



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

LUANA PAES DE AGUIAR MOTA

Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra

Brasília/DF

Agosto/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

LUANA PAES DE AGUIAR MOTA

Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Curso de Saúde Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Animal.

Área de concentração: Clínica Médica e Cirurgia Animal

Linha de Pesquisa: Métodos de diagnóstico e tratamento de afecções dos animais domésticos e silvestres.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Diniz Galera

Brasília/DF

Agosto/2014

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MOTA, L. P. A. Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 45p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizada reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrita do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

Mota, Luana Paes de Aguiar

Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra. Luana Paes de Aguiar Mota, orientação de Paula Diniz Galera. Brasília, 2014. 45p.: il. Dissertação de mestrado (M) - Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. Protrusão da glândula da terceira pálpebra em cães 2. *STEPanizer* 3. Células caliciformes 4. Teste de Cristalização do Filme Lacrimal

I. MOTA,L.P.A. II. Título

Nome: MOTA, Luana Paes de Aguiar

Título: Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Saúde Animal.

Aprovada em 29 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Paula Diniz Galera, DOUTORA – Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada Assinatura: [assinatura]

Prof.^a Arianne Pontes Oria, DOUTORA – Universidade Federal da Bahia

Julgamento: Aprovada Assinatura: [assinatura]

Prof.^o Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'ana, DOUTOR – Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADA Assinatura: [assinatura]

Local da defesa: Auditório do Programa de Pós-Graduação em Agronegócios da Universidade de Brasília.

Brasília/DF

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando Augusto Paes e Sonia Maria Almeida de Aguiar, que sempre acreditaram no meu potencial e torcem por mim incondicionalmente. À minha irmã Marina de Aguiar Paes por todo amor e companheirismo e ao meu marido Gabriel Guido Mota pelo apoio e amor de todos os dias. Que este trabalho faça parte da evolução que levará ao bem estar clínico definitivo dos nossos queridos pacientes oftálmicos.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço primeiramente a Deus por toda a força e saúde que me pertence, aos meus familiares e amigos pela compreensão e carinho, aos queridos professores e amigos Paula Diniz Galera, Eduardo Maurício Mendes de Lima e Concepta Connie McManus pela orientação e prestatividade; aos colegas Rômulo Vitelli Rocha Peixoto, André Leonardo e Letícia Batelli de Oliveira pelo apoio na execução do trabalho, às amigas Maria Luiza de Melo Dias, Fernanda Sousa Natividade, Clarissa Rocha dos Santos e Mayara Cauper pelo apoio e compreensão rotineiros e aos proprietários e pacientes que compuseram este estudo.

EPÍGRAFE

Se quiseres conhecer uma pessoa,
não lhe pergunte o que pensa, mas
sim o que ama.

(SANTO AGOSTINHO)

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O presente trabalho foi um estudo abrangente e optou-se por dividi-lo em dois artigos. O primeiro redigido e formatado segundo as normas de submissão para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Brazilian Journal of Veterinary Research, ISSN: 0100-736X; Fator de impacto 0.51, Qualis A2) e o segundo, redigido e formatado segundo as normas de submissão para publicação da revista *Veterinary Ophthalmology* (Fator de impacto 0.959, ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 66/143 (Veterinary Sciences) Online ISSN: 1463-5224).

SUMÁRIO

ARTIGO 1

INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÕES.....	14
REFERÊNCIAS.....	14
LEGENDAS DAS FIGURAS.....	15
QUADROS.....	16

ARTIGO 2

INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXOS.....	37

ARTIGO 1

Validação do programa *STEPanizer*® *stereology tool version 1.0* como ferramenta para classificação do teste de cristalização da lágrima em cães¹Luana P.A. Mota², Concepta C. McManus² e Paula D. Galera^{2*}

RESUMO.-Mota, L. P. A.,McManus C.C. & Galera P.D. 2014. **Validação do programa *STEPanizer*® *stereology tool version 1.0* como ferramenta para classificação do teste de cristalização da lágrima em cães** 2014. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasília Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP:70330-050 Brasília/DF-Brasil. E-mail: dra.paulagalera@gmail.com

O teste de cristalização da lágrima (TCL) ainda não foi padronizado em cães. Este trabalho propõe padroniza-lo e validar o programa *STEPanizer*® *stereology tool version 1.0* como método de classificação complementar para o teste. Foram utilizados 31 cães (62 olhos), sem predominância de sexo ou raça, com idade média de $18,8 \pm 18,4$ meses. Dentre estes, 14 apresentavam a superfície ocular hígida e 17 apresentavam protrusão unilateral da glândula da terceira pálpebra. Foram realizados em todos os cães, testes de rotina para avaliar a higidez da superfície ocular. O TCL foi classificado de acordo com Rolando (1984) e pelo programa *STEPanizer*. Neste, testou-se a avaliação com 16, 25, 36, 49, 64, 81 e 100 pontos equidistantes de contagem, no sistema teste que fica sobreposto à imagem, correlacionando-os com a classificação segundo Rolando (1984). Os dados foram analisados com o software *Statistical Analysis System* (SAS®). Valores de maior correlação (r), $p < 0,05$, menor erro *mean square* (MSE) e maior coeficiente de determinação (R^2 ajustado) foram utilizados para definir o melhor número de pontos no *STEPanizer*. O TCL classificado segundo Rolando (1984) resultou, em média, tipo II para os animais hígidos e tipo III para os animais com protrusão da glândula da terceira pálpebra. A classificação do TCL utilizando o *STEPanizer* mostrou melhor correlação com a classificação de Rolando quando feita por meio da contagem com 100 pontos equidistantes (r - 0,9; MSE 0,38 e R^2 ajustado 0,81). A classificação para o TCL utilizando o *STEPanizer* mostrou-se objetiva e factível de ser empregada na rotina clínica, sendo útil como ferramenta de padronização para a classificação do TCL, feita segundo Rolando (1984).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: superfície ocular, filme lacrimal, osmolaridade, sistema de teste, protrusão da glândula da terceira pálpebra, análise estereológica.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP: 70910-900 Brasília/DF-Brasil. *Autor para correspondência: dra.paulagalera@gmail.com

ABSTRACT.- Mota, L.P.A., EMM Lima, C.C. McManus & Galera P.D. 2014 [Validação do programa *STEPanizer*© *stereology tool version 1.0* como ferramenta para classificação do teste de cristalização da lágrima em cães.] *STEPanizer* © Stereology tool version 1.0 as a classification tool for Tear Ferning Test in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research 00 (0): 00- 00*. Agronomy and Veterinary Medicine Faculty, Brasilia University, Federal District, Brasilia Campus Darcy Ribeiro, CEP: 70330-050 Brasilia / DF, Brazil. E-mail: dra.paulagalera@gmail.com

The tear ferning test (FT) has no standard in dogs. This paper proposes this standardization it and validation using the *STEPanizer* © Stereology tool version 1.0 program (*STEPanizer*) as a complementary classification method for the test. Thirty one dogs (62 eyes) of no predominant sex or breed, with an average age of 18.8 ± 18.4 months were used. Among these, 14 had a healthy ocular surface and 17 had a unilateral third eyelid gland protrusion. Routine tests for evaluating the health of the ocular surface were performed on all dogs. The FT was classified according to Rolando (1984) and by the *STEPanizer* program. The *STEPanizer* uses a test system with equidistant points overlaid on the analyzed image. A total of 16, 25, 36, 49, 64, 81 and 100 equidistant points were evaluated, correlating them with the Rolando (1984) classification. Data were analyzed with the Statistical Analysis System (SAS®) software. Higher correlation (r) coefficients, $p < 0.05$, lower mean square error (MSE) and higher adjusted R^2 were used to define the best number of points. Healthy animals showed, on average, FT classification according Rolando (1984) of Type II in healthy animals and Type III in animals with third eyelid gland protrusion. The FT regression on *STEPanizer* using 100 equidistant points ($r = 0.9$; MSE 0.38 and adjusted R^2 0.81) showed the highest correlation with Rolando (1984) classification. The FT classification using *STEPanizer* proved to be objective and feasible for use in clinical routine, being useful as a standardized tool for the FT Rolando (1984) classification.

INDEX TERMS: eye, ocular surface, validation, Rolando (1984), test system, third eyelid gland protrusion.

¹ Received

Publication acceptance

² Agronomy and Veterinary Medicine Faculty, Brasilia University, Campus Darcy Ribeiro, CEP: 70910-900 Brasilia / DF, Brazil. * Correspondence author: dra.paulagalera@gmail.com

INTRODUÇÃO

A superfície ocular pode ser compreendida como uma Unidade Lacrimal Funcional (ULF), que inclui o filme lacrimal, as glândulas lacrimais (principal e acessórias, glândulas meibomianas, células caliciformes e todas as células secretoras da superfície ocular), as vias de escoamento lacrimais, os epitélios da córnea e da conjuntiva e as vias nervosas eferentes, aferentes e motoras - todos em harmonia para manutenção do filme lacrimal, proporcionando proteção e transparência para a córnea e a integridade da superfície ocular (Baudouin et al. 2013).

Um filme lacrimal pré corneano (FLPC) estável tem papel vital na manutenção da qualidade visual e na sanidade da superfície ocular. Portanto, modificações do FLPC possuem efeitos diretos no conforto ocular e visual. A osmolaridade do FLPC tem sido considerada padrão-ouro no diagnóstico da síndrome do olho seco (Johnson & Murphy 2004).

Estudo recente sobre a avaliação da osmolaridade direta do FLPC em humanos mostrou sensibilidade de 72,8%, especificidade de 92% e valor preditivo positivo de 87%; confirmando sua importância no diagnóstico (Benelli et al. 2010).

Apesar de ser útil no diagnóstico do olho seco, a aferição direta da osmolaridade do filme lacrimal requer instrumentação especializada, incomum na rotina clínica. O teste de cristalização do filme lacrimal (TCL) é um teste clínico simples, rápido e barato, que pode indicar as propriedades bioquímicas do filme lacrimal, ou seja, sua osmolaridade indireta (Bitton 2007, Masmali, Murphy & Purslow 2014). Estudos (Horwatha et al. 2001, Felberg et al. 2008, Mcginnigle S., Naroo S.A. & Eperjesi 2012) mostram que a reação de cristalização é causada por uma interação entre eletrólitos (sais inorgânicos) e macromoléculas (proteínas e mucopolissacarídeos), sendo que diferentes padrões de cristalização são relacionados a diferenças na concentração dos sais e à relações alteradas entre os eletrólitos e as macromoléculas. O TCL, embora utilizado na prática oftalmológica em seres humanos, não é padronizado para as diversas espécies animais. Rolando (1984) classificou quatro tipos de cristalização da lágrima humana, de acordo com os padrões de proximidade e de ramificações dos cristais, que variam entre o tipo I e IV, onde o tipo I indica uma superfície ocular saudável, que vai sendo deteriorada até o tipo IV (Masmali, Murphy & Purslow 2014). Como a classificação do TCL proposta por Rolando (1984) é subjetiva (Masmali, Murphy & Purslow 2014), sugere-se sua correlação com uma classificação objetiva, baseada na análise estereológica das imagens da lágrima cristalizada. O programa *STEPanizer* © *stereology tool version 1.0* (*STEPanizer*) possibilita a classificação precisa da ramificação dos cristais.

O *STEPanizer* é um software livre e de fácil acesso (www.STEPanizer.com) para ser utilizado como ferramenta de avaliação estereológica de imagens digitalmente capturadas, tanto as microscópicas (microscopia de luz, microscopia de varredura a laser e microscopia eletrônica de transmissão), como as macroscópicas (radiologia, tomografia). O software é compacto e possibilita a criação de sistemas de teste sobrepostos à imagens digitais, permitindo a exportação dos dados gerados para programas de planilha, como o Microsoft Office Excel. Sendo assim, possibilita a conversão dos pontos contados em resultados estatisticamente relevantes ao estudo em questão. Logo, foi desenvolvido como ferramenta simples para fornecer a análise estereológica imparcial de imagens digitalmente adquiridas. A maioria dos programas comerciais de análise estereológica focam em microscopia de luz, mas o *STEPanizer* pode ser utilizado com imagens de qualquer fonte, sendo particularmente útil em microscopia eletrônica (Tschanz, Burri & Weibel 2011). Dados quantitativos obtidos por meio da estereologia baseada em imagem podem adicionar informações valiosas para estudos realizados em diversos órgãos, em especial, quando correlacionados com dados bioquímicos e fisiológicos funcionais (Tschanz, Schneider & Knudsen 2014). Como exemplo, o programa tem sido recentemente utilizado para quantificar o nível de infecção tecidual e a colonização por patógenos em raízes de plantas (Ruiz-Gomez et al. 2012), para contagem de macrófagos provenientes de lavado bronco-alveolar e de fragmentos ultrafinos de tecido pulmonar em ratos com doença pulmonar obstrutiva crônica (Geiser et al. 2013), para quantificar propriedades estruturais da neve (Riche, Schneebeli & Tschanz 2012), para estimar as características mais importantes da vasculatura cardíaca (Muhlfeld 2014) e para estimar a densidade de esteatose hepática em ratos (Ornellas et al. 2013, Oliveira et al. 2014).

Diante da importância das propriedades do filme lacrimal para a manutenção da integridade ocular objetivou-se padronizar o teste de cristalização em cães e validar o programa *STEPanizer* © *stereology tool version 1.0* como método de classificação complementar para o teste.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em pacientes provenientes do Serviço de Oftalmologia e Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Foram incluídos neste estudo 31 cães (62 olhos), sendo 15 fêmeas e 16 machos. Desses, 14 apresentavam a superfície ocular hígida, sendo nove cães sem raça definida (SRD), três da raça Shih-Tzu, um Dachshund e um Pinscher. Os 17 animais restantes apresentavam protrusão unilateral da glândula da terceira pálpebra, sendo cinco sem raça definida (SRD) e os demais das seguintes raças: dois BullDogues Ingleses, quatro

Lhasa Apsos, três Shih-Tzus, um Maltês, um Dálmata e um Beagle. A idade média dos animais incluídos foi de $18,8 \pm 18,4$ meses. Todos os pacientes foram incluídos mediante aquiescência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos proprietários. O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-IB/UnB), sob o protocolo: UnB-DOC 17776/2012.

Todos os cães foram submetidos ao Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Teste de Schirmer Ophthalmos[®], São Paulo/SP) (Maggs 2013, Barabinoa, Chena & Dana 2004), ao Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) (Rorig 2009), ao teste de coloração com fluorosceína (FLUO) (Fluoresceína Strips Ophthalmos[®], São Paulo/SP) (Módis & Szalai 2011, Baudouin et al. 2013), à tonometria de aplanção (Tono-pen[®] XL Tonometer Medtronic Solan) e biomicroscopia em lâmpada de fenda.

Após sua inclusão no grupo hígido, cada animal foi submetido ao TCL em dia diferente ao dos testes iniciais. A lágrima foi colhida com o auxílio de um tubo microcapilar, a partir do menisco lateral inferior de ambos os olhos. O conteúdo do microcapilar foi retirado do mesmo com auxílio de uma seringa agulhada de três mililitros, cuidadosamente depositado na superfície de uma lâmina de vidro, deixando-se secar à temperatura ambiente (21°C) por 30 minutos. Ato contínuo, a leitura da mesma quanto ao padrão de cristalização foi realizada com auxílio de um microscópio de luz no aumento de 10x (Rolando 1984).

A classificação dos cristais foi realizada por meio de duas análises, sendo a primeira de acordo com o proposto por Rolando (1984) (Fig. 1); e a segunda, utilizando-se o *STEPanizer*. As imagens avaliadas para as duas classificações foram as mesmas.

Para validação do sistema de testes do *STEPanizer*, avaliou-se a melhor contagem entre 16 e 100 pontos. Assim, foi realizada a contagem dos pontos, para cada imagem, utilizando o sistema teste com 16, 25, 36, 49, 64, 81 e 100 pontos equidistantes.

Cada ponto do sistema de teste é um círculo dividido internamente em quadrantes. Para que a contagem seja mais sensível, escolhe-se um determinado quadrante e conta o ponto como positivo se a imagem do cristal estiver dentro do quadrante escolhido. Neste estudo o quadrante inferior esquerdo foi o escolhido (Fig. 2).

Os dados obtidos foram analisados por meio do software Statistical Analysis System (SAS v.9.3, Cary, North Carolina). Foi realizada análise de variância (GLIMMIX) e a correlação do TCL classificado de acordo com o *STEPanizer* para determinar qual sistema teste (16 a 100 pontos equidistantes) deveria ser utilizado. A relação entre o resultado com a melhor quantidade de pontos no sistema teste e a classificação segundo Rolando (1984) foi então utilizada para realizar a análise de variância (GLIMMIX), a correlação de Spearman e a regressão linear. Valores de maior correlação (r), $p < 0,05$, menor erro *mean square* (MSE) e maior coeficiente de determinação (R^2 ajustado) foram considerados na escolha do melhor número de pontos a ser utilizados no *STEPanizer*.

RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre sexo, raça e idade dos animais avaliados. As médias dos valores de classificação do TCL segundo Rolando (1984) foram de $2,10 \pm 0,91$ para os animais hígidos, ou seja, tipo II; e $2,85 \pm 0,70$ para os animais com protrusão da glândula da terceira pálpebra, ou seja, tipo III.

A melhor correlação entre as duas formas de classificação do TCL foi a do sistema de teste com 100 pontos equidistantes ($r = 0,90$) (Quadro 1).

A análise de variância com menor erro (MSE 0.38) e maior coeficiente de determinação (R^2 ajustado 0.81) também foi a do sistema de teste com 100 pontos equidistantes ($r = 0,90$) (Quadro 2).

Houve alta correlação da classificação feita pelo proposto por Rolando (1984) e pelo sistema de teste com 100 pontos equidistantes do *STEPanizer* ($r = 0,92$ e $p < 0,0001$). Assim como, na análise de variância o erro foi baixo (MSE 0.14) e o R^2 alto (R^2 ajustado 0.81 e $p < 0,0001$).

A Regressão linear do TCL classificado de acordo com Rolando (1984) e com o sistema de teste de 100 pontos do *STEPanizer* (Quadro 3) possibilitou o estabelecimento da seguinte fórmula:

$$\text{Classificação segundo Rolando (1984)} = 5,37 - (0,04 \times \text{STEPanizer})$$

DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstraram uma relação significativa entre o aumento da osmolaridade da lágrima e a gravidade da doença ocular que leva à síndrome do olho seco, o que reforça a importância de se avaliar a osmolaridade do FLPC no exame oftálmico (Módis & Szalai 2011). O TCL é considerado um método de aferição indireta da osmolaridade lacrimal. No presente estudo, os resultados do teste classificados de acordo com Rolando (1984) foram, em média, do Tipo II para cães sem alterações da superfície ocular e, em média, do Tipo III para animais com protrusão da glândula da terceira pálpebra. O valor encontrado para os animais hígidos, corresponde a valor considerado normal para seres humanos (Rolando 1984). Já o valor encontrado para os

animais com protrusão da glândula da terceira pálpebra, corresponde a um valor deficiente, comparativamente à classificação utilizada para seres humanos (Rolando 1984).

A padronização do TCL em seres humanos, desenvolvida por Rolando (1984), não fora inicialmente utilizada como instrumento de classificação padrão reprodutível. Surgiu a partir de observações onde os tipos I e II foram encontrados na maioria dos olhos normais, enquanto que os tipos III e IV foram encontrados em pessoas com ceratoconjuntivite seca (Masmali, Murphy & Purslow 2014). A principal dificuldade com o uso da escala de Rolando (1984) está na categorização dos tipos I e II, onde o teste se mostra subjetivo em relação ao avaliador. Se o uso do teste faz parte do exame clínico de rotina do filme lacrimal, é importante ter uma escala bem desenvolvida, de forma a atender às necessidades do clínico (Masmali, Murphy & Purslow 2014). Além disso, o objetivo de um teste é ser útil clinicamente e, sempre que possível, o uso de imagens digitais permite uma classificação imparcial e uma avaliação mais consistente do olho em um ambiente clínico, dispensando a consultoria com técnicos experientes e tornando possível um diagnóstico mais exato (McGinnigle S., Naroo S.A. & Eperjesi 2012).

Diante disto, propôs-se, não apenas realizar o TCL em cães, mas associá-lo ao programa *STEPanizer*, validando-o e conferindo objetividade à avaliação do TCL. Foi realizada a validação do melhor sistema teste de pontos equidistantes do *STEPanizer*, onde a melhor correlação com a classificação de Rolando (1984) foi o do sistema teste com 100 pontos equidistantes por campo ($r = -0.90$) (Quadro 1). O sistema com 100 pontos também se mostrou a melhor opção de contagem na análise de variância (Quadro 2), pois foi a opção com menor erro (MSE 0.38) e maior R^2 ajustado (0.81). Sendo assim ficou determinado que o melhor sistema teste de pontos do *STEPanizer* para classificar o TCL é o de 100 pontos equidistantes. Deve-se ressaltar que os sistemas com 81, 49, 64, 25, 16 e 36 pontos equidistantes, de forma decrescente, também foram significativos (Quadros 1 e 2), sendo o com 100 pontos, o melhor.

Ao correlacionar a classificação do TCL de acordo com Rolando (1984) e a de acordo com o *STEPanizer* 100 pontos, verificou-se alta correlação ($r = 0.92$ e $p < 0,0001$), reforçada pela análise de variância (MSE 0,14; R^2 ajustado 0,81 e $p < 0,0001$) (Quadros 1 e 2). A fig. 3 mostra esta alta correlação de ambas as classificações, que são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a contagem de pontos pelo *STEPanizer*, menor o tipo de cristalização na classificação segundo Rolando (1984).

A classificação baseada na contagem dos pontos feita pelo *STEPanizer* permite que diferentes avaliadores possam classificar a cristalização da mesma lágrima, sem desvios de interpretação, problema já relatado quando a classificação é feita pelo sistema de Rolando (1984) (Masmali, Murphy & Purslow 2014). A análise pelo programa é simples e rápida, requerendo apenas computador e microscópio de luz com câmera. Adicionalmente, por meio da regressão linear (Quadro 3), pode-se inferir o tipo de classificação do TCL segundo Rolando (1984), a partir dos pontos contados no *STEPanizer*, utilizando-se a fórmula elaborada a partir do Quadro 3.

CONCLUSÕES

A análise pelo *STEPanizer* é um método objetivo e factível de ser empregado na rotina clínica oftalmológica de cães, sendo mais um instrumento de avaliação da superfície ocular, especialmente quando associado ao TCL proposto por Rolando (1984), dotado de subjetividade.

Estudos futuros com maior número de animais possibilitaria uma melhor padronização do teste de cristalização em cães.

REFERÊNCIAS

- Baudouin C., Aragona P., Messmer E. M., Tomlinson A., Calonge M., Boboridis K.G., Akova Y.A., Geerling G., Labetoulle M. & Rolando M. 2013. Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. *The ocular surface*. 11: 246-258.
- Barabinoa, S.; Chena, W. & Dana, M.R. 2004. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Experimental Eye Research*. 79: 613-621.
- Benelli, U.; Nardi, M.; Posarelli, C. & Albert, T.G. 2010. Tear osmolarity measurement using the TearLab™ Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness. *Contact Lens & Anterior Eye*. 33: 61-67.
- Bitton, E.; Keech, A.; Jones, L. & Simpson, T. 2008. Subjective and Objective Variation of the Tear Film Pre- and Post-Sleep. *Optometry and Vision Science*. 85: 740-749.
- Felberg, S.; Cordeiro, H.; Sato, E.H.; Filho, D.M.; Nishiwaki-Dantas, M.C.; Endo, R.M. & Dantas, P. E. C. 2008. Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjögren. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 71: 228-33.

- Geiser M., Qualie O., Wenk A., Wigge C., Eigeldinger-Berthou S., Hirn S, Schäffler M., Schleh C., Möller W., Mall M.A. & Kreyling W.G. 2013. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. *Particle and Fibre Toxicology*. 10:19.
- Horwatha, J.; Ettingerb, K.; Bachernegea, M.; Bodnera, E. & Schmuta, O. 2001. Ocular Ferning Test – Effect of Temperature and Humidity on Tear Ferning Patterns. *Ophthalmologica*. 215: 102 –107.
- Johnson, M.E. & Murphya, P.J. 2004. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in Retinal and Eye Research*. 23: 449–474.
- Maggs, D.J. 2013. Third eyelid, p. 159-164. In: Maggs, D.J., Miller P.E. & Ofri R. (Eds), *Slatter’s Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 5th ed. Saunders Company, Missouri. 512 p.
- Masmali A.M., Murphy P.J. & Purslow C. 2014. Development of a new grading scale for tear ferning. *Contact Lens & Anterior Eye*. 37: 178-184.
- McGinnigle S., Naroo S.A. & Eperjesi F. 2012 Evaluation of Dry Eye. *Survey of Ophthalmology*. 57: 293-316.
- Módis L. & Szalai E. 2011. Dry eye diagnosis and management. *Expert Review of Ophthalmology*. 6: 67.
- Mühlfeld C. 2014. Quantitative morphology of the vascularisation of organs: A stereological approach illustrated using the cardiac circulation. *Annals of Anatomy*. 196: 12– 19.
- Oliveira L.S.C., Santos D.A., Barbosa-da-Silva S., Mandarim-de-Lacerda C.A., Aguila M.B. 2014. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 25: 193–200.
- Ornellas F., Mello V.S., Mandarim-de-Lacerda C.A. & Aguila M.B. 2013. Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers *Life Sciences*. 93: 454–463.
- Riche F., Schneebeli M. & Tschanz S.A. 2012. Design-based stereology to quantify structural properties of artificial and natural snow using thin sections. *Cold Regions Science and Technology*. 79: 67–74.
- Rolando M. 1984.: Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret International journal of ophthalmology*. 2: 32-41.
- Rorig M. C. L. 2009. Uso de pimecrolimus 0,5% no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 72p.
- Ruiz-Gómez FJ, Sánchez-Cuesta R., Navarro-Cerrillo R.M. & Pérez-de-Luque A. 2012. A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Methods*. 8: 39.
- Tschanz S.A., Burri P.H. & Weibel E.R. 2011. A simple tool for stereological assessment of digital images: the *STEPanizer*. *Journal of Microscopy*, 243: 47–59.
- Tschanz S., Schneider J.P. & Knudsen L. 2014. Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Annals of Anatomy*. 196: 3– 11.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig.1. Imagens fotográficas de cristalização da lágrima (aumento 10x), exemplificando a classificação segundo Rolando (1984). **A.** Tipo I: cristal compacto, com ramificação uniforme e pouco espaço entre os cristais. **B.** Tipo II: os ramos dos cristais tornam-se menos numerosas e menores, não há grande espaço entre os ramos. **C.** Tipo III: os ramos dos cristais são significativamente reduzidos e o espaço entre eles é grande. **D.** Tipo IV: o fenômeno de cristalização é raro ou ausente, com formas atípicas de cristais.

Fig.2. Imagem fotográfica demonstrando o uso do programa *STEPanizer® stereology tool, version 1.0*. Observa-se imagem de cristalização da lágrima, no aumento de 10x, com 100 pontos equidistantes sobrepostos em um campo delimitado (A), onde cada ponto é dividido em quadrantes (B). A contagem é realizada pela presença de cristal no quadrante escolhido de cada ponto. Neste estudo, foram contados os cristais presentes no quadrante inferior esquerdo (seta). Assim, o resultado pode ser no máximo 100 e no mínimo 0 pontos.

Fig.3. Plotagem dos dados do TCL classificado de acordo com Rolando (1984) e com o sistema de teste de 100 pontos do *STEPanizer*.

QUADROS

Quadro 1. Correlação do TCL classificado de acordo com Rolando (1984) e de acordo com o sistema de teste do *STEPanizer* com 16, 25, 36, 49, 64, 81 e 100 pontos equidistantes

	STEP16	STEP25	STEP36	STEP49	STEP64	STEP81	STEP100
Rolando	-0.83	-0.84	-0.77	-0.88	-0.84	-0.88	-0.90

*Todos os valores de $p < 0.0001$

Quadro 2. Análise de variância entre o TCL classificado de acordo com Rolando (1984) e os sistemas de teste do *STEPanizer* nos pontos 16, 25, 36, 49, 64, 81 e 100

	STEP16	STEP25	STEP36	STEP49	STEP64	STEP81	STEP100
MSE	0.49	0.47	0.56	0.41	0.47	0.40	0.38
R² aj.	0.68	0.71	0.59	0.78	0.70	0.78	0.81

*Todos os valores de $p < 0.0001$

Quadro 3. Regressão linear do TCL classificado de acordo com Rolando (1984) e com o sistema de teste de 100 pontos do *STEPanizer*

Rolando (1984)	N Obs	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
1	10	96,5	95,8	3,45	90	100
2	16	85,5	84,5	3,91	74	89
3	30	61	61,4	10,48	39	78
4	6	33,5	34,5	5,00	30	44

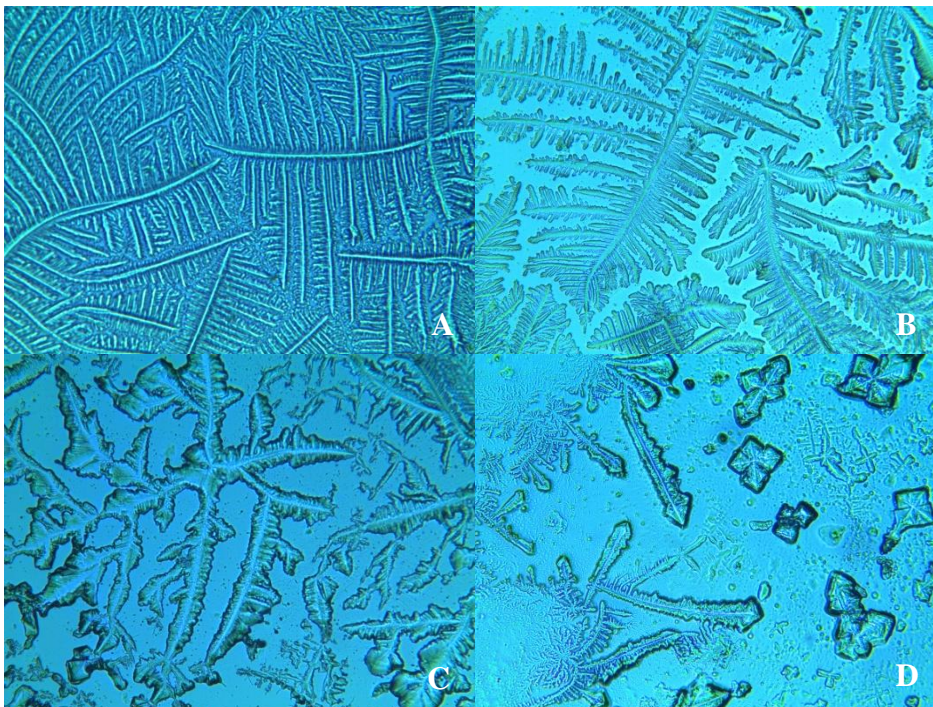


Figura 1

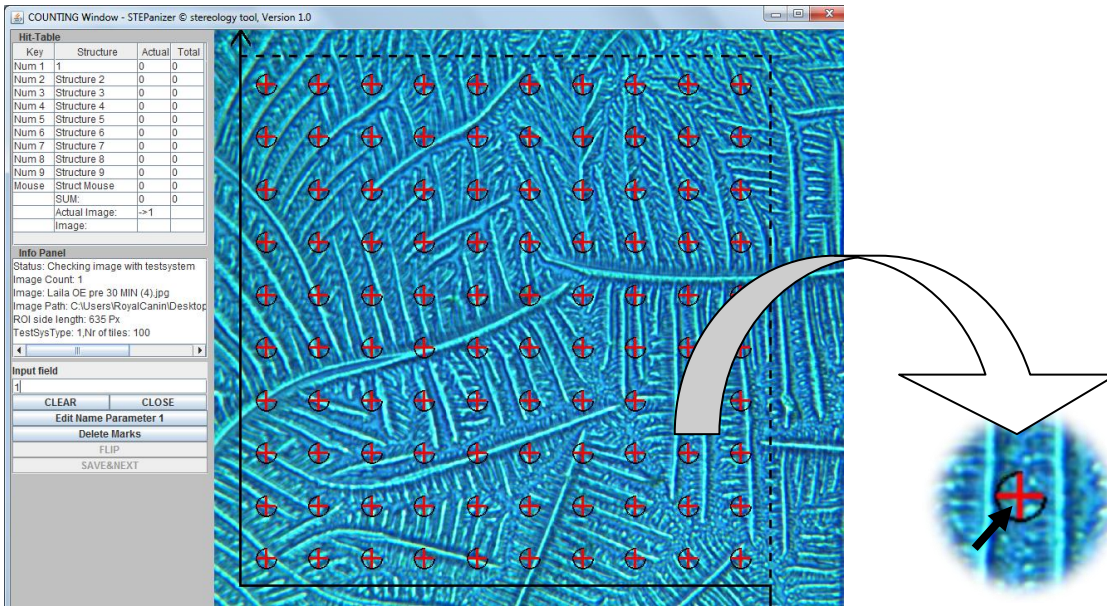


Figura 2

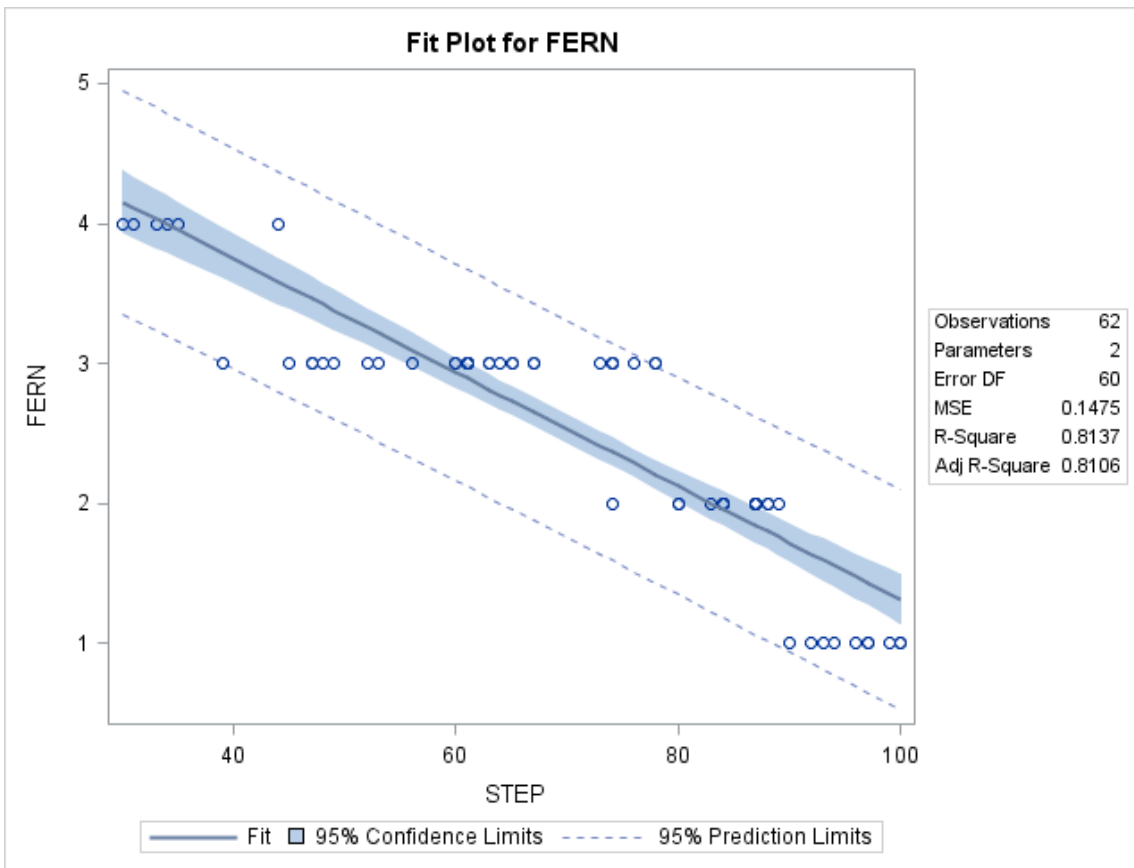


Figura 3

ARTIGO 2**Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra:
a importância da osmolaridade.**

Luana P. A. Mota^{*}, Rômulo V. R. Peixoto^{*}, Letícia B. de Oliveira^{*}, Janildo L.R. Junior^{*},
Concepta M. McManus[†] and Paula D. Galera^{*}

^{*}Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília Campus

Universitário Darcy Ribeiro, CEP:70330-050 Brasília/DF-Brasil

[†]Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Campus

Universitário Darcy Ribeiro, CEP: 70910-900 Brasília/DF-Brasil

Correspondências para:

P.D. Galera (dra.paulagalera@gmail.com)

Telefone: 055 61 3107 2845

RESUMO - Mota, L. P. A., Peixoto R.V.R., Oliveira L. V., Junior J.L.R., McManus C.C. and Galera P.D. 2014. **Avaliação da superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra: a importância da osmolaridade.** 2014. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasília Campus
Universitário Darcy Ribeiro, CEP:70330-050 Brasília/DF-Brasil. E-mail:
dra.paulagalera@gmail.com

Objetivo Avaliar a superfície ocular de cães com protrusão da glândula da terceira pálpebra, antes e após a cirurgia de reposicionamento da glândula, comparativamente a animais hígidos.

Animais vinte e sete cães, sendo 14 sem alterações de superfície ocular (grupo controle – GC) e 13 acometidos unilateralmente pela protrusão da glândula da terceira pálpebra (grupo afetado – GA), machos ou fêmeas, com idade média de $20,8 \pm 19$ meses.

Procedimentos Foram realizados, em todos os cães, o teste lacrimal de Schirmer (TLS); o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL); a coloração com fluoresceína (FLUO), a análise histopatológica do fórnix conjuntival (BIO) e o teste de cristalização da lagrima (TCL), classificado como o proposto por Rolando (1984) e por meio do programa *STEPanizer* © *Stereology tool version 1.0*. Sendo que no GA, os testes também foram realizados nos dias 7, 15, 30 e 60 após a reposição da glândula protruída. Os dados foram analisados com o software *Statistical Analysis System* (SAS ®). Valores de maior correlação (r), $p < 0.05$, menor erro *mean square* (MSE) e maior coeficiente de determinação (R^2 ajustado) foram considerados significativos.

Resultados Não se verificou diferença significativa para os testes TLS, TRFL e FLUO nem antes, nem após o procedimento de reposição da glândula. O TCL classificado de acordo com o *STEPanizer* mostrou piora significativa após o procedimento cirúrgico ($p < 0,001$), piora não significativa quando classificado de acordo com Rolando (1984). A classificação do TCL

pelo *STEPanizer* é altamente correlacionada com a de Rolando, tanto nos olhos dos animais hígidos ($r = 0,94$), como nos olhos afetados pela protrusão ($r = 0,91$). A concentração de células caliciformes por campo de grande aumento (400x) para os olhos do GC ($22,28 \pm 5,78$) foi significativamente maior do que no GA ($18,45 \pm 10,6$).

Conclusão O diagnóstico e a terapêutica cirúrgica precoce provavelmente evitaram os sinais característicos da cronicidade desta afecção sobre a superfície ocular dos animais deste estudo. A classificação do TCL utilizando o *STEPanizer*, mostrou-se mais sensível do que a de Rolando (1984). As alterações visualizadas no olho sem a protrusão foram as mesmas visualizadas no olho afetado pela protrusão, o que gera a hipótese de que a etiopatogenia da doença pode ter início com alterações de superfície ocular ainda não descritas em literatura.

Palavras-chave: etiopatogenia, teste de cristalização da lágrima, *STEPanizer*, células caliciformes, osmolaridade do filme lacrimal, tempo de ruptura do filme lacrimal.

ABSTRACT

Objective Evaluate third eyelid gland protrusion dogs ocular surface both before and after surgical repositioning of the gland, compared to healthy animals.

Animals Twenty-seven dogs, 14 with healthy ocular surface (control group - CG) and 13 unilaterally affected by third eyelid gland protrusion (affected group - AG), male or female, with a mean age of 20.8 ± 19 months.

Procedures In all dogs were performed the Schirmer tear test (STT); the breakup time of the tear film (BUT); the fluorescein staining (FLUO), the histopathological analysis of the conjunctival fornix (BIO) and the tear Ferning test (FT), classified as proposed by Rolando (1984) and with STEPanizer © Stereology tool version 1.0 program. On AG, the tests were also performed on 7, 15, 30 and 60 days after the gland replacement. Data were analyzed with the Statistical Analysis System software. Higher correlation values, $p < 0.05$, lower mean square error and higher determination coefficient were significant.

Results No statistical difference was found for STT, BUT and FLUO tests. FT classified using STEPanizer showed significant worse after surgery ($p < 0.001$), but no significant when classified according to Rolando (1984). On AG, changes in the eyes without protrusion were the same displayed in the affected eyes.

Conclusion Early diagnosis and surgical therapy of affected dogs prevented chronic changes on their ocular surface. The FT rating using the STEPanizer was more sensitive than Rolando (1984) classification. It's assumed that the disease pathogenesis may begin with changes in ocular surface not previously described in the literature.

Keywords: pathogenesis, tear ferning test, STEPanizer, goblet cells, osmolarity of the tear film, tear film breakup time.

Introdução

O olho dos animais possui, no canto nasal, a terceira pálpebra ou membrana nictitante, composta pela glândula da terceira pálpebra, por uma cartilagem em forma de “T”, pelas conjuntivas bulbar e palpebral e por folículos linfóides que se localizam sobre a superfície bulbar, os quais possuem a função de produzir imunoglobulinas para o filme lacrimal de mamíferos domésticos.⁽¹⁾ A protrusão da glândula da terceira pálpebra é uma afecção comum em cães jovens e algumas raças são descritas como predispostas, a exemplo do Beagle, Cocker Spaniel Americano, Lhasa Apso, Pequinês e Bulldog Inglês.⁽²⁾ O tratamento é o reposicionamento da glândula, já que a remoção ou a permanência da glândula protruída, acarretam em diminuição da produção lacrimal, com o desenvolvimento da ceratoconjuntivite seca (CCS).^(3, 4, 5, 6)

A avaliação da superfície ocular deve combinar o resultado dos testes diagnósticos disponíveis aos sinais clínicos observados.⁽⁷⁾ Há inúmeros testes que avaliam a integridade da superfície ocular, dentre os mais utilizados, pode-se citar o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS),⁽⁸⁾ que mensura a porção aquosa do FLPC; o Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) do FLPC,^(7, 8, 9, 10) que verifica a estabilidade do filme lacrimal⁽¹¹⁾ e pode indicar deficiência indireta de mucina;⁽¹²⁾ o Teste de Cristalização da Lágrima (TCL), que permite a mensuração indireta da osmolaridade do FLPC.⁽¹³⁾ A aferição da osmolaridade do FLPC tem sido considerada como um biomarcador da gravidade da doença que afeta a superfície ocular,⁽¹⁴⁾ visto que a hiperosmolaridade induz a expressão e produção de citocinas inflamatórias pelas células epiteliais da superfície ocular, de forma a desencadear apoptose nas células epiteliais e corneanas, incluindo as células caliciformes, secretoras de mucinas.^(4, 11, 15, 16, 17, 18)

Diante da importância das propriedades do filme lacrimal para a manutenção da integridade da superfície ocular objetivou-se, neste estudo, avaliar a superfície ocular de cães

com protrusão da glândula da terceira pálpebra, antes e após a cirurgia de reposicionamento da glândula, comparativamente a animais hígidos.

Material e Métodos

Animais

O estudo foi realizado em pacientes provenientes do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Foram incluídos neste estudo 27 cães (54 olhos), sendo 12 fêmeas e 15 machos. Os animais foram divididos em dois grupos, o grupo controle (GC) e o grupo afetado (GA). O GC foi composto por 14 cães, pacientes do serviço de Clínica Cirúrgica do referido hospital, que foram submetidos à cirurgia de castração eletiva (orquiectomia ou ovariossalpingohisterectomia). Eles apresentavam a superfície ocular sem alterações, sendo nove sem raça definida (SRD), três da raça Shih-Tzu, um Dachshund e um Pinscher. Já o GA foi composto por 13 cães, pacientes do Serviço de Oftalmologia do referido hospital, que apresentavam diagnóstico de protrusão unilateral da glândula da terceira pálpebra desde aproximadamente dois meses de idade. Dentre os animais do GA, três eram SRD, dois Bulldogues Ingleses, três Lhasa Apsos, dois Shih-Tzus, um Maltês, um Dálmata e um Beagle. A idade média do GC foi de $27,8 \pm 19,5$ meses e a do GA de $13,2 \pm 15,6$ meses. Todos os pacientes foram incluídos mediante aquiescência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos proprietários. O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-IB/UnB), sob o protocolo: UnB-DOC 17776/2012.

Avaliação da superfície ocular

Todos os animais foram submetidos à biomicroscopia em lâmpada de fenda (*Portable Slit lamp SL-15*®), Kowa, Califórnia, EUA), ao TLS^(3,8) (Teste de Schirmer Ophthalmos®), São Paulo/SP), ao TRFL,⁽¹²⁾ à coloração com fluoresceína (FLUO)^(18,19) (Fluoresceína Strips

Ophthalmos[®], São Paulo/SP) e à tonometria de aplanção (Tono-pen[®] XL Tonometer Medtronic Solan) para determinação dos parâmetros basais de cada cão. Estes testes também foram utilizados como testes de triagem para a inclusão dos animais no GC. Após a inclusão no grupo designado, cada animal foi submetido ao TCL. Nos dois grupos, ambos os olhos foram avaliados.

Também foi realizada a biópsia incisional do fórnix conjuntival inferior médio para contagem das células calciformes (BIO). Nos animais do GC, a BIO foi realizada apenas no olho esquerdo, no dia da cirurgia eletiva (ovariosalpingohisterectomia ou orquiectomia) e, para os animais do GA foi realizada em ambos os olhos, no dia do procedimento cirúrgico de reposição da glândula da terceira pálpebra.

No GC todos os testes foram realizados uma única vez (tempo -1). No GA, a BIO foi realizada apenas no tempo 0 e os testes restantes, na consulta inicial (tempo 0) e aos 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório.

A cirurgia de reposicionamento da glândula foi realizada sempre pelo mesmo cirurgião, empregando-se a técnica de Morgan pocket⁽²⁰⁾, com fio poliglactina 910, encastado de fábrica (Vycril[®] – Ethicon, São José dos Campos/São Paulo), calibre 5-0 ou 6-0, conforme o tamanho do animal. No pós-operatório imediato, administrou-se, por via intravenosa, succinato de hidrocortisona (Androcortil[®] – Teuto, Anápolis/Goiás), na dose única de 5mg/kg. Prescreveu-se o uso de colar elisabetano e a utilização tópica da pomada Epitezan[®] (Allergan, São Paulo/São Paulo) em intervalos de 12 horas, durante 10 dias consecutivos. Estes animais não foram submetidos a tratamento clínico pré-operatório.

Teste de cristalização do filme lacrimal (TCL)

Após sua inclusão no grupo, cada animal foi submetido ao TCL em dia posterior aos testes iniciais. A lágrima foi colhida com o auxílio de um tubo microcapilar, a partir do menisco lateral inferior de ambos os olhos. O conteúdo do microcapilar foi retirado do

mesmo com auxílio de uma seringa agulhada de três mililitros, cuidadosamente depositado na superfície de uma lâmina de vidro, deixando-se secar à temperatura ambiente (21°C) por 30 minutos. Ato contínuo, a leitura da mesma quanto ao padrão de cristalização foi realizada com auxílio de um microscópio de luz no aumento de 10x.

A classificação dos cristais foi realizada por meio de duas análises, sendo a primeira de acordo com o proposto por Rolando (1984)⁽²¹⁾; e a segunda, utilizando-se o programa *STEPanizer© stereology tool version 1.0 (STEPanizer)* com o sistema teste de 100 pontos por campo. As imagens avaliadas para as duas classificações foram as mesmas.

Análise histopatológica conjuntival (BIO)

A análise histopatológica foi realizada a partir de fragmento conjuntival de três milímetros de diâmetro, retirado cirurgicamente do fórnix conjuntival médio do olho esquerdo dos cães do CG e de ambos os olhos dos cães do GA, mediante anestesia geral, com o protocolo anestésico adequado ao animal e ao procedimento cirúrgico em questão. As amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% e processadas rotineiramente no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília – LPV/UnB, utilizando o *Periodic Acid Schiff* (PAS) para evidenciação das células caliciformes.

A contagem de células caliciformes foi estabelecida pela média entre o total de células visualizadas e o número de campos contados em maior aumento (400x), sendo contados, no máximo, dez campos. A contagem não foi realizada em campos aleatórios devido ao pequeno tamanho da amostra e foi executada a partir da borda da incisão, seguindo-se pelo epitélio conjuntival, de forma contínua.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do software Statistical Analysis System (SAS v.9.3, Cary, North Carolina). Foi realizada a estatística descritiva de ambos os olhos do

GC e de cada olho dos animais do GA, o afetado (a) e o contralateral (c). Foi realizada a análise de variância (GLIMMIX) e a correlação de Spearman entre ambos os olhos do GC, o olho direito (OD) e o esquerdo (OE); entre (a) e (c) no GA e entre (a) e os olhos do GC. Valores de maior correlação (r), $p < 0.05$, menor erro *mean square* (MSE) e maior coeficiente de determinação (R^2 ajustado) foram considerados significativos.

Resultados

Não houve diferença significativa entre sexo, raça e idade dos animais avaliados, em ambos os grupos. A estatística descritiva do GC é demonstrada na Tabela 1 e a do GA, na Tabela 6.

Grupo controle (GC)

A análise de variância realizada com os olhos do GC mostrou alto R^2 ajustado (0,78) e baixo erro (MSE 0,42) (Tabela 4). Ainda nestes animais, a correlação de Spearman demonstra que a classificação do TCL pelo *STEPanizer* é altamente correlacionada à classificação de acordo com Rolando (1984) ($r -0,94$) (Tabela 5).

Grupo afetado (GA)

No GA, ao se comparar o olho afetado com o contralateral, não houve diferença significativa para o TLS, o TCL classificado de acordo com Rolando (1984), o TRFL e a BIO ao longo do tempo, nem entre si (Tabela 7). Assim como, ao longo do tempo não houve diferença significativa em cada grupo de olho afetado ou contralateral, separadamente (Tabela 8). Já para o TCL classificado de acordo com o *STEPanizer*, houve piora significativa em relação ao tempo no grupo de olhos afetados (em todos os tempos de avaliação após o procedimento de reposição da glândula), mas não houve entre os olhos afetados e os contralaterais (Tabela 7 e 8).

Na análise de variância comparando o *STEPanizer* nos olhos do GC (-1) com os olhos afetados (a); no pré-operatório (0) e aos 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios (Tabela 12), os

animais do GA não apresentaram, no pré-operatório, sinais significativos de hiperosmolaridade indireta (TCL alterado) e nem deficiência de produção lacrimal, baseada nos testes realizados. Verificou-se, entretanto, que em todos os tempos após o procedimento de reposição da glândula da terceira pálpebra, houve piora significativa da classificação do TCL de acordo com o *STEPanizer* (Tabelas 10, 11 e 12 – passou de $77,3 \pm 17,49$ para $63,66 \pm 17,88$), tanto comparando apenas (a) no decorrer do tempo, como comparando (a) com os olhos do GC, piora também visualizada quando a classificação foi feita pelo sistema de Rolando (1984) (passou de tipo II, para tipo III), embora nesta última classificação não se tenha verificado significância estatística.

A correlação de Spearman demonstrou alta correlação da classificação do TCL pelo *STEPanizer* com a classificada de acordo com Rolando, tanto em (a) ($r = 0,91$), como em (c) ($r = 0,87$) (Tabela 9). Além disso, os testes comparando (a) com (c), mostraram alta correlação (Tabela 9) para o TLS ($r = 0,48$), o TCL classificado pelo *STEPanizer* ($r = 0,44$) e por Rolando ($r = 0,44$), o TRFL ($r = 0,41$) e a FLUO ($r = 0,57$), o que significa que ambos os olhos [(a) e (c)] variam de forma diretamente proporcional no mesmo animal.

Nenhum animal foi positivo ao teste FLUO, tampouco verificou-se diferença significativa entre o GC e o GA (Tabela 11). Entretanto, pode-se identificar uma tendência de impregnação com fluoresceína na córnea dos animais do GA (Tabela 10), demonstrada por impregnação em 38% do (a) no tempo 0, sendo que o valor padrão encontrado no GC foi de 0% de impregnação. Decorridos 60 dias do procedimento cirúrgico no GA, a porcentagem de impregnação caiu para 25 %.

A BIO resultou na concentração de $22,28 \pm 5,78$ células caliciformes por campo de grande aumento (400x) para o GC e $18,45 \pm 10,6$ para (a) (Tabela 10), denotando diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 11). Ao comparar, no mesmo animal do GA, (a) e (c); a média de (a) foi de $18,45 \pm 10,6$ e de (c) de $17,09 \pm 5,16$ células caliciformes por

campo de grande aumento (400x) (Tabela 6); mostrando ausência de diferença significativa entre eles (p 0.76 e r 0.16) (Tabelas 7 e 9).

Discussão

A análise bioquímica do filme lacrimal é complicada pelo escasso volume disponível e pela própria dinâmica e transparência inerentes ao FLPC. Médicos e cientistas reconhecem que a análise bioquímica da osmolaridade e a identificação de componentes-chave é o caminho a se seguir para avaliar a superfície ocular, mas os pequenos volumes fazem a análise bioquímica particularmente desafiadora. Técnicas disponíveis estão limitadas pela necessidade de equipamentos caros, que não são práticos para utilização em condições clínicas normais. O teste de cristalização do filme lacrimal é um teste clínico simples, rápido e barato e pode indicar, indiretamente, as propriedades bioquímicas do filme lacrimal.⁽²²⁾ Existe a hipótese de que o aumento na osmolaridade do FLPC possa ser ocasionado por um desequilíbrio na concentração de sais inorgânicos e macromoléculas presentes no FLPC. No TCL, isso dificulta o deslocamento destes componentes para a periferia, impedindo assim o processo de cristalização.⁽¹³⁾ Desta forma, a hiperosmolaridade lacrimal pode ser indiretamente indicada por um TCL alterado, sendo um dos eventos centrais no círculo vicioso de olho seco e caracterizando-se por um estado em que a osmolaridade da lágrima excede a da célula epitelial, levando à redução do volume da célula e ao aumento da concentração de solutos com consequente morte celular e perda das células caliciformes produtoras de mucina. Isso agrava a instabilidade do filme lacrimal, alimentando o círculo de eventos que levam ao olho seco e pode ser considerado como uma incapacidade do olho para se adaptar a um desafio de manutenção osmótica nas células epiteliais expostas. Antes destes acontecimentos, muitas células são capazes de resistir aos ambientes hiperosmóticos, por meio da regulação osmótica.⁽¹⁸⁾ Os animais deste estudo, diagnosticados com uma afecção que, no estado crônico, é conhecida por provocar a síndrome do olho seco,^(3,4,5,6) não

apresentaram, antes do procedimento cirurgico de reposição da glândula, sinais significativos de hiperosmolaridade indireta (TCL alterado) (Tabela 12), nem deficiência de produção lacrimal, baseada nos testes realizados. Acredita-se que por se tratar de um grupo de animais jovens (em média $13,2 \pm 15,6$ meses, tendo o mais velho 60 meses), submetidos ao diagnóstico e ao tratamento cirúrgico precoce, a atividade de regulação osmótica celular ainda se fazia presente.

Verificou-se, entretanto, que após o procedimento de reposição da glândula da terceira pálpebra, houve piora significativa da classificação do TCL, classificado de acordo com o *STEPanizer* (Tabelas 10, 11 e 12), tanto comparando apenas o olho afetado (a) no decorrer do tempo (em todos os tempos pós-operatórios), como comparando (a) com os olhos hígidos do GC, piora não significativa quando a classificação foi feita de acordo com Rolando (1984). Isso demonstra que quando a classificação do TCL é feita pelo *STEPanizer*, o TCL é mais sensível em identificar mudanças precoces. A piora visualizada pode ser, supostamente, justificada pela reação inflamatória pós-operatória, que provavelmente provocou um grau de hiperosmolaridade transitória. Portanto, não deve ser vista como um sinal precoce de olho seco. Entretanto, a validade clínica do TCL requer investigação mútua dos seus resultados com os valores de osmolaridade direta (que pode ser aferida com o aparelho TearLab)⁽⁷⁾ de modo a padronizar sistematicamente os graus de cristaliação, correlacionando-os com o valor osmótico aferido.⁽²²⁾

A análise de variância realizada com os olhos direito e esquerdo do GC mostrou alta significância. Isso demonstra que em um animal sem afecções oftálmicas, tanto o olho direito como o esquerdo, reagem da mesma forma aos testes realizados. Ainda nestes animais, a alta correlação entre a classificação do TCL pelo *STEPanizer* com a classificação feita de acordo com Rolando (1984) (Tabela 5) mostra que a classificação feita com o *STEPanizer*, pode ser

utilizada para diminuir a subjetividade da classificação proposta por Rolando (1984), já relatada em outro estudo.⁽²²⁾

Na análise de variância realizada apenas com o GA, ao se comparar (a) e (c), não houve diferença significativa para o TLS, o TCL classificado de acordo com Rolando (1984), o TRFL e a BIO em relação ao tempo, nem entre si (Tabela 7 e 9). Assim como, no decorrer do tempo não houve diferença significativa em cada grupo de olho afetado ou contralateral, separadamente (Tabela 8). Isso demonstra que ambos os olhos, mesmo sendo um com e o outro sem a protrusão da glândula da terceira pálpebra, respondem da mesma forma aos testes, o que significa que não há diferença significativa nesses testes entre o olho acometido pela protrusão da glândula e o olho não acometido de um mesmo animal, demonstrando possivelmente, a predisposição individual em ambos os olhos ao desenvolvimento da afecção. A protrusão da glândula da terceira pálpebra pode se manifestar de forma bilateral, mas em momentos distintos entre os olhos. Este fato pode indicar novas hipóteses em relação à etiologia desta afecção, que embora descrita como decorrente de provável aplasia ou hipoplasia do tecido conectivo (retináculo) entre a base da glândula e os tecidos periorbitais,⁽³⁾ pode estar relacionada a outras alterações prévias de superfície ocular, ainda não relatadas em literatura.

A fluoresceína é amplamente utilizada para estudar a integridade e viabilidade das células epiteliais da córnea e da conjuntiva, onde células epiteliais danificadas com conexões intercelulares interrompidas se coram em verde brilhante sob a luz azul cobalto-filtrada.⁽¹⁹⁾ Caso o filme lacrimal avaliado esteja hiperosmótico, pode degradar a barreira epitelial da córnea, situação precocemente demonstrada pela impregnação com fluoresceína no exame oftálmico.⁽¹⁸⁾ Em relação aos resultados encontrados neste estudo, nenhum animal foi positivo ao teste, tampouco verificou-se diferença significativa entre o GC e o GA (Tabela 11). Entretanto, pode-se identificar uma tendência de impregnação com fluoresceína na

córnea dos animais do GA (Tabela 10), onde 38% dos olhos afetados impregnaram com o corante antes da cirurgia de reposição da glândula, caindo para 25 % após o procedimento de reposição, mostrando a regressão deste sinal precoce de hiperosmolaridade do FLPC após o tratamento cirúrgico. Tais valores possivelmente seriam significativos caso o número de animais avaliados fosse maior.

Na camada de FLPC adjacente ao glicocálice das células apicais da córnea e do epitélio conjuntival da superfície ocular, estão concentradas as mucinas, que são glicoproteínas grandes e pesadas presentes na superfície entre o epitélio corneano e o meio extracelular.⁽²³⁾ Cabe a elas estabilizar e espalhar o FLPC, a fim de proporcionar uma superfície refratária de alta qualidade ao longo da córnea, além de lubrificar sua superfície epitelial durante o piscar.⁽¹⁾ A secreção de mucina é a função primária das células caliciformes conjuntivais, importante para a estabilidade do filme lacrimal, proteção e manutenção da superfície ocular, visto que é responsável pela adesão do filme lacrimal à superfície corneana. A redução na densidade ou alterações morfológicas nas células caliciformes repercutem em alteração na secreção de mucina.⁽²⁴⁾ Na CCS, as mucinas desidratam e perdem suas propriedades polares formando agregados hidrofóbicos, fazendo com que contaminantes apolares ou fracamente polares (debris celulares, lipídios, bactérias gram negativas e partículas do ar) se liguem preferencialmente à mucina hidratada e ao epitélio corneano do que à mucina desidratada, acentuando as características da CCS e aumentando o risco de infecção.⁽²⁵⁾

A determinação da densidade das células caliciformes na conjuntiva ocular é um indicador da saúde da superfície ocular mais sensível do que os métodos que quantificam diretamente a mucina da lágrima.⁽²⁶⁾ A avaliação das células caliciformes da conjuntiva pode ser realizada por citologia conjuntival por impressão, mas a quantidade de células na amostra é inferior à real e, como na conjuntiva bulbar não há quantidade de células caliciformes significativa, realizar a citologia não é necessário.^(18,27) A BIO de um fragmento de conjuntiva

do fórnix inferior médio proporciona melhor contagem dessas células.⁽²⁶⁾ Neste estudo, a BIO resultou na concentração de $22,28 \pm 5,78$ células calciformes por campo de grande aumento (400x) para olhos de animais hígidos e $18,45 \pm 10,6$ para olhos afetados (Tabela 10), denotando diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 11). Tal diferença indica que os animais com protrusão da glândula já possuíam provável apoptose das células calciformes conjuntivais,⁽¹⁸⁾ que com a progressão da doença, poderiam levar à CCS por deficiência de mucina.⁽²⁵⁾ Ao comparar no mesmo animal, o olho afetado (a) e o contralateral (c), a média de (a) foi de $18,45 \pm 10,6$ e de (c) de $17,09 \pm 5,16$ células calciformes por campo de grande aumento (400x) (Tabela 6); sem diferença significativa entre eles (p 0.76 e r 0.16)(Tabelas 7 e 9). Isso também pode indicar que por mais que a afecção seja unilateral, o animal pode ter predisposição ao desenvolvimento de alterações bilaterais, reforçando a hipótese, ainda não descrita em literatura, de que a protrusão da glândula da terceira pálpebra pode decorrer de alterações prévias na superfície ocular.

Conclusões

O diagnóstico e a terapêutica cirurgica da protusão da glândula da terceira pálpebra foram estabelecidos de forma precoce nos animais deste estudo, fato que os poupou das alterações crônicas sobre a superfície ocular desencadeadas por esta afecção, como a CCS. Acredita-se, portanto, que estes cães ainda estivessem em fase de regulação osmótica oftálmica, o que possibilitou a ausência de alterações nos testes de superfície ocular realizados, indicando que estes animais ainda mantiam a integridade do FLPC.

A classificação para o TCL por meio do programa *STEPanizer© stereology tool, version 1.0*, mostrou-se mais sensível em identificar alterações precoces de hiperosmolaridade indireta do que a classificação proposta por Rolando (1984), dotada de subjetividade.

A etiologia da protrusão da glandula da terceira pálpebra ainda não foi completamente elucidada em literatura. Neste estudo, verificou-se que mesmo no olho sem a protrusão da

glândula de um animal acometido unilateralmente pela afecção, são verificadas as mesmas alterações visualizadas no olho afetado, como baixa densidade de células caliciformes e TCL alterado. Visto que a protrusão da glândula da terceira pálpebra ainda poderia ocorrer no olho não afetado destes animais, levanta-se a hipótese, ainda não descrita em literatura, de que a protrusão da glândula da terceira pálpebra pode decorrer de alterações de superfície ocular prévias, anteriores à frouxidão do retináculo.

Estudos futuros com animais que apresentem a protrusão da glândula da terceira pálpebra de forma crônica podem corroborar com a elucidação da etiopatogenia desta afecção e com a importância do emprego destes testes, correlacionando-os com a mensuração osmótica direta, visto que a osmolaridade é fator determinante no desencadeamento da síndrome do olho seco.

Dentre os fatores limitantes deste estudo, citam-se a não padronização de raças dentro dos grupos, considerando-se sua susceptibilidade às desordens do filme lacrimal, bem como não ter sido estabelecido um grupo de animais que apresentassem a afecção de forma crônica, a fim de se estabelecer a evolução das alterações oculares. Entretanto, o trabalho descrito dependeu de casuística clínica do serviço. Adicionalmente, a avaliação direta da osmolaridade lacrimal e sua correlação com o TCL poderiam trazer dados complementares a esta pesquisa.

Referências

1. Umeda Y, Nakamura S, Fujiki K *et al.* Distribution of goblet cells and MUC5AC mRNA in the canine nictitating membrane. *Experimental Eye Research* 2010; 91: 721-726.
2. Plummer CE, Källberg ME, Gelatt JP *et al.* Intranictitans tacking for replacement of prolapsed gland of the third eyelid in dogs. *Veterinary Ophthalmology* 2008; 11: 228-233.
3. Maggs DJ. Third Eyelid. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 5th edition (Eds Maggs, DJ, Miller PE, Ofri R). Saunders Company: Missouri, 2013; 159-164.
4. Mathers W. Evaporation from the ocular surface *Experimental Eye Research*, 2004; 78: 389–394.
5. Coassin M, Lambiase A, Costa N *et al.* Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye *Graefe's. Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2005; 243: 151–155.
6. Cabral VP, Watanabe E, Tostes *et al.* Third eyelid gland protrusion in dogs. An experimental model proposal. *Ciência Rural* 2008; 38: 1920-1924.
7. Benelli U, Nardi M, Posarelli C *et al.* Tear osmolarity measurement using the TearLab™ Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness. *Contact Lens & Anterior Eye* 2010; 33: 61–67.
8. Barabinoa S, Chena W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Experimental Eye Research* 2004; 79: 613–621.
9. Begley CG, Himebaugh N, Renner D *et al.* Tear Breakup Dynamics: A Technique for Quantifying Tear Film Instability. *Optometry and Vision Science* 2006; 83: 15–21.
10. Davis K, Townsend W. Tear-film Osmolarity in Normal Cats and Cats with Conjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology* 2011; 14: 54–59.

11. McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of Dry Eye. *Survey of Ophthalmology* 2012; 57: 293-316.
12. Rorig MCL. Uso de pimecrolimus 0,5% no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. *Dissertação de mestrado da em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná* 2009: 72.
13. Bitton E. Tear ferning: a valuable tool in determining dry eye. On line in: *www.opticianonline.net* 21.09.2007: 32-35.
14. Julio G, Lluch S, Pere Pujol P, Merindano M D. Effects of tear hyperosmolarity on conjunctival cells in mild to moderate dry eye. *Ophthalmic and Physiological Optics* 2012; 32: 317–323.
15. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K *et al.* Tear Film Osmolarity: Determination of a Referent for Dry Eye Diagnosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006; 47: 4309-4315.
16. Bitton E, Keech A, Jones L *et al.* Subjective and Objective Variation of the Tear Film Pre- and Post-Sleep. *Optometry and Vision Science* 2008; 85: 740–749.
17. Lemp M A, Bron AJ, Baudouin C *et al.* Tear Osmolarity in the Diagnosis and Management of Dry Eye Disease. *American Journal of Ophthalmology* 2011; 151: 792–798.
18. Baudouin C, Aragona P, Messmer EM *et al.* Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN. *Group Meeting The ocular surface* 2013; 11: 246-258.
19. Módis L, Szalai E. Dry eye diagnosis and management. *Expert Review of Ophthalmology* 2011; 6.1: 67.

20. Morgan RV, Duddy JM, McClurg K. Prolapse of the gland of the third eyelid in dogs: a retrospective study of 89 cases (1980 to 1990). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1993; 29: 56-60.
21. Rolando M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret International journal of ophthalmology* 1984; 2: 32-41.
22. Masmali AM, Murphy PJ, Purslow C. Development of a new grading scale for tear ferning. *Contact Lens & Anterior Eye* 2014; 37: 178-184.
23. Moore CP, McHugh JB, Thorne JG *et al.* Effect of Cyclosporine on Conjunctival Mucin in a Canine Keratoconjunctivitis Sicca Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001; 42: 653-659.
24. Zhang XR, Li QS, Xiang MH *et al.* Analysis of tear mucin and goblet cells in patients with conjunctivochalasis. *Spektrum Augenheilkd* 2010; 24: 206–213.
25. Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in Retinal and Eye Research* 2004; 23: 449–474.
26. Moore CP, Wilsmaat NJ, Nordheim EV *et al.* Density and Distribution of Canine Conjunctival Goblet Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1987; 28:1925-1932.
27. Bolzan AA, Brunelli ATJ, Castro MB *et al.* Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary Ophthalmology* 2005; 8: 401–405.

ANEXOS

Tabela 1. Estatística descritiva do grupo controle com, o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*; e a análise histopatológica conjuntival (BIO).

Variável	N	Desvio				
		Média	Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
TLS OD	14	25,5	3,99	25	19	31
TLS OE	14	25,85	3,39	25,5	18	32
Rolando OD	14	2	0,78	2	1	3
Rolando OE	14	2,21	1,05	2,5	1	4
<i>STEPanizer</i> OD	14	85,21	10,19	87	63	100
<i>STEPanizer</i> OE	14	78,28	17,27	81,5	44	97
BIO OE	14	22,28	5,78	22,05	13,6	34,5

OD: olho direito OE: olho esquerdo

Tabela 2. Teste de cristalização da lágrima no olho direito do grupo controle classificado segundo Rolando (1984)

Rolando		Desvio			
(1984)	N	Média	Padrão	Mínimo	Máximo
		<i>STEPanizer</i>			
1	4	96,7	3,77	93	100
2	6	85,5	3,27	80	89
3	4	73,2	7,08	63	78
4	0	-	-	-	-

Tabela 3. Teste de cristalização da lágrima no olho esquerdo do grupo controle classificado segundo Rolando (1984)

Rolando		Desvio			
(1984)	N	Média	Padrão	Mínimo	Máximo
<i>STEPanizer</i>					
1	5	94,4	3,2	90	97
2	2	87	0	87	87
3	6	67,6	10,3	48	76
4	1	44	-	44	44

Tabela 4. Análise de variância de cada olho e entre os olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do grupo controle

Variável	R² Ajustado	Erro MSE	Pr > F
OD	0,80	4,54	< 0,001
OE	0,79	7,77	< 0,001
OD X OE	0,78	0,42	< 0,001

Tabela 5. Correlações de Spearman do grupo controle entre o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*.

	TLS	Rolando	Rolando	STEPanizer	STEPanizer
	OE	OD	OE	OD	OE
TLS OD	0,22	-0,27	-0,05	0,23	-0,04
TLS OE		-0,02	-0,20	0,15	0,24
Rolando OD			0,37	-0,94***	-0,35
Rolando OE				-0,38	-0,94***
STEPanaizer OD					0,37

***p<.0001 OD: olho direito OE: olho esquerdo

Tabela 6. Estatística descritiva do grupo afetado com o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*, o teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), a coloração com fluoresceína (FLUO) e a análise histopatológica conjuntival (BIO).

	Média	Desvio	Mediana	Mínimo	Máximo
	Padrão				
TLS (a)	26	4,63	27	11	34
TLS (c)	26,7	5,39	28	11	35
Rolando (a)	2,51	0,88	3	1	4
Rolando (c)	2,46	0,86	3	1	4
STEP (a)	69,53	19,36	66,5	33	100
STEP (c)	71,48	17,75	69	30	100
TRFL (a)	19,25	1,84	20	12	20
TRFL (c)	19,74	1,01	> 20	15	> 20
Fluo (a)	27,7 %*	45 %	0	0 (negativo)	1 (impregnado)
Fluo (c)	25,9 %*	44 %	0	0 (negativo)	1 (impregnado)
BIO (a)	18,45	10,60	15,5	5,6	34,5
BIO (c)	17,09	5,16	16,6	9,7	26,7

*Porcentagem de olhos que impregnaram o corante no FLUO. (a) olho afetado e (c) olho contralateral

Tabela 7. Análise de variância no grupo afetado, comparando o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*, o teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), a coloração com fluoresceína (FLUO) e a análise histopatológica conjuntival (BIO) no tempo, entre os olhos (protrusão - afetado e contralateral) e, juntamente, entre o tempo e os olhos

	TLS	Rolando	STEPanizer	TRFL	FLUO	BIO
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Tempo	0,85	0,82	0,0002	0,96	0,64	.
Protrusão	0,34	0,92	0,35	0,57	0,84	0,76
Tempo X Protrusão	0,31	0,99	0,45	0,98	0,70	.

Tabela 8. Análise de variância do grupo afetado, em cada olho, o afetado (a) e o contralateral(c), separadamente, em relação ao tempo, demonstrando a variância do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), do teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*, do teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) e da coloração com fluoresceína (FLUO).

	TLS	Rolando	STEPanizer	TRFL	FLUO
Pr>F (a)	0,66	0,91	0,0011	0,96	0,58
Pr>F (c)	0,44	0,94	0,10	0,99	0,71

Tabela 9. Correlações de Spearman do grupo afetado, comparando o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), o teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*, o teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), a coloração com fluoresceína (FLUO) e a análise histopatológica conjuntival (BIO) entre os olhos ((a) afetados e (c) contralaterias)

	TLS	Rolan	STEP	TRFL	FLUO	BIO	TLS	Rolando	STEP	TRFL	FLUO	BIO
	(a)	do (a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
Tempo	0,08	0,22	-0,21	0,12	-0,00	.	0,09	0,15	-0,14	0,17	0,04	.
TLS (a)		-0,01	0,07	0,21	-0,31	-0,13	0,48**	-0,07	0,02	0,06	-0,24	0
Rolando (a)			-0,91***	-0,04	0,18	-0,01	0,13	0,44***	-0,40***	-0,16	0,11	0,14
STEP (a)				0,00	-0,16	-0,07	-0,13	-0,46***	0,44***	0,14	-0,09	-0,10
TRFL(a)					-0,19	0,4	0,09	0,10	-0,12	0,41**	-0,32**	0,40
FLUO(a)						0,11	-0,30**	0,08	-0,15	-0,14	0,57***	-0,32
BIO(a)							-0,22	0,39	-0,48	0,44	0,52	0,16
TLS (c)								-0,04	0,08	-0,12	-0,31**	-0,01
Rolando (c)									-0,87***	0,16	-0,00	0,00
STEP (c)										-0,15	-0,03	-0,03

BIO(c)	0,01	0,22
FLUO(c)		-0,37

p<.001 *p<.0001

Tabela 10. Estatística descritiva do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), do teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*, do teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), da coloração com fluoresceína (FLUO) e da análise histopatológica conjuntival (BIO) nos animais do grupo controle (-1) e nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dos animais do grupo afetado (somente os olho afetado)

Tempo	N	Variável	Desvio		Intervalo	
			Média	Padrão	Mediana	Interquartil
-1	28	TLS	25,67	3,64	25	24 a 28
		Rolando	2,10	0,91	2	1 a 3
		STEPanizer	81,75	14,36	87	74 a 92,5
		TRFL	20	0	20	20 a 20
		FLUO	0	0	0	0 a 0
		BIO	22,28	5,78	22,05	19,5 a 24
0	13	TLS	26,30	4,13	27	24 a 30
		Rolando	2,23	0,83	2	2 a 3
		STEPanizer	77,30	17,49	83	67 a 88
		TRFL	19,23	2,04	20	20 a 20
		FLUO	0,38	0,50	0	0 a 1
		BIO	18,45	10,60	15,5	6,8 a 29,3
7	13	TLS	24,66	5,64	25	22 a 29
		Rolando	2,58	1,08	3	1,5 a 3
		STEPanizer	65,83	22,42	65,5	46,5 a 89

		TRFL	18,5	2,61	20	17,5 a 20
		FLUO	0,08	0,28	0	0 a 0
15	13	TLS	25,81	3,45	25	24 a 29
		Rolando	2,45	0,82	3	2 a 3
		STEPanizer	70,63	17,54	65	53 a 89
		TRFL	19,63	1,20	20	20 a 20
		FLUO	0,27	0,46	0	0 a 1
30	13	TLS	25	6,60	25,5	21 a 30
		Rolando	2,5	1,22	3	1 a 3
		STEPanizer	69,83	23,18	62	52 a 97
		TRFL	19,16	2,04	20	20 a 20
		FLUO	0,5	0,54	0,5	0 a 1
60	13	TLS	27,66	4,07	27,5	25,5 a 31
		Rolando	2,83	0,57	3	2,5 a 3
		STEPanizer	63,66	17,88	61	51,5 a 81
		TRFL	19,75	0,86	20	20 a 20
		FLUO	0,25	0,45	0	0 a 0,5

Tabela 11. Análise de variância do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), do teste de cristalização do filme lacrimal classificado segundo Rolando (1984) e de acordo com o *STEPanizer*, do teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), da coloração com fluoresceína (FLUO) e da análise histopatológica conjuntival (BIO) ao longo do tempo entre olhos do grupo controle e os olhos afetados (a) do grupo afetado.

	TLS	Rolando	STEPanizer	TRFL	FLUO	BIO
Pr>F	0,77	0,80	< 0,001	0,95	0,72	0,04

Tabela 12. Análise de variância comparando o *STEPanizer* nos olhos do GC (-1) com os olhos afetados (a); no pré-operatório (0) e aos 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios

Tempo	Tempo	Pr > t
-1	0	0,1439
-1	7	<.0001
-1	15	0,0007
-1	30	0,004
-1	60	<.0001
0	7	0,0012
0	15	0,0627
0	30	0,0844
0	60	0,0001