyk, F. K., Gentschein, E., Becker, L., Nassir, B., Warren, D.W. 1997. Androgen support of lacrimal gland function. *Endocrine*. 6 (1): 39-45.
- Azzarolo, A.M., Bjerrum, K., Maves, C. A., Becker, L., Wood, R.L., Mircheff, A.K., Warren, D.W. 1995. Hypophysectomy-induced regression of female rat lacrimal glands: partial restoration and maintenance by dihydrotestosterone and prolactin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 36(1):216-226.
- Azzarolo, A.M., Wood, R. L., Mircheff, A. K., Richters, A K., Olsen, E., Berkowitz, M., Bachmann, M., Huang, Z.M., Zolfagari, R., Warren, D.W. 1999. Androgen Influence on Lacrimal Gland Apoptosis Necrosis, and Lymphocytic Infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40(3):592-602.
- Babiae, G.S., Gligorijeviae, J., Zlatanoviae, G. 2011. Diagnostics of dry eye. *Med Pregl*. 64(1-2):68-72.

- Barabino, S., Chen, W., Dana, M. R. 2004. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Exp Eye Res.* 79(5):613-21.
- Brewit, H., Sistani, F. 2001. Dry eye disease: the scale of the problem. *Surv Ophthalmol.* 45 (2):199-202.
- Davidson, H. J; Kuonen, V. J. 2004. The tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol.* 7(2):71-77.
- DEWS – International Dry Eye WorkShop – Report. The Ocular Surface, v.5,n.2, p.142, 2007.
- Ebeigbe, J.A., Ebeigbe, P.N. 2014. The influence of sex hormone levels on tear production in postmenopausal Nigerian women. *Afr J Med Med Sci.* 43(3):205-211.
- Fridman, D.; Freitag, M.M.; Kleinert, F.; Lavinsky, J. 2004. Olho seco: conceitos, história natural e classificações. *Arq. Bras. Oftalmol.* 67(1): 181-185
- Gellat, N.K. Manual de Oftalmologia Veterinária. 3.ed. São Paulo: Manole: p. 594, 2003.
- Grahn, B.H.; Storey, E.S. 2004. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 34(3):739-53.
- Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai LQ, Yee B, Epstein J, Pochi P. 1993. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 76(2):524-528.
- Kallarackal, G. U., P, Ansari, E. A, Amos, N., Martin, J.C. 2002. A comparative study to assess the clinical use of Fluorescein Meniscus Time (FMT) with Tear Break up Time (TBUT) and Schirmer's tests (ST) in the diagnosis of dry eyes. *Eye (Lond).* 16(5):594-600.
- Krenzer, K.L., Dana, M.R. Ullman, M.D., Cermak, J.M. 2000. Effect androgen deficient on the human meibomian gland and ocular surfasse. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(12):4874-4882.
- MARQUES, D. L., ALVES, M., MODULO, C. M., SILVA, L.E.C.M.S., REINACH, P. 2015. Osmolaridade lacrimal e superfície ocular em modelo de olho seco por toxicidade. *Revista brasileira oftalmologia.* 74 (2): 68-72
- Mengher, L.S., Bron, A.J., Tonge, S.R., Gilbert, D.J. 1985. A non-invasive instrument for clinical assessment of the precorneal tear film stability. *Curr Eye Res.* 4(1):1-7.
- Pigatto, J.A.T., Pereira, F.Q., Almeida, A.C.V.R., Redaeli, R., Faganello, C.S., Franzen, A.A. 2007. Ceratoconjuntivite seca em cães e gatos. *Acta sci. vet.* 35 (2):250-251.
- Rocha ,E.M, Wickham L.A., Silveira, L.A, Krenzer, K.L., Yu, F.S., Toda, I, Sullivan, B.D., Sullivan, D.A. 2000. Identification of androgen receptor protein and 5a-reductase mRNA in human ocular tissues. *Br J Ophthalmol.* 84(1):76-84.
- Saito, A., Kotani,T. 2001. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Vet Ophthalmol.* 4(1):7-11.
- Sampaio, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- Schaumberg, D.A., J.E. Buring, D.A. Sullivan M.R. Dana. 2001. Hormone replacement therapy and the prevalence of dry eye syndrome. *JAMA.* 286(17):2114-2119.
- Schellini, S.A.; Sakamoto, R.H.; Ishi, L.A.; Hoyama, E.; Nahas, E.A.; Padovani, C.R. 2004. Influência da terapia hormonal sobre o filme lacrimal em mulheres na pós-menopausa. *Rev. Cien. Med.* 13(4): 347-353.

Slatter, D. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária. 3.ed. São Paulo: Roca, p. 686, 2005.

Sullivan, B.D., Evans, J.E., Cermak, J.M., Krenzer, K.L., Dana, M.R., Sullivan, D.A. 2002. Complete androgen insensitivity syndrome: effect on human meibomian gland secretions. *Archivos Ophthalmol.* 120 (12):1689-1699.

Sullivan, D.A., Sullivan, B.D., Ullman, M.D., Rocha, E.M., Krenzer, K.L., Cermak, J.M., Toda, I., Doane, M.G., Evans, J.E., Wickham, L.A. 2000. Androgen Influence on the Meibomian Gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*41(12: 3732-3742.

Worda, C., Nepp, J., Huber, J. C., Sator, M.O. 2001. Treatment of keratoconjunctivitis sicca with topical androgen. *Maturitas*, 37(3):209-212.

ARTIGO 2

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”

1 **Aspectos citológicos e microbiológicos da mucosa conjuntival de cadelas com produção**
2 **lacrimal reduzida**

3 **Cytological and microbiological aspects of conjunctival mucosa of dogs with reduced**
4 **tear production**

5 Daniela da S. P. Campinho^{1*}, Maria Cristina O. C. Coelho¹, Flaviane M. F. M. Silva²,
6 Fabrício Bezerra de Sá³, Luciana C. de A. Coutinho¹, Thábata M. V. de Melo¹, Mirna J. M.
7 Lima¹

8 ¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
9 Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. E-mail:
10 danielacampinho@gmail.com

11 ²Colegiado de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Vale do São Francisco,
12 Rodovia BR-407, KM 12 Lote 543, S/n - Projeto de Irrigação Nilo Coelho, Petrolina - PE,
13 56300-000, Brasil.

14 ³Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal , Universidade Federal Rural de
15 Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

16
17 **RESUMO**

18 Objetivou-se realizar um estudo citológico e microbiológico da conjuntiva de cadelas
19 com diminuição da produção lacrimal. Foram coletadas amostras conjuntivais de cadelas, sem
20 raça definida, castradas, estas foram agrupadas em dois grupos, com produção lacrimal dentro
21 dos parâmetros de normalidade e outro com diminuição da produção lacrimal. Foi realizada a
22 avaliação microbiológica e citologia conjuntival esfoliativa da conjuntiva palpebral. Para a
23 análise da distribuição das amostras utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. A partir disso,
24 realizou-se a análise das variáveis por meio do teste não-paramétrico de Qui-quadrado. Houve
25 predominância de células epiteliais superficiais e um aumento das células queratinizadas na
26 citologia conjuntival de cadelas com produção lacrimal diminuída. O estudo microbiológico
27 da conjuntiva palpebral demonstrou que não há mudança na microbiota conjuntival de
28 animais com produção lacrimal reduzida, dentre os agentes microbianos *Staphylococcus sp.*
29 foi o predominante entre as bactérias e a levedura *Candida sp.*, o fungo mais encontrado.

30 TERMOS DE INDEXAÇÃO: citologia conjuntival, olho seco, cão, microbiota conjuntival

32 ABSTRACT

33 The objective was to conduct a cytological and microbiological study of the
34 conjunctiva of dogs with decreased tear production. conjunctival samples from dogs were
35 collected, mixed breed, spayed, animals were divided into two groups, with tear production
36 within normal parameters and the other with decreased tear production. microbiological
37 evaluation and conjunctival exfoliative cytology of eyelid conjunctiva was performed. For the
38 analysis of the distribution of samples we used the Shapiro-Wilk test. From this, there was the
39 analysis of the variables using the non-parametric Chi-square. There was a predominance of
40 superficial epithelial cells and an increase in keratinized cells in conjunctival cytology dogs
41 with decreased tear production. The microbiological study of the palpebral conjunctiva
42 demonsntrou no change in conjunctival microbiota of animals with reduced tear production,
43 from the microbial agents *Staphylococcus sp.* was the most prevalent among bacteria and the
44 yeast *Candida sp.* fungus found more.

45 INDEX TERMS: conjunctival cytology, dry eye, dog, conjunctival microbiota

46

47 INTRODUÇÃO

48 A conjuntiva é a mais exposta de todas as membranas mucosas, revestindo as porções
49 internas das pálpebras superiores e inferiores, a terceira pálpebra, e a parte anterior do bulbo
50 ocular, é responsável por desempenhar um importante papel na dinâmica lacrimal, na
51 proteção imunológica do olho, nos movimentos oculares e na cicatrização corneal (Gelatt
52 2003, Slatter 2005). O epitélio conjuntival é do tipo pavimentoso estratificado não
53 queratinizado, composto por diversas camadas celulares que incluem células cuboides,
54 poliédricas ou intermediárias circulares e outra camada de células colunares superficiais. Ao
55 longo de todo o epitélio observam-se células caliciformes que são responsáveis pela produção
56 de mucina, componente fundamental na composição da lágrima (Raskin e Meyer 2003).

57 Devido a sua exposição ao meio ambiente, a conjuntiva está sujeita a diversas
58 enfermidades (Ribeiro et al. 2008) sendo sede de lesões com variadas etiologias, como as
59 alterações degenerativas, circulatórias, inflamatórias, do crescimento e desenvolvimento, o
60 que impossibilita o diagnóstico apenas pelo exame clínico (Lima et al. 2005). Nesse sentido,
61 a citologia conjuntival é uma técnica de fácil realização, baixo custo e útil no diagnóstico
62 precoce das afecções conjuntivais por preceder procedimentos mais invasivos, acrescentando

63 informações para a confirmação da suspeita clínica e implementação da terapêutica ocular
64 mais adequada, independente da espécie (Brandão et al. 2002, Lima et al. 2014).

65 Diversos estudos demonstraram que a microbiota presente em olhos de cães saudáveis
66 é composta predominantemente por bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus sp*,
67 *Bacillus sp* e *Streptococcus sp* (Andrade et al. 2002, Prado et al. 2005, Santos et al. 2009, Oriá
68 et al. 2013,) e fungos ambientais, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Dermatium sp.*, *Aspergillus sp*,
69 *Candida sp*, e *Clasdosporium sp* (Gerding e Kakoma 1990, Verneuil et al. 2014) . Essa
70 microbiota própria da superfície ocular desenvolve importante papel, uma vez que a mesma
71 participa da manutenção da saúde ocular, impedindo o crescimento excessivo de agentes
72 potencialmente patogênicos; porém, ocorrendo danos à integridade da córnea, estes
73 microrganismos podem tornar-se agentes patogênicos, que podem levar a perda da visão
74 (Gerding e Kakoma 1990).

75 O olho seco é uma desordem comum em cães com uma incidência entre 11 e 14%
76 (Almeida et al. 2004, Andrade e Laus 1997). Os distúrbios quantitativos e qualitativos do
77 filme lacrimal geralmente estão relacionados com danos a superfície corneana e da
78 conjuntiva. Os pacientes com olho seco possuem a osmolaridade do filme lacrimal maior do
79 que em pacientes normais. Esta hiperosmolaridade causa danos por aumentar a osmolaridade
80 das células epiteliais e pela ativação de eventos da cascata inflamatória na superfície ocular,
81 com liberação de fatores inflamatórios na lágrima (Dews, 2007), o que estimula as
82 terminações nervosas da córnea, levando a sintomas de desconforto ocular, aumento do ato de
83 piscar e inicialmente secreção lacrimal reflexa compensatória (Grahn e Andares 2004; Dews
84 2007), enfermidade corneal progressiva e redução da visão (Gelatt 2003).

85 A diminuição da produção lacrimal pode levar a alterações do epitélio conjuntival e
86 corneano, além de favorecer injúrias na córnea, que por sua vez podem levar ao desequilíbrio
87 da microbiota da superfície ocular. Neste contexto objetivou-se realizar um estudo citológico
88 e microbiológico da conjuntiva de cadelas com diminuição da produção lacrimal.

89

90 MATERIAL E MÉTODOS

91 O delineamento experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso
92 de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, licença N° 050/2015.

93 Foram coletadas amostras conjuntivais de cadelas, com peso médio de 12,8 kg, sem
94 raça definida, com idade entre 1 e 5 anos. Os animais foram submetido a avaliação prévia,

95 para tanto, seguiu-se a semiotécnica clínica (Feitosa 2014) e oftálmica (Gelatt, 2003), além de
96 hemograma e exames bioquímicos (ureia, creatinina, alanina-aminotransferase, aspartato
97 amitransferase, fosfatase alcalina e albumina) no intuito de selecionar cadelas híginas, livres
98 afecções que pudessem interferir nos resultados obtidos. Realizou-se o Teste Lacrimal de
99 Schirmer (TLS) para mensuração da produção lacrimal. O TLS foi realizado por meio da
100 inserção da tira (Ophthalmos®) na porção medial da pálpebra inferior durante um minuto. Em
101 seguida, observou-se a quantidade umedecida na tira e sua respectiva marcação à escala em
102 milímetros estabelecida segundo o fabricante. Nenhum dos cães estava recebendo tratamento
103 antimicrobiano sistêmico ou tópico antes da coleta das amostras.

104 Foram constituídos dois grupos experimentais, a saber: GC grupo controle (n= 24
105 olhos) ao teste lacrimal de Schirmer, dentro da normalidade, de >10- 25 mm, ausência de
106 lesões oculares ou em anexos, Grupo GD (n= 30 olhos), animais com diminuição da produção
107 lacrimal 10 – 0 mm (Carvalho et al., 1992).

108 Para avaliação microbiológica foram colhidas amostras com auxílio de *swabs* (Bac-
109 Swab – DME) estéril, pressionando-os direto e levemente no saco conjuntival inferior, por
110 meio de movimentos rotatórios. Em seguida, estes foram armazenados em tubos de ensaio
111 com meio de transporte Stuart e mantidos sob refrigeração, entre +2 e +8° C.

112 Para isolamento de bactérias aeróbias, as amostras foram semeadas em Ágar sangue de
113 carneiro a 6% e Ágar Levine, incubadas a 37 °C por 24-48 horas. Após o crescimento das
114 colônias nos diferentes meios, foi realizada a identificação primária das bactérias.
115 Observaram-se as características macroscópicas das colônias bacterianas, que incluíam brilho,
116 cor, tamanho, morfologia e presença ou não de hemólise. Em seguida, procedeu-se com a
117 avaliação das características morfotintoriais, utilizando-se a técnica de Gram (Tortora et al.
118 2010). Na sequência, após o isolamento das colônias, as amostras de bactérias Gram negativas
119 foram submetidas a testes bioquímicos para a identificação quanto à espécie e/ou gênero
120 (Tortora et al. 2010).

121 Para o isolamento de fungos, os *swabs* foram inoculados em caldo *Sabouraud* e
122 incubados em aerobiose em temperatura ambiente; após três dias de incubação as amostras
123 foram semeadas em Ágar Sabouraud, sendo mantidas nas mesmas condições descritas. Uma
124 classificação inicial foi realizada pela análise morfológica das colônias, classificando-as
125 segundo apresentação de micélios vegetativo, aéreo e reprodutivo. Foram então,
126 confeccionadas lâminas a partir das colônias, que foram coradas pelos métodos de Gram e

127 azul de metileno (Tortora et al. 2010). As amostras que não apresentaram crescimento em
128 quatro semanas foram descartadas como negativas.

129 Realizou-se a citologia conjuntival pelo método de abrasão com escova, utilizando-se
130 escovas coletoras estéreis (escova cervical modelo regular estéril, Kolplast Cia Ltda),
131 destinando-se uma escova para cada colheita. A escova foi introduzida no saco conjuntival
132 inferior, sendo girada e atritada sobre a conjuntiva. As células foram transferidas para uma
133 lâmina (Invicta, Barrio Cia Ltda.) rolando-se a escova ao longo da superfície da mesma. As
134 lâminas foram fixadas em metanol e coradas pelo método de Rosenfeld (metanol, Giemsa,
135 May-Greünwald) utilizando-se a mesma metodologia para esfregaços sanguíneos descrita por
136 Birgel (1982), e montadas com resina sintética (Entellan - Merck) e lamínula (Invicta, Barrio
137 Cia Ltda).

138 As lâminas foram analisadas em aumento de 100x realizando-se análise qualitativa e
139 quantitativa das células e presença ou não de muco. As células foram reconhecidas e
140 analisadas, individualmente, em aumento de 1.000x utilizando objetiva de imersão. As células
141 epiteliais superficiais, intermediárias e basais, bem como as queratinizadas foram
142 quantificadas, percorrendo-se cada lâmina em zigue-zague, até que se perfizessem 100
143 células. Agrupamentos celulares e elementos degenerados ou danificados foram evitados. A
144 avaliação qualitativa foi realizada considerando a taxa de células preservadas com detalhes
145 bem definidos de núcleo e citoplasma (Yagmur et al. 1997).

146 Para a análise da normalidade das variáveis utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk.
147 Posteriormente, as variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelos
148 testes T de Student, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Em relação às não
149 paramétricas, empregaram-se os testes de Kruskal-Wallis H, Mann-Whitney U e Qui-
150 quadrado (Sampaio, 1998). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a
151 execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

152

153 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

154 Previamente a coleta das amostras de citologia conjuntival, não foram utilizados
155 colírios anestésicos, evitando-se assim o seu efeito citotóxico e bacteriostático, já que este
156 estudo também envolve avaliação da microbiota conjuntival (Malerba, 1990). Alguns autores
157 relataram que o método esfoliativo causa certo grau de desconforto ao animal (Borges et al.
158 2012, Venâncio et al. 2012), os animais mantiveram-se tranquilos e não demonstraram

159 desconforto durante a coleta Lima et al (2014), observou resultado semelhante dispensando o
160 uso do colírio anestésico.

161 A citologia conjuntival é uma técnica útil no diagnóstico precoce das afecções
162 conjuntivais, uma vez que fornece informações que podem confirmar a suspeita clínica e
163 auxiliar na escolha da adequada terapêutica, além de ser uma técnica simples, de baixo custo e
164 pouco invasiva (Brandão et al. 2002, Raskin e Meyer, 2003). Neste estudo optou-se pela
165 técnica de esfoliação conjuntival utilizando a escova de citológica cervical, uma vez que este
166 meio de coleta já foi descrita como adequada para a avaliação das camadas mais profundas,
167 preservando a integridade e distribuição celular na lâmina de microscopia, com menor
168 sobreposição de células (Bauer et al 1996, Yagmur et al 1997, Peterson-Jones e Crispin,
169 2006).

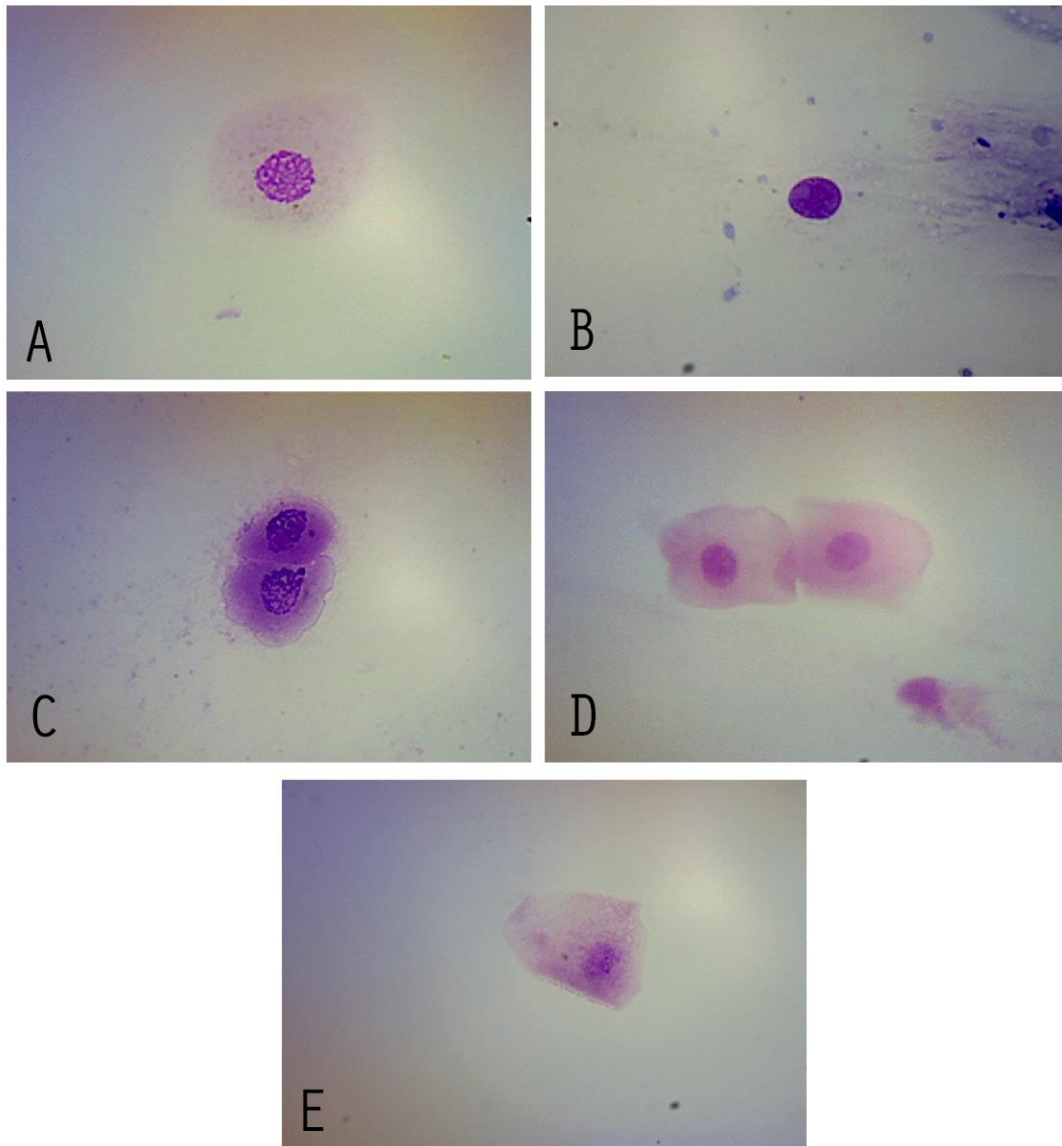
170 A técnica mostrou-se satisfatória, permitindo obter uma amostragem de material
171 suficiente, boa preservação de núcleo e citoplasma, além de ter se mostrado um instrumento
172 de fácil utilização e baixo custo. Venâncio et al (2012) em seu estudo relatou resultados
173 semelhantes relacionados a quantidade e qualidade de material obtido com a utilização do
174 método de citologia esfoliativa em gatos saudáveis. Evodia (2007) e Lima et al (2014),
175 encontram resultados equivalentes em estudo com cães obtendo amostras com alta
176 celularidade e preservação morfológica, demonstrando que a técnica de citologia esfoliativa é
177 útil para avaliação da superfície ocular. O exame microscópico das lâminas demonstrou
178 abundantes células epiteliais conjuntivais adequadamente coradas apresentando citoplasma
179 levemente basofílico ou pouco corado pelo Giemsa.

180 As amostras estudadas, de ambos os grupos, apresentaram células epiteliais como tipo
181 celular mais abundante. Resultados semelhantes aos estudos de citologia conjuntival de
182 diferentes espécies (Malerba 1990, Rocha et al. 2001, Borges et al. 2012, Venâncio et al.
183 2012), caracterizando que há uma predominância desse tipo celular em amostras oriundas de
184 conjuntiva palpebral. As células epiteliais constituem a primeira camada celular da
185 conjuntiva, e devem estar presentes em todas as amostras citológicas, quando não estão
186 presentes na amostra torna-se evidente que coleta não foi adequada (Rito, 2009).

187 As amostras oriundas do grupo controle apresentaram abundante células epiteliais
188 conjuntivais de todos os tipos celulares (Figura 1), sendo as células intermediárias as mais
189 comuns ($87,9 \pm 4,0$), seguida das células superficiais ($9,4 \pm 3,6$), resultados semelhantes ao
190 encontrado por Borges et al. (2012), que teve uma média de 11,5 de células superficiais em

191 estudo de citologia conjuntival de cães sem alterações oftálmicas utilizando como técnica de
192 citologia esfoliativa.

193



194

195 Fig. 1. Fotomicrografias de células conjuntivais de cão colhidas por meio de abrasão com
196 escova. (A) Célula Caliciforme. (B) Célula Basal. (C) Células Intermediárias. (D) Células
197 Superficiais. (E) Célula Escamosa. Giemsa, 400x.

198

199 Nas amostras do grupo com diminuição da produção lacrimal, foi observada a
200 predominância de células superficiais ($55,9 \pm 9,4$), também foi observado um aumento do
201 número de células queratinizadas ($2,4 \pm 2,9$) (Tabela 1). Quando se compara os grupos

202 observou-se uma mudança significativa na apresentação dos tipos celulares, esta alteração
 203 pode está relacionada com uma reação tecidual perante o ressecamento no qual a superfície
 204 ocular estava exposta, que levou a predominancia de células epiteliais mais velhas (Lima et al.
 205 2014).

206

207 **Tabela1.** Resultados do TLS, citologia conjuntival e exame microbiológico do Grupo I
 208 (controle), e Grupo II (animais com produção lacrimal diminuída).

Exame citológico	GC (n=24)			GD (n=30)		
	Valores*	Mediana	Intervalo	Valores	Mediana	Intervalo
Teste de Schirmer ^a	23,0±3,1 ^A	23,0	18,0-30,0	8,4±2,3 ^B	10,0	1,0-10,0
Células superficiais ^a	9,4±3,6 ^B	9,0	3,0-15,0	55,9±9,4 ^A	57,5	31,0-70,0
Células intermediárias ^a	87,9±4,3 ^A	87,5	80,0-96,0	40,4±9,8 ^B	39,5	28,0-69,0
Células basais ^b	0,4±0,8	0,00	0,0-3,0	0,4±0,6	0,0	0,0-3,0
Células queratinizadas ^b	0,38±0,6	0,0 ^B	0,0-2,0	2,4±2,9	2,0 ^A	0,0-10,0
Células caliciformes ^b	1,8±1,2	2,0 ^A	0,0-4,0	0,8±1,0	0,0 ^B	0,0-3,0
Exame microbiológico ^c	62,5% (15)	-	-	66,7% (20)	-	-

209 n – número de amostras; * Média e desvio padrão para variáveis quantitativas e frequências
 210 para as qualitativas; ^a Comparação entre as médias dos grupos pelo teste t de Student; ^b
 211 Comparação entre medianas pelo teste Mann-Whitney U; Associação das frequências pelo
 212 teste de Qui-Quadrado; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença
 213 estatística (P<0,05).

214

215 Não foi observada a presença de células inflamatórias nas amostras analisadas, de
 216 ambos os grupos. Estudos anteriores, demonstraram que na citologia conjuntival de olhos
 217 saudáveis raramente se observa a presença de células queratinizadas e de células inflamatórias
 218 (Lavach et al. 1977, Bolzan et al. 2005), corroborando com o que foi observado nesse estudo.

219 Foram encontradas raras células caliciformes (1,8±1,2 e 0,8±1,0), havendo
 220 predominância deste tipo celular no GC. A reduzida celularidade das células caliciformes
 221 pode ser justificada, pela localização dessas células e o método de coleta. Uma vez que as
 222 células caliciformes são encontradas em maior concentração no fórnice inferior e a coleta por
 223 citologia esfoliativa com a escova ginecológica obtém amostra mais facilmente da conjuntiva

224 palpebral (Moore et al. 1987). Embora pouco se saiba sobre os fatores que influenciam a
225 densidade e distribuição das células caliciformes conjuntivais, o grau de hidratação
226 conjuntival foi apontado por Moore et al. (1987) como um fator exógeno relevante. Neste
227 estudo foi observado que animais com a produção lacrimal diminuída teve uma redução no
228 número de células caliciformes, corroborando ao sugerido por Moore et al. (1987) e com
229 estudo com cães portadores de ceratoconjuntivite seca (CCS), onde foi observado relação
230 direta entre a enfermidade e a redução da densidade de células caliciformes (Moore et al.
231 2001).

232 O estudo da microbiota conjuntival evidenciou crescimento em 62,5% e 66,7% das
233 amostras analisadas dos grupos controle e com diminuição da produção lacrimal,
234 respectivamente. Em cerca de 70 a 90% dos cães saudáveis é possível isolar microrganismos
235 do saco conjuntival (Gelat 2003), essa variação pode ser relacionada pelas diferentes técnicas
236 de coleta do material. Nesse estudo optou-se pela utilização de *swabs* secos estéreis, no intuito
237 de evitar possível contaminação quando se os umedece previamente a coleta. Souza (2001),
238 utilizando também *swabs* secos estéreis, obtiveram respectivamente, 50 e 66,6% de culturas
239 positivas em conjuntivas de cães saudáveis. Não houve diferença estatística entre os grupos,
240 demonstrando que não há diferença na microbiota conjuntival de cadelas com produção
241 lacrimal normal e cadelas com a produção lacrimal diminuída. Este achado pode ser
242 justificado por serem amostras de animais que não apresentaram lesões oculares e de anexos.

243 Estudos da microbiota conjuntival têm revelado resultados diferentes, porém estes
244 estudos apontam espécies de *Staphylococcus* como as mais frequentemente isoladas (Silva
245 2001, Teixeira et al. 2002, Prado 2005, Wnag et al. 2008, Oriá et al. 2013). Também foi
246 evidenciado neste estudo que, *Staphylococcus sp* foi o microrganismo mais frequentemente
247 isolado com 87,0%, seguido de 64,2% de Bacilos Gram positivos e 19,3% de *Bacillus sp*.
248 (Tabela 2). Corroborando com os dados encontrados na literatura, que relata que os
249 microrganismos mais comumente isolados da superfície ocular são as bactérias Gram-
250 positivas, embora não raramente também sejam isolados organismos Gram-Negativos
251 (Haghkhan, et al 2005). Oriá et al. (2013), observou que 60% das amostras de cães sadios
252 apresentaram crescimento bacteriano e destas 85,37% eram espécies Gram-positivas enquanto
253 que apenas 14,63% eram de bactérias Gram-negativas.

254

255

256 **Tabela2.** Frequência do isolamento de bactérias e fungos do saco conjuntival de cadelas.

Microrganismos	FR%	FA
Amostras negativas	35,2% ^a	19
Amostras positivas	64,8% ^a	35
<i>Staphylococcus</i> sp.	85,7% ^b	30
Bacilo Gram negativo	57,1% ^b	20
<i>Candidasp.</i>	11,4% ^b	4
<i>Bacillus</i> sp.	8,5% ^b	3
<i>Malasseziasp.</i>	8,5% ^b	3
<i>Corynebacterium</i> sp.	5,7% ^b	2
<i>Streptococcus</i> sp.	5,7% ^b	2
<i>Enterobacteraerogenes</i>	2,8% ^b	1

257 FR = Frequência relativa; FA = Frequência absoluta; ^a Frequência relativa calculada a partir
 258 do total de amostras analisadas (N=54); ^b Frequência relativa calculada a partir do total de
 259 amostras positivas (N=35).

260

261 Os Bacilos Gram negativos em sua maioria, pertencem na à família
 262 *Enterobacteriaceae*, encontram-se no solo, na água, na vegetação e fazem parte da microbiota
 263 intestinal normal de muitos animais, já os *Staphylococcus sp* são microrganismos presente
 264 na microbiota da pele e mucosa dos animais. Assim, os agentes encontrados nesse estudo, são
 265 microrganismos que compõem a microbiota do saco conjuntival, considerados não invasivos,
 266 e são os que geralmente são isolados em amostras bacteriológicas da superfície ocular. Estes
 267 contribuem para manutenção da saúde ocular, inibindo o crescimento de patógenos (Gerding e
 268 Kakoma 1990, Wang et al 2008). No entanto, estes microrganismos podem torna-se
 269 potenciais patógenos quando ocorre lesão de córnea, ou com indivíduos que estejam com a
 270 resposta imunológica deprimida (Solari et al., 2004, Winn et al., 2006), ou até mesmo em
 271 animais alvo deste estudo, que têm a produção lacrimal diminuída (Barnett, et al 2002).

272 A ocorrência de mais de um microrganismo por amostra foi observada em 78,2% dos
 273 casos. Sendo mais frequente *Staphylococcus sp.* e Bacilo Gram negativo, com 48,6% das
 274 amostras, seguido de *Staphylococcus sp.*e *Streptococcus sp* 8,2%. Outros estudos tem
 275 mostrado que é frequente ser isolado mais de espécie bacteriana, Prado et al. (2005), observou
 276 que 23,4% das amostras analisadas tinham duas ou três espécies envolvidas.

277 No que se refere aos isolados da microbiota fúngica, foi observado a ocorrência de
 278 12,9% de amostras fúngicas na conjuntiva dos animais analisados. Verneuil et al. (2014),

279 recuperaram 22% de colônias fúngicas a partir de conjuntiva de cães clinicamente saudáveis,
280 valor superior a essa experimentação. Este fato pode estar relacionado com a sazonalidade e
281 região geográfica, uma vez que já foi demonstrado em estudos anteriores que pode haver
282 prevalência de agentes diferentes de acordo com a estação do ano (Andrade et al. 2002).

283 Foram identificadas amostras de *Candida* sp.e *Malassezia* spp nas amostras
284 analisadas, de ambos os grupos. Dentre os agentes fúngicos esperados no isolamento na
285 conjuntiva ocular de cães está *Candida* sp., além de outros tais como *Penicillium* sp,
286 *Fusarium* sp, *Dermatium* sp., *Aspergillus* sp.,e *Clasdosporium* sp (Gerding e Kakoma, 1990,
287 Verneuil, et al. 2014).

288 A *Malassezia* sp é uma levedura que pode estar associada a dermatites e otites, porém
289 é frequentemente isolada da microbiota cutânea de animais saudáveis. Verneuil et al (2014),
290 isolou *Malassezia* sp na pele do canto medial do olho, demonstrando que esse tipo de
291 levedura pode ser recuperada da pele de animais saudáveis. Estes achados caracterizam que os
292 agentes isolados em estudos de microbiota conjuntival nem sempre estão relacionados a
293 alterações clínicas.

294

295 CONCLUSÕES

296 Há alteração na citologia conjuntival de cadelas com produção lacrimal diminuída e o
297 método de esfoliação para avaliação da citologia conjuntival é confiável e simples para o
298 estudo da superfície ocular e diagnóstico de patologias que a acomete. A condição de
299 deficiência da produção lacrimal não ocasionou mudança na microbiota. Dentre os agentes
300 microbianos o *Staphylococcus* sp foi o agente bacteriano mais encontrado, e entre os fungos
301 a levedura *Candida* sp.

302

303 REFERÊNCIAS

304 ARMSTRONG, R. A. The microbiology of the eye. *Ophthal. Physiol. Opt.* v.20, n.6, p. 429-
305 441, 2000.

306 ANDRADE, A. L.; STRINGHINI, G.; BONELLO, F.L., et al. Microbiota conjuntival de cães
307 saudáveis da cidade de Araçatuba (SP). *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.65, p.323-329, 2002.

308 BAUER, G.A.; SPIESS, B.M.; LUTZ, H. Exfoliative cytology of conjunctiva and cornea in
309 domestic animals: a comparison of four collecting techniques. *Vet Comp Ophthalmol.* v.6,
310 n.3, p.181-6, 1966.

- 311 BERKOWITCH, A.; PERL, S.; ELAD, D., et al. Disseminated aspergillosis in association
312 with *Candida glabrata* infection in a Vizsla dog in Israel. *J Vet Med.* v.65, p.68-71, 2010.
- 313 BOLZAN, A.A.; BRUNELLI, A.J.; CASTRO, M.B., et al. Conjunctival impression cytology
314 in dogs. *Vet Ophthalmol.* v.8, n.6, p.401-405, 2005.
- 315 BORGES, R.F.; CARDOSO, K.C.F.; MOMO, C.; HONSHO, C.S. Estudo comparativo de
316 métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais. *Vet. e Zootec.* v.19,
317 n.3, p.381-391, 2012.
- 318 BRANDÃO, C.V.S.; MINTO, B.W.; ROCHA, N.S.; RANZANI, J.J.T. Citologia conjuntival
319 por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Rev. Educ. Cont. Vet. Med. Zootec.* v.5, n.1, p. 41-
320 47, 2002.
- 321 BRASÃO, S.C.; GOMES, D.O.; RAMOS, G.B., et al. *Malassezia* spp detected at the edge of
322 the eye of a whiteeyed parakeet (*Aratingaleucophthalma*, Statius Muller, 1776) – a case
323 report. *Biosci. J.* v.31, n.4, p.1159-1163, 2015.
- 324 FEITOSA F.L.F. *Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico.* 2014. Roca, São Paulo.
- 325 GELATT, K. N.2003. *Manual de Oftalmologia Veterinária.* São Paulo: Manole. 594p
- 326 GERDING, P.A.; KAKOMA, E.U. Microbiology of the canine and feline eye. *Vet. Clin. N.*
327 *Am.: Small Anim. Pract.* v.20, p.615-625, 1990.
- 328 HAGHKHAH, M.; SARCHAHI, A.; MOLAZEM, M. Conjunctival flora in normal dogs.
329 *Journal of Veterinary Research* v.9, n.2, p.79-83, 2005.
- 330 LAVACH, J.D.; THRALL, M. A.; BENJAMIN, M. M.; SEVERIN, G. A. Cytology of
331 normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* v.170, n.7, p.722-7,
332 1977.
- 333 MALERBA, T.A. 1990. Citologia esfoliativa de conjuntiva de cães (*Canis familiaris*) e gatos
334 (*Felis domestica*). Dissertação de Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária e
335 Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 120p.
- 336 MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V., et al. Density and distribution of
337 canine conjunctival globe t cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* v.28, n.12, p.1925-32, 1987.
- 338 MOORE, C.P.; MCHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. Effect of Cyclosporine on
339 conjunctival mucin in a canine Keratoconjunctivitis sicca model. *Investigative Ophthalmology*
340 *and Visual Science,* v.42, p.653-659, 2001.

- 341 LIMA, C.G.M.G.; VELOSO, J.C.B.; TAVARES, A.D., et al. Método citológico e
342 histopatológico no diagnóstico das lesões da conjuntiva: estudo comparativo. *Arq. Bras.*
343 *Oftalmol.* v.68, n.5, p.623-626, 2005.
- 344 LIMA, F.B.; ORIÁ, A.P.; MENEZES, I.D.S.; et al. 2014. Citologia esfoliativa em cães com
345 ceratoconjuntivite seca. *Enciclopédia biosfera.* v.10, n.18, p.903-910, 2014.
- 346 ORIÁ, A. P.; PINNA, M. H.; FURTADO, M. A., et al. Microbiota conjuntival em cães
347 clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. *Ci. Anim. Bras.* v. 14, n. 4, p. 495-
348 500, 2013.
- 349 PRADO, M. R.; ROCHA, M. F. G.; BRITO, E. H. S., et al. Survey of bacterial
350 microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative
351 keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Vet Ophthalmol*, v.8, n.1, p. 33–37, 2005.
- 352 RASKIN, R.E., MEYER, D.J. 2003. Atlas de citologia de cães e gatos. São Paulo: Roca.
353 354p.
- 354 RIBEIRO, A.P.; BRITO, F.L.C.; MARTINS, B.C.. et al. Qualitative and quantitative tear film
355 abnormalities in dogs. *Cienc. Rural.* v.38, n.2, p. 568-575, 2008.
- 356 RITO, I. Q. S. Utilização da citologia conjuntival no diagnóstico de doenças oculares. 100f.
357 2009. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina
358 Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- 359 ROCHA, N. S.; BURINI, C. H. P.; LIMA, L. S. A., et al. Citologia de impressão da
360 conjuntiva ocular do homem e do cão. *Rev. bras. med. vet.*, v.24, n.20, p.58-60, 2002.
- 361 SAMPAIO, I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte:
362 Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 221p.
- 363 SANTOS, L. G.F.; ALMEIDA, A.B.F.; SILVA, M. C., et al. Microbiota conjuntival de cães
364 hígidos e com afecções oftálmicas. *Acta Sci Vet.* v.37, n.2, p.165-169, 2009.
- 365 SLATTER D. 2005. Fundamentos de oftalmologia veterinária. Roca, São Paulo. 628p.
- 366 SOLARI, H. P.; SOUSA, L. B.; FREITAS, D., et al. *Arq. Bras. Oftalmol.* Características
367 laboratoriais das ceratites e conjuntivites causadas por *Streptococcus* sp., v.67, n.5, p.781-784,
368 2004.
- 369 TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. 2010. Microbiologia. Artmed, Porto Alegre.
370 964p.
- 371 URBAN, M.; WYMAN, M.; RHEINS, M.; MARRARO, R.V. Conjunctival flora of clinically
372 normal dogs. *J Am Vet Med Assoc* v.161, p.201-207, 1972.

- 373 YAGMUR, M.; ERSÖZ, C.; ERSÖZ, T.R.; VARINLI, S. Brush technique in ocular surface
374 cytology. *Diagn Cytopathol.*v.17, n.2, p.88-91, 1997.
- 375 VENANCIO, S.A.S.; VIEIRA, A.B.; ALENCAR, N.X.; SOARES, A.M.B. Avaliação da
376 técnica de esfoliação com escova citológica para coleta de células conjuntivais em gatos
377 sadios: comparação entre a face palpebral da membrana nictitante e a conjuntiva palpebral.
378 *Pesq.Vet. Bras.* v.32, n.11, p.1199-1204, 2012.
- 379 VERNEUIL, M.; DURAND, B.; MARCON, C.; GUILLOT, J. Conjunctival and cutaneous
380 fungal flora in clinically normal dogs in Southern France. *J Mycol Med.* v.24, p.25-28, 2014.
- 381 WANG, L.; PAN, O.; XUE, L. Z. Q., et al. Investigation of bacterial microorganisms in the
382 conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China.
383 *Vet Ophthalmol*, v.11, n.3, p.145-149, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL VETERINÁRIO

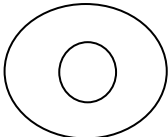
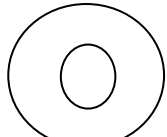
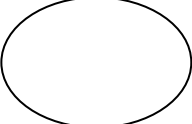
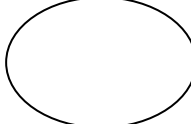
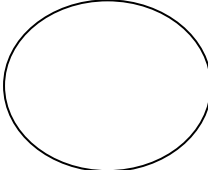
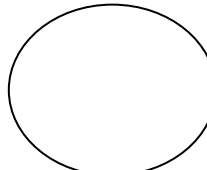
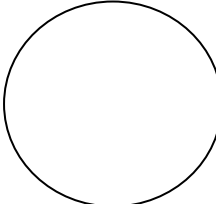
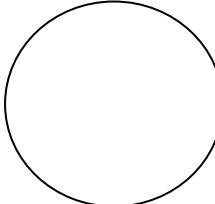
FICHA DE EXAME OFTALMOLÓGICO

DADOS DO RESPONSÁVEL	
Nome	CPF
Endereço	Cidade
Telefone fixo ()	Celular ()

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL					
Nome	Espécie	Raça	Sexo	Idade	Peso
Pelagem			Procedência		

HISTÓRICO

OLHO DIREITO	OLHO ESQUERDO
REFLEXOS: <input type="checkbox"/> Ameaça <input type="checkbox"/> Ofuscamento <input type="checkbox"/> Pupilar Direto <input type="checkbox"/> Pupilar Consensual <input type="checkbox"/> Teste do Algodão	REFLEXOS: <input type="checkbox"/> Ameaça <input type="checkbox"/> Ofuscamento <input type="checkbox"/> Pupilar Direto <input type="checkbox"/> Pupilar Consensual <input type="checkbox"/> Teste do Algodão
Tempo de Schirmer um: _____ mm/min Tempo de Schimer dois: _____ mm/min	Tempo de Schimer um: _____ mm/min Tempo de Schimer dois: _____ mm/min
PIO:	PIO:
Microbiologia () Citologia ()	Microbiologia () Citologia ()
Pálpebras e Conjuntiva	Pálpebras e Conjuntiva
OLHO DIREITO	OLHO ESQUERDO
Aparelho lacrimal	Aparelho lacrimal

Câmara anterior	Câmara anterior
Pupila e Íris 	Pupila e Íris 
Cristalino 	Cristalino 
Córnea 	Córnea 
Fluoresceína: Rosa Bengala:	Fluoresceína: Rosa Bengala:
Vítreo	Vítreo
Retina 	Retina: 
Diagnóstico:	Tratamento:
<u>Retorno</u> Data: ___/___/___	



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
HOSPITAL VETERINÁRIO

FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO

Data ____/____/____
 Paciente _____ Espécie _____ Raça _____ Peso _____
 Sexo _____ Pelagem _____ Idade _____
 Tutor _____
 Endereço _____
 _____ Tel _____

ANAMNESE

ANAMNESE FISIOLÓGICA

Habitat:	Alimentação:
Higiene:	Ectoparasitas:
Disseminação:	Vacinação:
Contactantes:	
Doenças prévias:	
Animal Castrado: () Não () sim Data _____ Idade no momento da castração: _____	

EXAME FÍSICO

Apresentação:	Temperamento:	Escore corporal:
T ⁰	FC	FR
Mucosas:		
Linfonodos:		
ACP:	TPC:	Hidratação:
PA:		Pulso:

EXAME FÍSICO ESPECÍFICO

Sistema Cardiovascular:
Sistema Respiratório:
Sistema Digestivo:
Sistema Musculoesquelético
Sistema Nervoso:
Sistema Genito-urinário

Olhos e anexos:
Ouvido e anexos:
Pele:

EXAMES COMPLEMENTARES

Diagnóstico Definitivo:

TRATAMENTO

Retorno: / /	Médico Veterinário:
Conduas para o retorno:	