



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DO PADRÃO DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM
BOVINOS E SUA CORRELAÇÃO COM ACHADOS HISTOLÓGICOS**

BRENDHA MENDES FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE
2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DO PADRÃO DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM BOVINOS E
SUA CORRELAÇÃO COM ACHADOS HISTOLÓGICOS**

Brendha Mendes Ferreira

ORIENTADOR: Paula Diniz Galera

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: NÚMERO DA DISSERTAÇÃO/ANO

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2025

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DO PADRÃO DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA EM
BOVINOS E SUA CORRELAÇÃO COM ACHADOS HISTOLÓGICOS**

BRENDHA MENDES FERREIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/TESE DE
DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE/DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**Paula Diniz Galera, Dra. (FAV/ Universidade de Brasília).
(ORIENTADORA)**

**Silvia Franco Andrade, Dra. (UNOESTE).
(EXTERNA À INSTITUIÇÃO)**

**Roberta Martins Crivelaro Thiesen, Dra. (UFPA).
(EXTERNA À INSTITUIÇÃO)**

BRASÍLIA/DF, 2 DE DEZEMBRO DE 2025

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERREIRA, B.M. **Estudo do padrão de cristalização da lágrima em bovinos e sua correlação com achados histológicos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2025, 41 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado/tese de doutora 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 e seu orientador reservam para si os direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MF383ee Mendes Ferreira, Brendha
Estudo do padrão de cristalização da lágrima em bovinos e sua correlação com achados histológicos. / Brendha Mendes Ferreira; orientador Paula Diniz Galera. Brasília, 2025. 41 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade de Brasília, 2025.

1. Oftalmologia veterinária. 2. Bovinos. 3. Cristalização da lágrima. 4. Conjuntiva. I. Diniz Galera, Paula, orient. II. Título.

EPIÍGRAFE

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.”

Paulo Freire

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à ciência construída coletivamente, por mãos muitas vezes invisibilizadas,
mas indispensáveis para qualquer transformação verdadeira

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elizabeth e Valter, pela paciência, pelo amor sem medida e pela fé em mim, que sempre sustentou mais do que palavras poderiam dizer. E aos meus irmãos (Deborah, Tiago, Nicolas e Michela) por serem abrigo e alicerce, por cada gesto de cuidado, por cada sorriso enviado mesmo à distância. Nesta jornada, fui muitas vezes dúvida, mas com eles ao redor, nunca fui só.

À minha querida amiga, Aline, com quem aprendi que a jornada é mais leve quando trilhada em boa companhia. Sem ela, este caminho teria sido apenas estrada. Com ela, foi também casa.

Ao meu amor, Thiago. Agradeço pela amizade de anos e pelo amor de hoje, mas, acima de tudo, por ser quem sempre me impulsiona a ir além. Obrigada por me desafiar a ser melhor a cada dia.

À professora Paula Galera, minha orientadora, por sua orientação dedicada e pelas contribuições generosas em cada etapa deste trabalho. Obrigada por ter acreditado no potencial deste estudo, e por caminhar ao meu lado com paciência, firmeza e sensibilidade. Sua presença foi essencial para que este sonho se tornasse realidade.

Aos professores que tornaram o percurso mais tranquilo, em especial o professor Diogo, o professor Fabiano, o Juliano, o Lucas, a Thaís e o Maciel, pelo apoio fundamental nas coletas e processamento das amostras. Ao João, que além de amigo, também foi parte essencial na execução do trabalho. Estendo minha gratidão a todos da Fazenda Água Limpa (FAL) e do Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário (LDPV) que, de alguma forma, contribuíram com esta caminhada. Cada gesto, por menor que tenha parecido, ajudou a compor esse trajeto que agora se transforma em conquista. Também à Capes pelo auxílio financeiro, essencial para condução do trabalho.

Este trabalho é uma pequena conquista, mas carrega o peso simbólico de lutas muito maiores. Que sirva como lembrete de que mulheres pensam, pesquisam, publicam e fazem ciência todos os dias, mesmo quando o mundo tenta impedir.

ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	11
CAPÍTULO I	12
INTRODUÇÃO	13
CONTEXTUALIZAÇÃO	13
PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA	13
OBJETIVO	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
COMPOSIÇÃO DO FILME LACRIMAL PRÉ-CORNEANO E IMPORTÂNCIA PARA SUPERFÍCIE OCULAR	14
ANÁLISE CONJUNTIVAL E O PAPEL DAS CÉLULAS CALICIFORMES NO DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO	15
TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA: PRINCÍPIOS, APLICAÇÃO E CLASSIFICAÇÕES	16
SAÚDE OCULAR EM BOVINOS: PANORAMA CLÍNICO E DESAFIOS DIAGNÓSTICOS	16
CAPÍTULO II	19
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. MATERIAIS E MÉTODOS	22
COMITÊ DE ÉTICA	Erro! Indicador não definido.
ANIMAIS	22
TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL (TCFL)	22
CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA, SEGUNDO ROLANDO (1984) E MASMALI ET AL. (2014)	22
CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO MÉTODO <i>STEPANIZER</i> ®	23
BIÓPSIA CONJUNTIVAL	24
CONTAGEM DE CÉLULAS CALICIFORMES	24
AValiação DO INFILTRADO CELULAR	24
AValiação ESTATÍSTICA	24
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3. CONCLUSÃO	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Interface da ferramenta de contagem (“*Counting*”) do software STEPanizer®. Sobre a imagem do padrão de cristalização, foi sobreposta uma malha com 36 pontos equidistantes. A contagem considerou apenas os pontos que interceptaram ramificações cristalinas no quadrante inferior da malha (exemplificado pelos pontos em vermelho). Nesta imagem, 30 dos 36 pontos coincidiram com cristais, resultando em uma densidade de cristalização de 30/36.. 23
- Figura 2.** TCFL de bovinos classificados de acordo com as escalas Rolando (1984) e Masmali, (2014), respectivamente: (A) tipo I e grau 0; (B) Tipo I e grau 1; (C) Tipo II e grau 2; (D) Tipo III e grau 3 (E) Tipo IV e grau 4. Magnificação de 20x.....27
- Figura 3.** Regressão linear entre a contagem de pontos obtida no STEPanizer® e os escores atribuídos pela Escala de Rolando (1984) nos olhos direito (A) e esquerdo (B), e pela Escala de Masmali (2014) nos olhos direito (C) e esquerdo (D).....29
- Figura 4.** Mapa de calor das correlações entre as escalas de Rolando (1984) e Masmali (2014) e a contagem de pontos obtida pelo STEPanizer® nos olhos direitos (OD) (A) e esquerdos (OE) (B).....29
- Figura 5.** Padrão de cristalização observado na lágrima de bovinos, evidenciando formações diferenciadas com aspecto de estruturas hexagonais. Magnificação de 20x.....30
- Figura 6.** Padrão de cristalização observado na lágrima de bovinos, evidenciando formações diferenciadas com aspecto de estruturas geométricas. Magnificação de 20x.....31
- Figura 7.** Corte histológico da conjuntiva palpebral corado em PAS, com (*) indicando células caliciformes conjuntivais (CCC). Aumento de 400x.....32
- Figura 8.** Cortes histológicos de conjuntiva classificados conforme a intensidade do infiltrado inflamatório: (A) leve, (B) moderado e (C) intenso. Coloração por HE. Aumento de 400x.....33
- Figura 9.** Secção histológica da conjuntiva evidenciando infiltrado inflamatório moderado. Coloração por HE, ampliação de 400x.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da frequência dos graus de TCFL por olho de acordo com a Escala de Rolando (1984) e Masmali (2014) e associação com a mediana de pontos do STEPanizer® e seu intervalo interquartil (IIQ).....	26
Tabela 2 – Correlações entre os escores qualitativos (Rolando e Masmali) e a contagem de pontos do STEPanizer® (variável independente) em bovinos.....	28
Tabela 3 - Correlação de Spearman entre os graus de cristalização pelas escalas de Rolando (1984) e Masmali (2014), células caliciformes (CCCs) e infiltrado inflamatório da conjuntiva palpebral de bovinos.....	34

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ACVO – American College of Veterinary Ophthalmologists

CIB – Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina

CCS – Ceratoconjuntivite Seca

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CCC – Células Caliciformes Conjuntivais

TRFL – Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

DED – Dry Eye Disease (Doença do Olho Seco)

DNA – Deoxyribonucleic Acid

FAL – Fazenda Água Limpa

FLPC – Filme Lacrimal Pré-Corneano

HE – Hematoxilina-Eosina

OD – Olho Direito

OE – Olho Esquerdo

PAS – Periodic Acid-Schiff

PROCISUR – Programa Cooperativo para o Desenvolvimento Tecnológico Agroalimentar e Agroindustrial do Cone Sul

TCFL – Teste de Cristalização do Filme Lacrimal

TLS – Teste Lacrimal de Schirmer

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O Brasil ocupa posições de destaque no cenário mundial da pecuária, sendo o terceiro maior produtor de leite de vaca, com uma produção anual superior a 34 bilhões de litros (BRASIL, 2025) e o segundo maior produtor de carne bovina, com aproximadamente 11,8 milhões de toneladas estimadas para os anos de 2024 e 2025, representando cerca de 19% da produção global (UNITED STATES, 2024). Esses números refletem não apenas a força do setor agropecuário nacional, mas também a relevância econômica e social dos rebanhos bovinos, especialmente em um país de dimensões continentais, onde a bovinocultura desempenha papel central na geração de renda, alimentos e empregos (CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2023).

1.2 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

Apesar da magnitude produtiva, aspectos relacionados à saúde e ao bem-estar dos bovinos ainda necessitam de maior atenção. Questões relacionadas à saúde ocular desses animais ainda são negligenciadas, tanto na prática clínica quanto na pesquisa aplicada (GAFEN et al., 2023). No entanto, doenças oftálmicas em bovinos podem gerar impactos significativos na produtividade, resultando em queda na produção de leite, prejuízos no ganho de peso e custos elevados com tratamentos. Estima-se que, somente nos Estados Unidos, esses custos tenham alcançado cerca de 150 milhões de dólares em 1993 (SIMMS et al., 1993). A redução no ganho de peso pode variar entre 8 e 18 kg, e perdas indiretas também são observadas, como lesões associadas ao manejo para tratamento e a condenação de carcaças devido a sequelas oculares (PEARCE; MOORE, 2021).

Embora existam alguns estudos pontuais sobre oftalmologia em bovinos, a maioria deles limita-se à determinação de parâmetros isolados, como pressão ocular padrão (PECHE; EULE, 2018), sensibilidade corneana (WIESER; TICHY; NELL, 2013), teste de vermelho fenol (SAĞLAM; DÜZ, 2022), pH lacrimal (BECKWITH-COHEN et al., 2014) e Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (WIESER; TICHY; NELL, 2013; GELATT, 2021). No entanto, nenhum desses estudos abordou a padronização do teste de cristalização da lágrima e sua relação com outros parâmetros.

1.3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o teste de cristalização da lágrima em bovinos, além de compará-lo com a contagem de células caliciformes e com o infiltrado inflamatório conjuntival.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSIÇÃO DO FILME LACRIMAL PRÉ-CORNEANO E IMPORTÂNCIA PARA SUPERFÍCIE OCULAR

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) desempenha um papel fundamental na preservação da integridade da superfície ocular, sendo responsável por hidratar, nutrir a córnea, protegê-la contra agressões externas e atuar como a primeira interface refrativa para a passagem da luz (ORÍÁ et al., 2018; GELATT, 2021). A manutenção da estabilidade ocular depende de uma dinâmica eficiente do FLPC, que resulta do equilíbrio entre a secreção, distribuição, evaporação, absorção e drenagem da lágrima. Esse equilíbrio está diretamente associado à qualidade do fluido lacrimal (SEBBAG; MOCHEL, 2020).

A lágrima é composta por duas camadas principais: a mucoaquosa e a lipídica. A camada lipídica, secretada pelas glândulas de Meibômio, é constituída por lipídios polares e apolares, tendo como funções essenciais minimizar a evaporação da camada aquosa subjacente e reduzir a tensão superficial da lágrima (WILLCOX et al., 2017; MAGGIO, 2019).

Já a camada mucoaquosa, que representa cerca de 60% do volume total do filme lacrimal, é dividida, de forma didática, em componentes aquoso e mucoso (HARTLEY; WILLIAMS; ADAMS, 2006; MAGGIO, 2019). Em bovinos, sua produção é atribuída à glândula lacrimal principal, à glândula da terceira pálpebra e à glândula Harderiana (PEARCE; MOORE, 2021).

A glândula Harderiana, além de participar da secreção lacrimal, é responsável pela produção de imunoglobulinas. Nos bovinos, esta glândula possui formato triangular, superfície externa lisa e é classificada como mista, contendo porções mucosas e seromucosas (PAULE, 1957; PINARD et al., 2003). A fração aquosa do FLPC é encarregada da lubrificação, proteção e fornecimento de nutrientes à córnea (DAVIDSON; KUONEN, 2004).

Por sua vez, a porção mucosa é rica em mucinas e é majoritariamente produzida pelas células caliciformes da conjuntiva. Sua principal função é promover a adesão adequada da lágrima à superfície ocular, garantindo a estabilidade do filme lacrimal (WILLCOX et al., 2017; MAGGIO, 2019; GELATT, 2021). Ainda, as mucinas ajudam na remoção e defesa contra antígenos, bactérias e outras partículas presentes na lágrima (LIU et al., 2024).

2.2 ANÁLISE CONJUNTIVAL E O PAPEL DAS CÉLULAS CALICIFORMES NO DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO

A conjuntiva é um tecido epitelial estratificado não queratinizado que reveste a superfície interna das pálpebras e a esclera. As células caliciformes, localizadas nesse epitélio, apresentam maior concentração em áreas de acúmulo do filme lacrimal, como o fórnice nasal inferior (LIU et al., 2024). De modo geral, essas células são encontradas de forma isolada e distribuídas irregularmente ao longo do epitélio conjuntival humano (ARGÜESO, 2022). A densidade das células caliciformes varia significativamente conforme a região anatômica, podendo variar de dezenas a milhares de células por milímetro quadrado (DOUGHTY, 2012). A morfologia dessas células está diretamente relacionada ao seu estágio de secreção: células imaturas apresentam núcleos proeminentes, enquanto células maduras, ricas em grânulos de mucina, exibem núcleos menores devido ao acúmulo de material secretório (WEIGERT, 2022).

Essas células especializadas não são exclusivas da superfície ocular, estando também presentes nos epitélios do trato respiratório e gastrointestinal, onde atuam como barreira contra agentes externos (MA; RUBIN; VOYNOW, 2018; ARGÜESO, 2022). A presença de células caliciformes da conjuntiva ocular já foi descrita em diversas espécies além da humana, incluindo gatos (RICCI et al., 2023), ratos (WELSS et al., 2021) e cães (MOORE et al., 1987; ARAÚJO; CORRÊA; GALERA, 2019).

Alterações na densidade dessas células têm sido associadas a diversas condições patológicas. A redução no número de células caliciformes está relacionada, por exemplo, à doença do olho seco (DED) em humanos (WELSS et al., 2021) e à oftalmopatia de Graves, caracterizada por inflamação significativa da conjuntiva palpebral (YOU et al., 2023). Em cães, estudos demonstram que casos de ceratoconjuntivite seca (CCS) estão frequentemente associados à diminuição das células caliciformes e ao aumento do infiltrado inflamatório conjuntival (IZCI et al., 2015; BERZINA; TARENTJEVA; KOVALCUKA, 2022; FAYAD et al., 2023).

A análise da conjuntiva, incluindo a identificação do infiltrado celular e a contagem de células caliciformes, configura uma ferramenta complementar relevante na identificação e no monitoramento de doenças da superfície ocular. Embora os métodos atuais apresentem limitações que restringem sua aplicação na rotina clínica, há consenso sobre a importância de otimizar e padronizar essas técnicas, além de desenvolver abordagens inovadoras e marcadores mais precisos, especialmente para o manejo de condições como a doença do olho seco (DED). Nesse contexto, destaca-se a necessidade de uma avaliação integrada da superfície ocular, em que a análise histológica da conjuntiva seja associada a outros testes diagnósticos (GELATT, 2021; LIU et al., 2024).

2.3 TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA: PRINCÍPIOS, APLICAÇÃO E CLASSIFICAÇÕES

Entre os diversos métodos utilizados para a avaliação qualitativa da lágrima, destaca-se o Teste de Cristalização do Filme Lacrimal (TCFL), também conhecido como *tear ferning test*. Trata-se de um exame simples, de baixo custo, que atua como complemento a outros testes diagnósticos, como o tempo de ruptura do filme lacrimal e a análise da conjuntiva. Há evidências de que o TCFL esteja intimamente relacionado à quantidade e qualidade das mucinas presentes na lágrima. Sua execução requer a coleta do fluido lacrimal por meio de um tubo capilar (GELATT, 2021). Parâmetros ambientais, como umidade e temperatura, exercem influência direta sobre os padrões de cristalização obtidos (GELATT, 2021). Após a completa secagem da amostra, a análise é realizada em microscopia de luz, observando-se a conformação dos cristais formados.

O TCFL já foi analisado em diversas espécies, incluindo humanos (ROLANDO, 1984; MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014), cães (ORIÁ et al., 2018; VITOR et al., 2023b), gatos (VELOSO et al., 2020), equinos (SILVA et al., 2016), camelos (MASMALI et al., 2018) e ovelhas (FAGEHI et al., 2021). Nos humanos, o padrão de cristalização foi inicialmente classificado em quatro tipos (I, II, III e IV), conforme a presença e organização dos cristais. De acordo com essa classificação, os tipos I e II indicam uma condição normal, sendo caracterizados por abundantes formações de cristais, com pouca ou nenhuma separação entre seus ramos. Em contrapartida, os tipos III e IV estão relacionados ao olho seco, apresentando menor quantidade de cristais e espaços amplos entre as estruturas formadas (ROLANDO, 1984). Posteriormente, uma nova proposta de classificação sugeriu cinco categorias, denominadas de grau 0 a 4. De acordo com o estudo, os graus 0 e 1 são considerados normais, enquanto os graus 2 a 4 indicam padrões anormais de cristalização, associados a diferentes graus de disfunção do filme lacrimal (MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014).

Além dessas classificações subjetivas, é possível aplicar ferramentas digitais como o software STEPanizer, que permite a quantificação através da contagem de pontos equidistantes que interceptam as ramificações dos cristais, minimizando a subjetividade da análise (SILVA et al., 2016).

2.4 SAÚDE OCULAR EM BOVINOS: PANORAMA CLÍNICO E DESAFIOS DIAGNÓSTICOS

Estudos amplos e bem controlados sobre as alterações da superfície ocular e do filme lacrimal em bovinos ainda são escassos. A maioria dos relatos disponíveis refere-se a investigações pontuais ou casos isolados, com foco limitado em aspectos específicos da saúde ocular. Alterações primárias nas glândulas lacrimais dessa espécie são consideradas raras, sendo que o lacrimejamento excessivo é frequentemente observado como resposta reflexa a

agentes irritativos ambientais (PEARCE; MOORE, 2021). Além disso, diversas doenças infecciosas desempenham papel significativo na ocorrência de ceratoconjuntivite em bovinos, afetando tanto a qualidade quanto a quantidade do filme lacrimal (DIMA; FIKEDU, 2021; KUMAR; PRABHAKARAN; SUDHARSAN, 2021; LOY; CLOTHIER; MAIER, 2021).

Entre essas enfermidades, destaca-se a ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB), causada pela bactéria *Moraxella bovis*, reconhecida mundialmente pelo impacto econômico gerado. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, os prejuízos com perdas produtivas e custos de tratamento tenham alcançado cerca de 150 milhões de dólares em 1993 (SIMMS et al., 1993). A doença foi considerada prioritária para pesquisa pelo PROCISUR em 1996, refletindo sua importância no contexto agropecuário (CONCEIÇÃO; GIL TURNES, 2003). Além da redução no ganho de peso — que pode variar entre 8 e 18 kg —, a CIB acarreta perdas indiretas, como lesões decorrentes do manejo para tratamento e condenações de carcaças devido a sequelas oculares (PEARCE; MOORE, 2021). Estudos indicam que bovinos acometidos pela CIB durante o desmame podem apresentar redução prolongada na produtividade (FUNK et al., 2014).

A predisposição à ceratoconjuntivite infecciosa está associada a fatores ambientais, como exposição excessiva à radiação ultravioleta, poeira e traumas oculares (DIMA; FIKEDU, 2021). A integridade do filme lacrimal é essencial para a defesa ocular, já que a lágrima atua como barreira física e imunológica, contendo imunoglobulinas e células de defesa (WILLCOX et al., 2017). Uma lágrima de baixa qualidade favorece a aderência de microrganismos à superfície ocular, aumentando o risco de infecções.

Outras doenças infecciosas, como a rinotraqueíte infecciosa bovina, listeriose e clamidiose, também são causas frequentes de ceratoconjuntivite nessa espécie (KUMAR; PRABHAKARAN; SUDHARSAN, 2021). Além das afecções infecciosas, condições neurológicas, como a paralisia do nervo facial, podem comprometer a dinâmica palpebral, prejudicando a proteção da superfície ocular e favorecendo a evaporação do filme lacrimal (PEARCE; MOORE, 2021).

No que diz respeito à avaliação da saúde ocular em bovinos, o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) é amplamente utilizado para mensuração da produção lacrimal, sendo uma ferramenta fundamental no diagnóstico de disfunções quantitativas do filme lacrimal em diferentes espécies (LEMP et al., 2011; LEONARD et al., 2019; SEBBAG; MOCHEL, 2020). Em bovinos adultos saudáveis, valores de TLS I variam entre 25 e 35 mm/min (WIESER; TICHY; NELL, 2013; PEARCE; MOORE, 2021). Outras avaliações incluem a tonometria, com valores médios de 23 mmHg utilizando o TonoVet (PECHE; EULE, 2018), a sensibilidade corneana, avaliada com estesiômetro de Cochet-Bonnet, que apresenta média de $1,67 \pm 1,13$ g/mm², valor semelhante ao observado em outras espécies domésticas (WIESER; TICHY; NELL, 2013). O teste do vermelho de fenol revelou valores entre 25 e 38 mm/15 segundos, variando conforme a estação do ano (SAĞLAM; DÜZ, 2022). Já o pH lacrimal dos bovinos

apresentou média de 8,31, evidenciando caráter mais alcalino em comparação à lágrima humana (BECKWITH-COHEN et al., 2014).

CAPÍTULO 2

RESUMO

O presente estudo avaliou, de forma inédita, o teste de cristalização do filme lacrimal (TCFL) em bovinos da raça Holandesa, correlacionando-o com parâmetros histológicos conjuntivais. Foram avaliados 100 olhos de 50 bovinos da raça Holandesa clinicamente saudáveis, submetidos a exame oftálmico com lupa de pala. O TCFL foi realizado com coleta por microcapilar e análise microscópica das amostras após secagem, sendo classificadas segundo os critérios de Rolando (1984), Masmali et al. (2014) e por contagem dos cristais com o software STEPanizer©. Realizou-se biópsia conjuntival em 35 animais para coloração por hematoxilina/eosina (HE) e por *Periodic Acid Schiff* (PAS – *Easy Path* – São Paulo – Brasil), com posterior contagem de células caliciformes em até 5 diferentes campos, além da avaliação do infiltrado celular. As análises estatísticas incluíram testes de normalidade, comparação entre olhos, correlações, regressão linear e concordância interobservador, adotando-se $p < 0,05$. Os padrões de cristalização foram predominantemente classificados como tipo III/grau 3 em ambas as escalas, indicando a presença de cristais isolados e amplas áreas sem formação, sugestivas, em outras espécies, de instabilidade do filme lacrimal. A análise quantitativa revelou baixa contagem de cristais, com mediana de 12 (IIQ: 9,00–15,25) nos olhos direitos e 11 (IIQ: 7,00–13,25) nos esquerdos. Observou-se correlação negativa significativa entre o número de pontos de cristalização e os graus qualitativos, especialmente com a escala de Masmali ($r = -0,72$ no olho direito e $r = -0,61$ no esquerdo). Na análise histológica, a contagem de células caliciformes variou de 0 a 71 células, com mediana de 6,0 (IC95%: 5,0–6,0; $n=236$). O infiltrado inflamatório apresentou mediana de 2,0 (IC95%: 2,0–2,0), caracterizando-se predominantemente por um grau moderado de inflamação, com predomínio de linfócitos. Não foi observada correlação entre o TCFL e os achados histológicos. De forma relevante, observou-se que os padrões de cristalização lacrimal nos bovinos apresentaram morfologia distinta daquela descrita em outras espécies, indicando possíveis particularidades anatômicas ou fisiológicas da espécie que ainda não foram caracterizadas e que apontam para a necessidade de adaptações metodológicas ou desenvolvimento de escalas específicas para ruminantes. Esses achados reforçam o potencial do TCFL como ferramenta funcional complementar na avaliação do filme lacrimal e sua integração com análises histológicas pode ampliar a compreensão de alterações precoces que predisõem ao desenvolvimento de doenças oculares, como a ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

Palavras-chave: cristalização da lágrima, bovinos, infiltrado inflamatório, células caliciformes, oftalmologia veterinária.

ABSTRACT

This study conducted a novel evaluation of the tear ferning test (TFT) in Holstein cattle, correlating the findings with conjunctival histological parameters. A total of 100 eyes from 50 clinically healthy Holstein cattle were examined using a headband magnifier. The TFT was performed by collecting tear samples with microcapillary tubes, followed by microscopic analysis after air drying. Samples were classified according to the criteria proposed by Rolando (1984), Masmali et al. (2014), and crystal density was quantified using the STEPanizer© software. Conjunctival biopsies from 35 animals were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS – Easy Path – São Paulo – Brazil). Goblet cells were counted in up to 5 different fields, and cellular infiltrate was evaluated. Statistical analyses included normality testing, paired comparisons between eyes, correlations, linear regression, and interobserver agreement, adopting a significance level of $p < 0.05$. Tear ferning patterns were predominantly classified as type III / grade 3 on both scales, characterized by the presence of isolated crystals and large acellular areas, a morphological pattern that, in other species, is often associated with tear film alterations. Quantitative analysis revealed a low crystal count, with a median of 12 (IQR: 9.00–15.25) in right eyes and 11 (IQR: 7.00–13.25) in left eyes. A significant negative correlation was observed between crystal point count and qualitative grading, particularly with the Masmali scale ($r = -0.72$ in the right eye and $r = -0.61$ in the left). Histological analysis showed goblet cell counts ranging from 0 to 71 per field, with a median of 6.0 (95% CI: 5.0–6.0; $n = 236$). The inflammatory infiltrate had a median score of 2.0 (95% CI: 2.0–2.0), predominantly moderate in intensity, with lymphocytes as the main cell type. No correlation was found between TFT results and histological findings. Notably, tear ferning patterns in cattle exhibited morphological features distinct from those described in other species, suggesting possible anatomical or physiological particularities that remain uncharacterized and highlight the need for methodological adaptations or the development of species-specific grading scales for ruminants. These findings support the potential of TFT as a complementary functional tool for assessing tear film quality and indicate that its integration with histological analyses may enhance early detection of tear film alterations that predispose cattle to ocular diseases such as infectious bovine keratoconjunctivitis.

Keywords: tear ferning test, cattle, inflammatory infiltrate, goblet cells, veterinary ophthalmology.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, (protocolo nº 23106.068874/2024-67).

ANIMAIS

Foram avaliados 100 olhos de 50 bovinos da raça Holandesa, incluindo machos e fêmeas, adultos e bezerros, com idade média de 4 anos e 10 meses $\pm$ 2 anos e 9 meses. Todos os animais eram clinicamente saudáveis e não apresentavam alterações oftálmicas no momento da avaliação. Os bovinos pertenciam ao rebanho da Fazenda Água Limpa (FAL), vinculada à Universidade de Brasília (UnB), sendo mantidos em sistema extensivo, livres em pastagem, e expostos às condições naturais de temperatura e umidade características da região Centro-Oeste do Brasil.

Para inclusão no trabalho, os animais passaram por avaliação oftálmica com lupa de pala (B-max®, BM-9893, Shenzhen, China), com sistema de 5 lentes intercambiáveis e iluminação LED, como suporte na inspeção ocular.

TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL (TCFL)

A coleta do filme lacrimal foi realizada por meio de microcapilares, inseridos no fórnice da pálpebra inferior de ambos os olhos (FARIAS et al., 2013). No momento da coleta, os valores de temperatura e umidade relativa do ar foram registrados utilizando um termo-higrômetro (Incoterm®, modelo 7666.02.0.00, Porto Alegre, Brasil).

Uma gota da amostra lacrimal foi depositada sobre a lâmina de vidro, padronizando-se o tempo de 10 minutos para a secagem espontânea à temperatura ambiente. As lâminas secas foram posteriormente analisadas com o auxílio de um microscópio óptico equipado com câmera acoplada, e as imagens foram capturadas utilizando o software *Motic Images Plus 2.0*.

CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DA LÁGRIMA, SEGUNDO ROLANDO (1984) E MASMALI ET AL. (2014)

As imagens obtidas foram analisadas com base nos critérios de classificação propostos por Rolando (1984) e Masmali et al. (2014). De acordo com Rolando, os padrões de cristalização do filme lacrimal são categorizados em quatro tipos progressivos, do I ao IV. O tipo I é caracterizado por uma cristalização densa, formada por cristais altamente ramificados e sem espaçamento entre as estruturas. No tipo II, embora a cristalização ainda seja densa, observa-se uma redução no tamanho das ramificações, com arborizações menos complexas e discretamente espaçadas. O tipo III apresenta poucas ramificações, geralmente incompletas e de maior dimensão, associadas a amplos espaços entre os cristais. Já o tipo IV é marcado pela ausência de estruturas

cristalinas definidas, predominando áreas com grumos e acúmulo de muco.

A classificação proposta por Masmali et al. (2014) adota uma escala de zero a quatro, na qual os graus 0 e 1 indicam padrões de cristalização considerados normais, enquanto os graus de 2 a 4 refletem alterações compatíveis com disfunção do filme lacrimal, em diferentes intensidades. Para assegurar a padronização da análise, três avaliadores previamente treinados classificaram as amostras de forma independente. Em seguida, foram aplicados testes estatísticos para avaliar a concordância interobservador.

CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO MÉTODO *STEPANIZER*®

As imagens capturadas foram analisadas utilizando o software *STEPanizer*® *stereology tool*, versão 2.28. Para a avaliação, foram sobrepostos 36 pontos equidistantes em um campo delimitado, sob aumento de 20x. A contagem foi realizada considerando apenas os pontos localizados no quadrante inferior da malha que interceptavam as estruturas cristalinas, sendo desconsiderados aqueles posicionados sobre áreas vazias. Todas as imagens foram analisadas na magnificação de 20x.

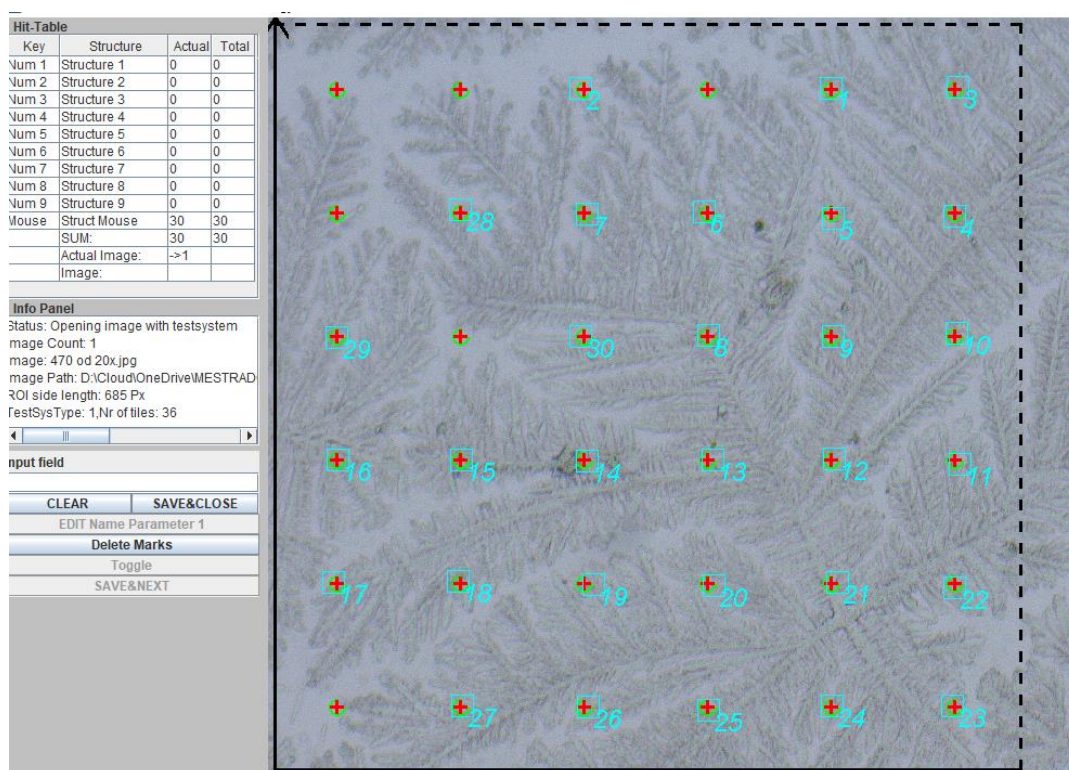


Figura 1. Interface da ferramenta de contagem (“Counting”) do software STEPanizer®. Sobre a imagem do padrão de cristalização, foi sobreposta uma malha com 36 pontos equidistantes. A contagem considerou apenas os pontos que interceptaram ramificações cristalinas no quadrante inferior da malha (exemplificado pelos pontos em vermelho). Nesta imagem, 30 dos 36 pontos coincidiram com cristais, resultando em uma densidade de cristalização de 30/36.

BIÓPSIA CONJUTIVAL

A conjuntiva do olho esquerdo de 35 dos animais foi higienizada com solução de Polivinil Pirrolidona Iodo a 1%. Em seguida, foram instiladas duas gotas de tetracaína 1% (Allergan®, São Paulo, Brasil) para promover anestesia tópica. A biópsia foi realizada na região do fórnice conjuntival inferior nasal, utilizando pinça anatômica e tesoura Stevens. As amostras obtidas foram imediatamente acondicionadas em frascos contendo formalina tamponada a 10% para posterior processamento histológico no Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário – LDPV. Duas lâminas de cada fragmento foram confeccionadas e coradas por hematoxilina/eosina (HE) e por *Periodic Acid Schiff* (PAS – Easy Path – São Paulo – Brasil).

CONTAGEM DE CÉLULAS CALICIFORMES

As lâminas coradas com PAS foram inicialmente analisadas em aumento de 20x, com o intuito de verificar a integridade e qualidade dos cortes histológicos. Após essa avaliação preliminar, procedeu-se à contagem das células caliciformes, realizada em até cinco campos viáveis consecutivos ao longo do epitélio conjuntival, utilizando aumento de 40x. A quantificação foi conduzida de forma independente por dois avaliadores, sendo o número final de células produtoras de muco por campo determinado pela média dos valores obtidos por ambos.

AValiação DO INFITRADO CELULAR

As lâminas contendo amostras de conjuntiva foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação do infiltrado celular. A quantificação foi realizada por análise microscópica, utilizando uma escala semiquantitativa, na qual: 1 indicava infiltrado discreto, 2 correspondia a infiltrado moderado e 3 a infiltrado acentuado. O infiltrado também foi classificado de acordo com o tipo celular predominante.

AValiação ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A verificação da normalidade das variáveis foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Variáveis com distribuição não paramétrica foram expressas como mediana e intervalos interquartis (IQR). A comparação entre os valores do *STEPanizer*® dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) foi realizada por meio do teste t pareado. A associação entre as contagens do *STEPanizer*® e os graus de cristalização das escalas de Rolando e Masmali, bem como entre as classificações dessas duas escalas, foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman.

Para explorar a relação entre os escores do *STEPanizer*® e a classificação do TCL, foram aplicados modelos de regressão linear simples. A concordância interobservador na classificação das

escalas qualitativas foi verificada por meio do teste de Kendall, com maior concordância para a escala Rolando em olho direito ($\tau = 0.71$; $p < 0.001$). A possível associação entre a idade dos animais e as variáveis estudadas também foi analisada também por meio do teste de Kendall. Adicionalmente, foi realizada análise de frequência para descrever a distribuição dos graus atribuídos por olho. O nível de significância adotado para todas as análises foi de $p < 0,05$.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo reporta, pela primeira vez, a aplicação do teste de cristalização da lágrima em bovinos, utilizando uma metodologia de baixo custo e fácil execução. Flúidos corporais como saliva e lágrima produzem padrões específicos de cristalização quando secos sob condições controladas de temperatura e umidade, refletindo a qualidade do filme lacrimal e fornecendo informações sobre a atividade das células caliciformes, responsáveis pela produção de mucinas (ALANAZI et al., 2021).

Antes de apresentar os resultados, é relevante destacar que a avaliação focou-se no aspecto qualitativo do filme lacrimal. Optou-se por não incluir o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) nesta análise, uma vez que estudos em outras espécies não têm demonstrado correlação robusta entre a produção lacrimal quantitativa e os padrões de cristalização (TCFL) (SILVA et al., 2016; VITOR et al., 2023a). Além disso, buscou-se priorizar o bem-estar animal, minimizando o número de procedimentos no manejo dos bovinos.

Foram avaliados 100 olhos de 50 bovinos da raça Holandesa. De acordo com a classificação do teste de cristalização pela escala de Rolando, o tipo III foi o mais prevalente, observado em 76% dos olhos direitos e 82% dos esquerdos. O tipo II foi identificado em 18% e 8% dos olhos direitos e esquerdos, respectivamente. O tipo IV esteve presente em 6% dos olhos direitos e 8% dos esquerdos, enquanto o tipo I foi registrado em apenas 2% de ambos os olhos.

Resultados semelhantes foram obtidos com a escala de Masmali, na qual o grau 3 também predominou, ocorrendo em 46% dos olhos direitos e 48% dos esquerdos. O grau 2 foi identificado em 34% dos olhos direitos e 36% dos esquerdos; o grau 1 em 12% e 6%, respectivamente. O grau 4 foi o menos prevalente na escala de Masmali, representando 8% dos olhos direitos e 10% dos esquerdos (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação da frequência dos graus de TCFL por olho de acordo com a Escala de Rolando (1984) e Masmali (2014) e associação com a mediana de pontos do STEPanizer® e seu intervalo interquartil (IIQ).

Classificação	Rolando (1984)	Masmali (2014)	Mediana de pontos STEPanizer® (IIQ)
Olho direito (OD)			12,0 (9,00 – 15,25)
Grau 1	2%	12%	
Grau 2	18%	34%	
Grau 3	76%	46%	
Grau 4	6%	8%	
Olho esquerdo (OE)			11,0 (7,00 – 13,25)
Grau 1	2%	6%	
Grau 2	8%	36%	
Grau 3	82%	48%	
Grau 4	8%	10%	

Fonte: Elaboração própria (2025).

Em ambas as escalas, o tipo III/grau 3 caracteriza um padrão de cristalização deficitário, com presença de cristais isolados e grandes áreas sem formação, indicando, segundo literatura

relacionada ao TCFL em outras espécies (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014; SILVA et al., 2016; MASMALI et al., 2018; ORIÁ et al., 2018; ALANAZI et al., 2021), déficit do filme lacrimal e possível comprometimento da saúde ocular. A avaliação da concordância interobservador revelou variabilidade significativa, possivelmente atribuída à predominância de padrões intermediários e ruins, nos quais as transições entre os graus se tornam mais subjetivas e dificultam a classificação precisa. A classificação das amostras dos bovinos segundo Masmali e Rolando podem ser vistas na Figura 2.

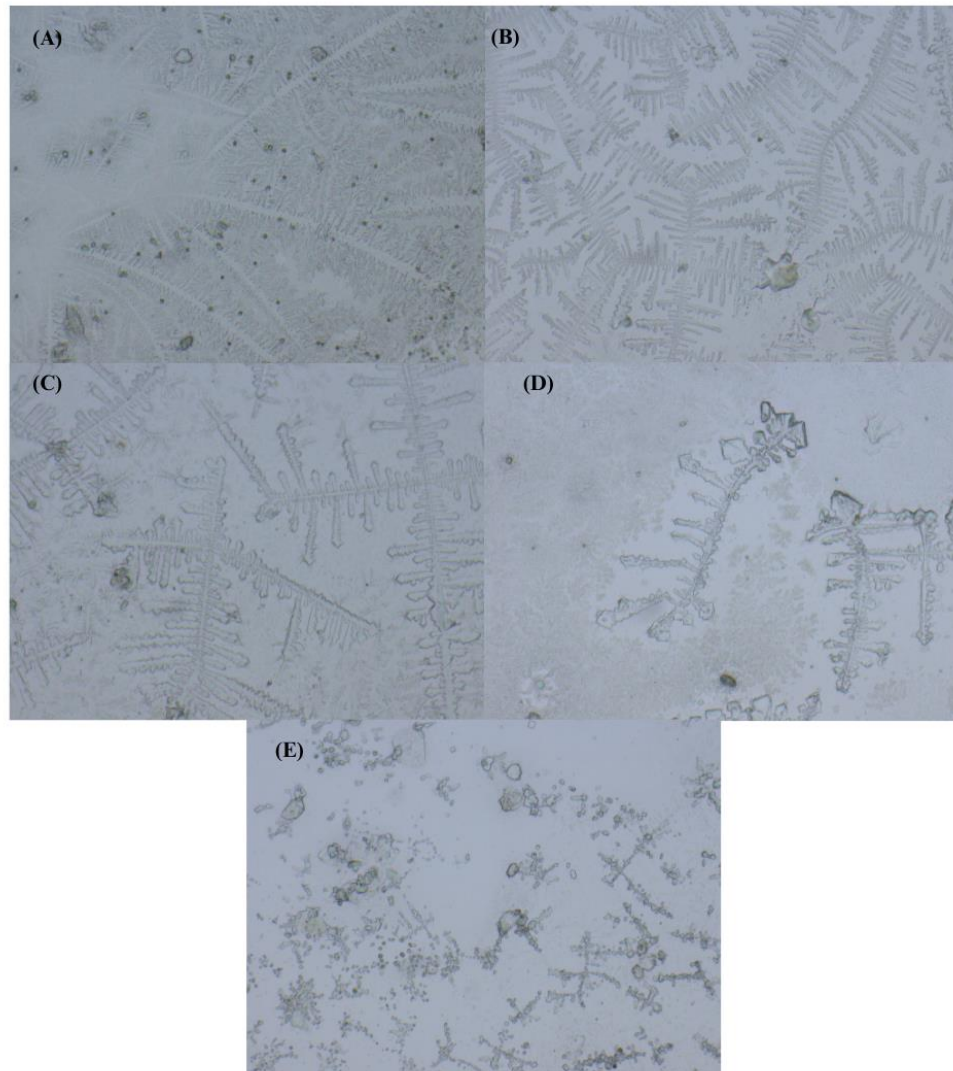


Figura 2. TCFL de bovinos classificados de acordo com as escalas Rolando (1984) e Masmali, (2014), respectivamente: (A) tipo I e grau 0; (B) Tipo I e grau 1; (C) Tipo II e grau 2; (D) Tipo III e grau 3 (E) Tipo IV e grau 4. Magnificação de 20x.

A análise quantitativa realizada pelo software STEPanizer© revelou uma mediana de 12 pontos (IIQ: 9,00–15,25) nos olhos direitos e 11 pontos (IIQ: 7,00–13,25) nos olhos esquerdos, refletindo uma baixa densidade de cristais. Embora a ausência de avaliações como o TRFL e o TLS impeça inferências diretas sobre a estabilidade ou produção lacrimal, a literatura em outras espécies sugere que padrões com baixa contagem de cristais estão frequentemente associados a distúrbios qualitativos do filme lacrimal. Adicionalmente, observou-se uma correlação negativa significativa

entre a contagem de pontos e os graus atribuídos pelas escalas qualitativas em ambos os olhos

Pela escala de Rolando, os coeficientes de correlação foram $r = -0,62$ ($p < 0,001$) para o olho direito e $r = -0,42$ ($p = 0,0002$) para o esquerdo, com equações de regressão linear indicando $TFT = 3,711 - 0,06939 \cdot \text{POINTS}$ ($R^2 = 0,42$; $p < 0,0001$) e $TFT = 3,359 - 0,03386 \cdot \text{POINTS}$ ($R^2 = 0,1665$; $p = 0,0033$), respectivamente. Na escala de Masmali, observou-se $r = -0,72$ ($p < 0,0001$) para o olho direito e $r = -0,61$ ($p < 0,0001$) para o esquerdo, com equações $TFT = 3,898 - 0,1173 \cdot \text{POINTS}$ ($R^2 = 0,55$; $p < 0,0001$) e $TFT = 3,396 - 0,07463 \cdot \text{POINTS}$ ($R^2 = 0,3705$; $p < 0,0001$), respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Correlações entre os escores qualitativos (Rolando e Masmali) e a contagem de pontos do STEPanizer® (variável independente) em bovinos.

Escala (variável dependente)	Olho	r (Spearman)	p-valor	Regressão linear (Escala = f(POINTS))	R²	p-valor (reg.)
Rolando	OD	-0,62	<0,001	$TFT = 3,711 - 0,06939 \cdot \text{POINTS}$	0,42	<0,0001
Rolando	OE	-0,42	0,0002	$TFT = 3,359 - 0,03386 \cdot \text{POINTS}$	0,1665	0,0033
Masmali	OD	-0,72	<0,0001	$TFT = 3,898 - 0,1173 \cdot \text{POINTS}$	0,55	<0,0001
Masmali	OE	-0,61	<0,0001	$TFT = 3,396 - 0,07463 \cdot \text{POINTS}$	0,3705	<0,0001

A regressão linear entre os escores qualitativos e a contagem de cristais é apresentada na Figura 3. Evidencia-se que uma menor densidade de cristalização está associada a padrões qualitativos piores de TCFL, compatíveis com um filme lacrimal menos estável e funcional, segundo avaliado em outras espécies (SILVA et al., 2016). É possível observar o padrão de correlação na Figura 4. Apesar da correlação observada, a elevada variação dos graus atribuídos e a variabilidade interobservador indicaram que o desempenho do STEPanizer© foi considerado de moderado a ruim para ambas as escalas. Essa limitação metodológica deve ser considerada na interpretação dos resultados, ressaltando a necessidade de estudos futuros que avaliem a reprodutibilidade e a acurácia do STEPanizer© na análise do TCFL em bovinos. Não foi identificada correlação significativa entre a idade dos animais e os parâmetros analisados.

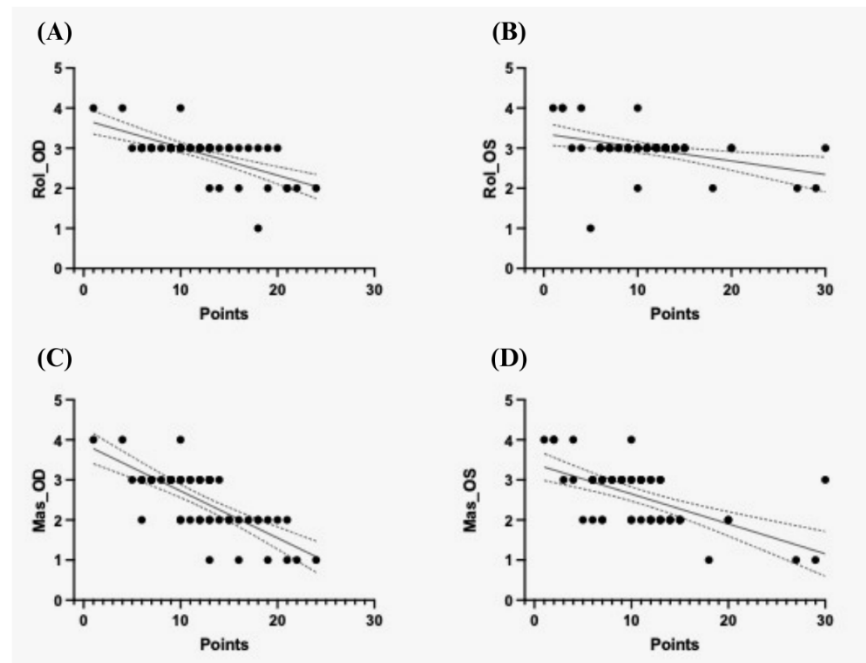


Figura 3. Regressão linear entre a contagem de pontos obtida no STEPAnizer® e os escores atribuídos pela Escala de Rolando (1984) nos olhos direito (A) e esquerdo (B), e pela Escala de Masmali (2014) nos olhos direito (C) e esquerdo (D).

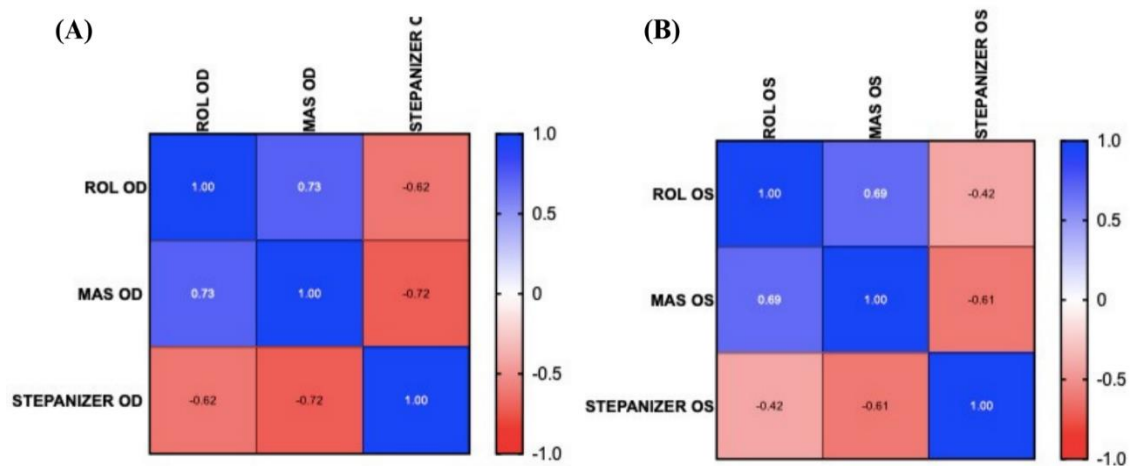


Figura 4. Mapa de calor das correlações entre as escalas de Rolando (1984) e Masmali (2014) e a contagem de pontos obtida pelo STEPAnizer® nos olhos direitos (OD) (A) e esquerdos (OE) (B).

Algumas amostras apresentaram padrões de cristalização com morfologia distinta daquela tradicionalmente descrita na literatura para outras espécies. As imagens exemplificadas na Figura 5 ilustram uma organização cristalina em rede poligonal, com ramificações curtas, regulares e pouco arborizadas, formando estruturas contornadas por pequenos cristais periféricos. Este padrão não se enquadra completamente em nenhum dos tipos clássicos descritos por Rolando (1984) nem nos escores de Masmali et al. (2014), o que sugere a existência de particularidades morfológicas do TCFL em bovinos. Esse padrão poligonal foi encontrado em três olhos de diferentes animais. Essa observação reforça a hipótese de que os critérios atualmente utilizados para classificação do TCFL

podem necessitar de adaptações específicas para bovinos, levando em conta possíveis diferenças na composição da lágrima ou na dinâmica de evaporação em comparação com outras espécies.

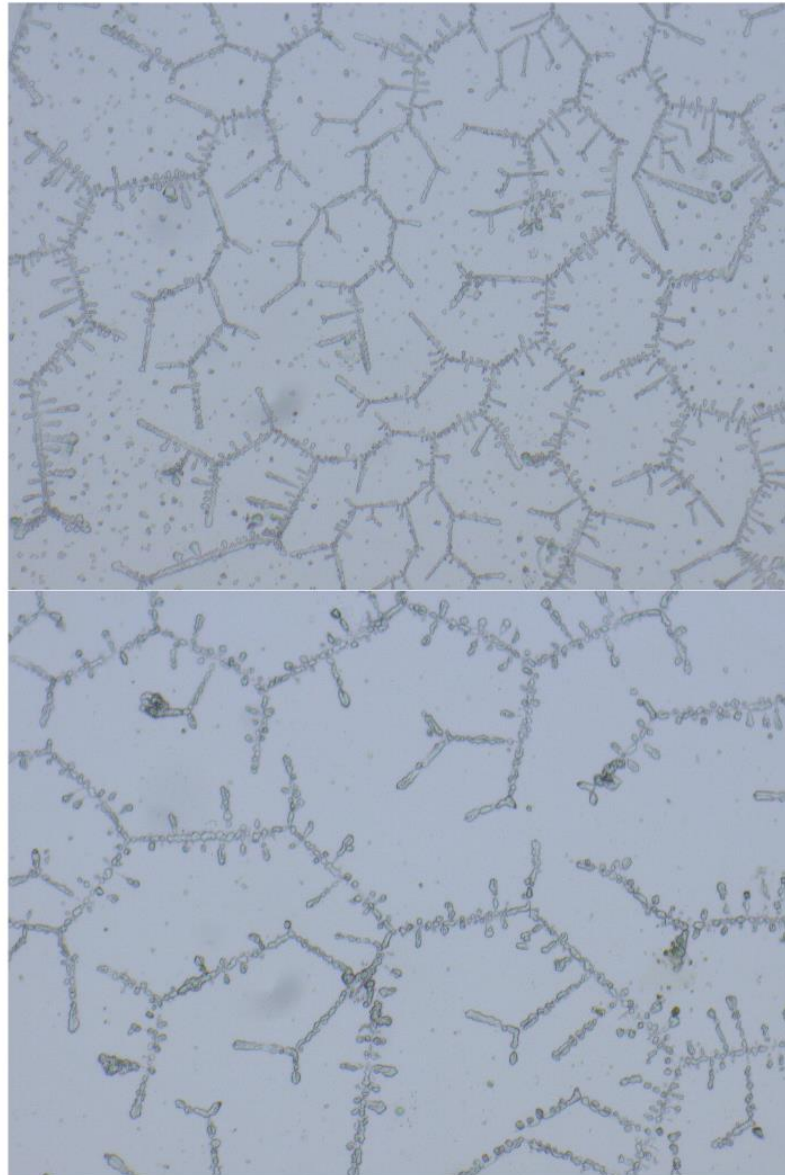


Figura 5. Padrão de cristalização observado na lágrima de bovinos, evidenciando formações diferenciadas com aspecto de estruturas hexagonais. Magnificação de 20x.

Ainda, outros padrões diferentes dos encontrados na literatura podem ser vistos da Figura 6, apresentando uma estrutura central robusta e ramificações laterais de contornos irregulares e bem definidos, com cristais de formato geométrico e bordas serrilhadas. O aspecto da formação dos cristais é distinto do observado nos padrões clássicos descritos na literatura, especialmente pelos prolongamentos laterais assimétricos e a ausência de numerosas arborizações finas, como esperado nos tipos I ou II de Rolando (ROLANDO, 1984; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014). Essa morfologia sugere uma variação atípica na cristalização, possivelmente relacionada a fatores ambientais, fisiológicos ou à composição lacrimal específica destes animais.

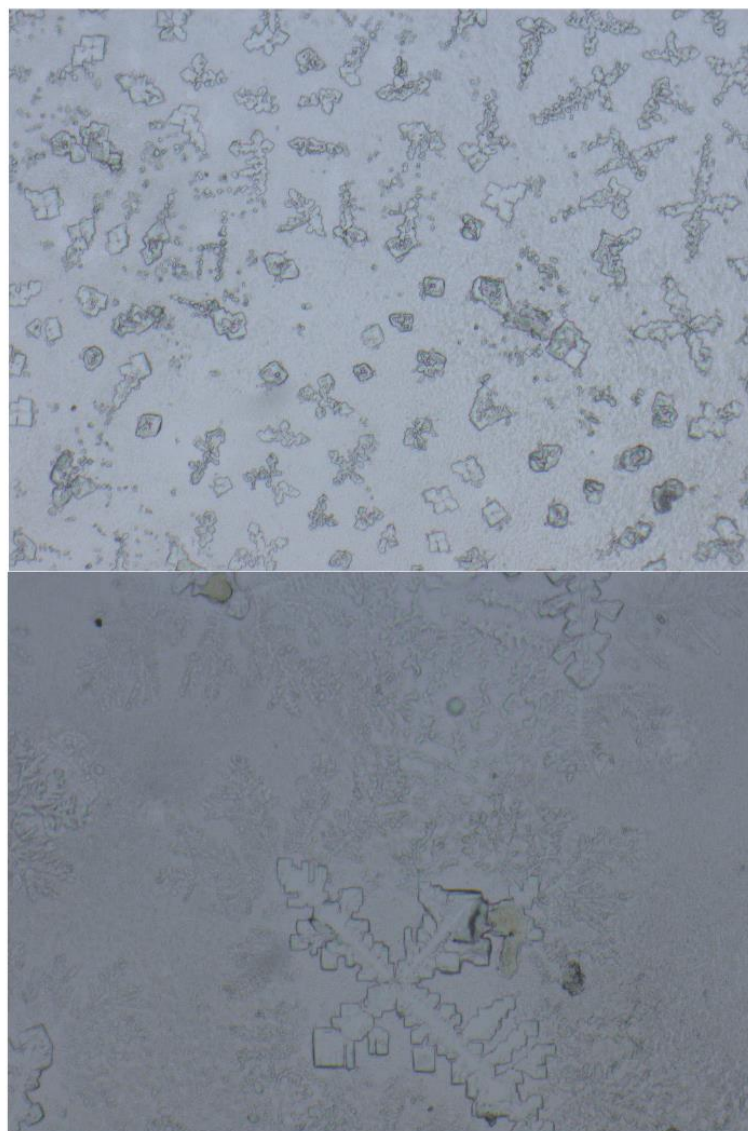


Figura 6. Padrão de cristalização observado na lágrima de bovinos, evidenciando formações diferenciadas com aspecto de estruturas geométricas. Magnificação de 20x.

Os três olhos que apresentaram padrões morfológicos distintos (hexagonais/geométricos) pertenciam a animais clinicamente saudáveis, sem sinais de doença ocular à inspeção com lupa de pala. Isso reforça a hipótese de que tais padrões podem representar variações fisiológicas próprias da espécie bovina, e não necessariamente um estado patológico.

Além da análise da cristalização da lágrima, foi realizada a quantificação das células caliciformes da conjuntiva bulbar, responsáveis pela produção de mucinas. Os valores variaram de 0 a 71 células por campo. A mediana foi de 6 células (IC95%: 5–6), enquanto a média foi de 8,1 células (DP = 10,19; EP = 0,66). Os percentis revelaram que 50% das observações estavam concentradas entre 2 e 10 células, embora alguns valores elevados tenham produzido assimetria à direita na distribuição. A Figura 7 ilustra um corte histológico da conjuntiva, evidenciando células caliciformes coradas em PAS.

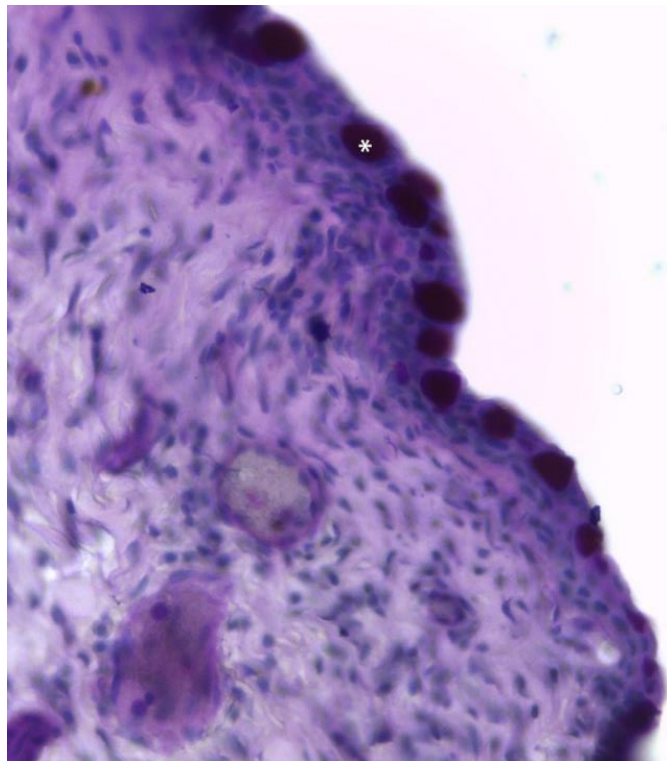


Figura 7. Corte histológico da conjuntiva palpebral corado em PAS, com (*) indicando uma célula caliciforme conjuntival (CCC). Aumento de 400x.

A análise histológica também evidenciou a presença de infiltrado inflamatório conjuntival, predominantemente linfocítico (aproximadamente 91,4%). As amostras foram classificadas quanto ao grau em discreto, moderado e acentuado, com valores variando de 1 (discreto) a 3 (acentuado). A Figura 8 apresenta exemplos representativos de cada tipo. A mediana foi de 2,0 (IC95%), correspondendo ao infiltrado classificado como moderado, como é possível observar na Figura 9, enquanto a média foi de 2,13. Não foi encontrada correlação entre a contagem de células caliciformes, o infiltrado inflamatório e os achados qualitativos da lágrima (**Tabela 2**).

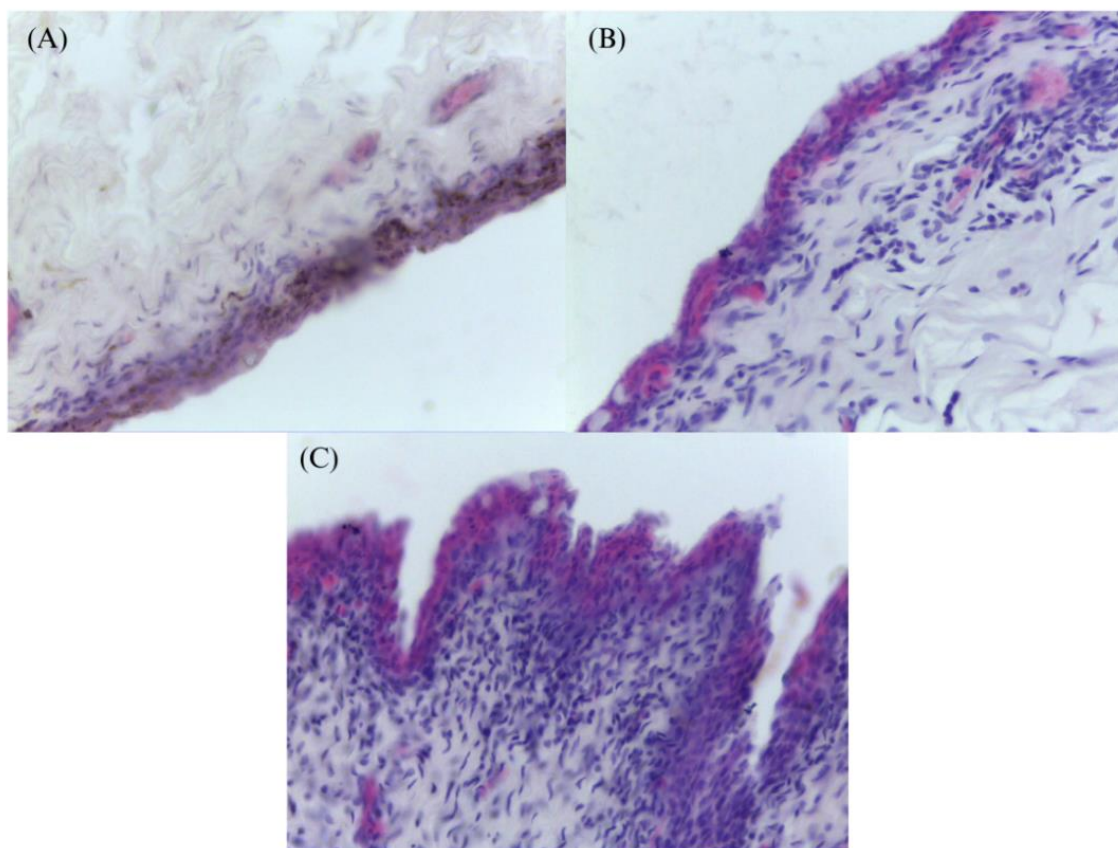


Figura 8. Cortes histológicos de conjuntiva classificados conforme a intensidade do infiltrado inflamatório: (A) leve, (B) moderado e (C) intenso. Coloração por HE. Aumento de 400x.

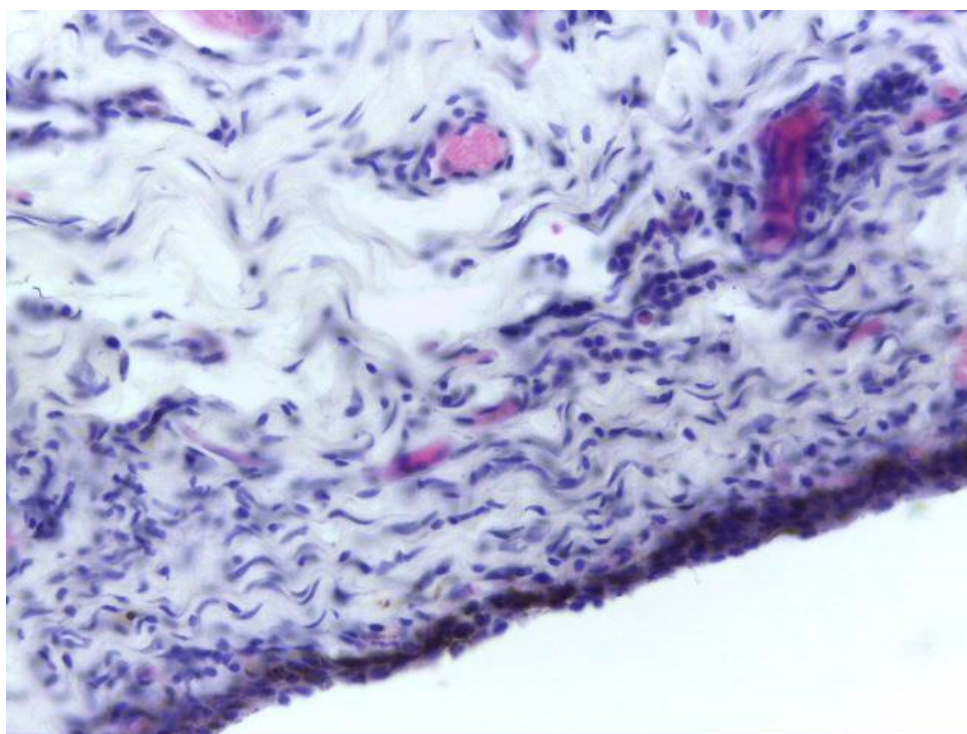


Figura 9. Secção histológica da conjuntiva evidenciando infiltrado inflamatório moderado. Coloração por HE, ampliação de 400x.

Tabela 3 – Correlação de Spearman entre os graus de cristalização pelas escalas de Rolando (1984) e Masmali (2014), células caliciformes (CCCs) e infiltrado inflamatório da conjuntiva palpebral de bovinos.

Comparação	r de Spearman	p-valor	Significância
Rolando × Masmali	0,720	<0,0001	Sim
Rolando × CCCs	-0,176	0,167	Não
Rolando × Infiltrado inflamatório	-0,024	0,849	Não
Masmali × CCCs	-0,059	0,644	Não
Masmali × Infiltrado inflamatório	-0,058	0,652	Não
CCCs × Infiltrado inflamatório	0,182	0,152	Não

Foi descrito o processo de cristalização da lágrima, que se inicia com o aumento da concentração de sais, decorrente da evaporação gradual da fase aquosa, e progride até a completa secagem da amostra (MURUBE, 2004). A formação eficiente dos cristais depende de uma solução com baixa viscosidade, lenta taxa de nucleação e presença mínima de impurezas (ALANAZI et al., 2021). Fatores como maior temperatura, aumento da taxa de evaporação e baixa umidade relativa do ar contribuem significativamente para a intensificação do processo (PEARCE; TOMLINSON, 2000).

Embora os princípios da cristalização lacrimal estejam bem estabelecidos em diversas espécies, os resultados obtidos nas amostras de bovinos indicaram padrões morfológicos distintos dos considerados ideais na literatura. Essa particularidade pode ser atribuída a fatores fisiológicos e ambientais específicos da espécie. A lágrima bovina pode apresentar particularidades em sua composição, incluindo variações na concentração de mucinas, proteínas e eletrólitos, que influenciam diretamente a formação do TCFL.

Além disso, aspectos como a exposição a poeira, vento, variações de temperatura e umidade no ambiente de criação podem alterar as características do filme lacrimal (SILVA et al., 2016; ALANAZI et al., 2021). A própria natureza sutil das transições entre os graus intermediários também pode ter contribuído para a dificuldade na obtenção de padrões de cristalização bem definidos. Tais elementos, combinados, ajudam a contextualizar a predominância dos padrões classificados como tipo III/grau 3 nas amostras avaliadas, sem, no entanto, desqualificar o potencial do teste como ferramenta complementar na avaliação da saúde ocular em bovinos.

Os padrões deficitários observados neste estudo podem refletir não apenas variações fisiológicas da espécie, mas também uma potencial vulnerabilidade na superfície ocular. A integridade do filme lacrimal é reconhecidamente essencial para a proteção da superfície ocular, atuando como barreira física e imunológica contra agentes patogênicos (WILLCOX et al., 2017). A baixa contagem de células caliciformes verificada histologicamente, associada a um infiltrado inflamatório moderado, sugere uma redução na produção de mucina e um estado de irritação conjuntival crônica. Essa condição pode comprometer a qualidade do filme lacrimal, favorecendo a adesão e proliferação de patógenos. Nesse sentido, a predominância de TCFL classificado como

intermediário a ruim pode indicar um estado predisponente ao desenvolvimento de enfermidades como a ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB), especialmente em rebanhos expostos a condições ambientais adversas.

A ausência de correlação significativa entre os padrões de cristalização e os achados histológicos pode ser explicada por fatores biológicos, metodológicos e estatísticos. Do ponto de vista biológico, o TCFL reflete um desfecho funcional complexo, dependente das fases aquosa, lipídica e mucínica da lágrima (LATKANY; MILLER; ZEEV, 2014; ALMUTLEB, 2023), enquanto a histologia oferece um instantâneo estrutural estático. A função secretória e a qualidade das mucinas podem ter maior impacto na cristalização do que o número absoluto de células caliciformes. Metodologicamente, há um desalinhamento inerente: a biópsia captura uma região específica da conjuntiva, enquanto o TCFL integra a composição lacrimal momentânea de toda a superfície ocular (GIPSON, 2004; ALANAZI et al., 2021).

A variabilidade interobservador na classificação dos graus intermediários e o caráter ordinal das escalas utilizadas (tanto para o TCFL quanto para o infiltrado) reduzem a precisão das estimativas e a potência para detectar associações. Por fim, fatores estatísticos, como a distribuição assimétrica da contagem de células caliciformes e a faixa estreita de variação do infiltrado, podem ter limitado a detecção de correlações significativas, sobretudo quando a relação entre mucina e padrão de cristalização ocorre de forma não linear ou apenas após determinados limiares (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014; CHIGBU; MINHAS, 2018). Esses elementos, combinados, ajudam a justificar a ausência de associação direta entre as variáveis avaliadas neste estudo. Por fim, os achados deste trabalho corroboram com dados encontrados em outros trabalhos (SILVA et al., 2016).

A CIB, causada pela bactéria *Moraxella bovis*, representa uma das principais doenças oculares em bovinos, com impacto econômico significativo e associação direta a fatores ambientais como poeira, radiação ultravioleta e traumas oculares (CONCEIÇÃO; GIL TURNES, 2003; DIMA; FIKEDU, 2021). A combinação de um filme lacrimal qualitativamente alterado (sugerido pelo TCFL) com uma barreira de mucina reduzida (indicada pela baixa contagem de células caliciformes) pode criar um cenário favorável à instalação da doença. Assim, embora não sejam diagnósticos isolados, o TCFL e a análise histológica conjuntival emergem como ferramentas auxiliares valiosas na identificação precoce de bovinos com maior risco para doenças oculares, permitindo intervenções de manejo ou profiláticas mais direcionadas.

3. CONCLUSÃO

O presente estudo descreveu, de forma inédita em bovinos, a aplicação combinada do teste de cristalização da lágrima (TCFL), das escalas qualitativas de Rolando (1984) e Masmali (2014), da quantificação pelo software STEPanizer® e da análise histológica conjuntival. Os resultados evidenciaram a predominância de padrões de TCFL intermediários a ruins, com destaque para o tipo III / grau 3 em ambas as escalas, sugestivos de alterações na qualidade do filme lacrimal. Adicionalmente, foi observado que, em bovinos, o TCFL apresentou variados formatos, incluindo estruturas atípicas e padrões distintos dos clássicos descritos na literatura, como cristais pequenos, dispersos ou formas geométricas não ramificadas – padrões estes encontrados em animais clinicamente saudáveis, o que reforça a necessidade de uma avaliação específica para a espécie.

A análise quantitativa pelo STEPanizer® confirmou baixa densidade de cristais e demonstrou correlação negativa significativa com as escalas qualitativas, especialmente com a de Masmali. No entanto, a elevada variabilidade interobservador limitou a reprodutibilidade do método, resultado potencialmente influenciado pelo fato de os avaliadores possuírem treinamento prévio apenas no padrão de cristalização lacrimal de cães, cuja morfologia difere substancialmente daquela encontrada em bovinos. Este aspecto ressalta que o reconhecimento e classificação das imagens podem ser desafios e requerem capacitação específica para cada espécie.

A análise histológica revelou número reduzido de células caliciformes e infiltrado inflamatório predominantemente moderado, sem associação direta com os padrões de cristalização. A baixa densidade de células caliciformes observada pode representar um fator de risco para a saúde ocular em bovinos, uma vez que essas células são produtoras de mucinas, essenciais para a estabilidade e proteção do filme lacrimal. Essa redução pode predispor à adesão de patógenos, como *Moraxella bovis*, aumentando a susceptibilidade a doenças como a ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB).

Em conjunto, os achados reforçam que o TCFL pode ser considerado uma ferramenta complementar, de baixo custo e aplicabilidade prática na avaliação do filme lacrimal em bovinos. Reitera-se, porém, que sua aplicação isolada não permite inferir alterações celulares ou inflamatórias, sendo sua utilidade ampliada quando empregada em associação a métodos histológicos e funcionais, já que cada abordagem fornece informações distintas e complementares sobre a superfície ocular.

Limitações do estudo

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, não foram realizados o teste do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) nem o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS). A ausência do TRFL impede conclusões diretas sobre a estabilidade do filme lacrimal. A opção por não incluir o TLS baseou-se em dois aspectos principais: 1) o bem-

estar animal, visando minimizar procedimentos invasivos e o manejo prolongado; e 2) evidências da literatura em outras espécies que não demonstram correlação consistente entre a produção lacrimal quantitativa (TLS) e os padrões qualitativos de cristalização (TCFL). Adicionalmente, a classificação do TCFL foi realizada por avaliadores treinados majoritariamente em padrões de cães, o que pode ter influenciado a interpretação dos padrões atípicos encontrados em bovinos. Por fim, a amostra é proveniente de uma única raça criada em condições específicas, o que pode limitar a generalização dos achados.

Perspectivas futuras

Futuras pesquisas devem contemplar a padronização do método, avaliar sua reprodutibilidade em bovinos e explorar seu potencial no diagnóstico e monitoramento de enfermidades sanitárias e econômicas, como a ceratoconjuntivite infecciosa bovina. A criação de uma escala específica para bovinos, que contemple seus padrões morfológicos peculiares, é altamente recomendada. Desta forma, este trabalho contribui para a caracterização inicial dos diferentes padrões de TCFL em bovinos e amplia as perspectivas para o avanço do diagnóstico oftálmico na espécie.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANAZI, M. A. et al. Tear Ferning Test as a Valuable Tool to Determine the Quality of Tear Film in Animals and Human. . *EC*, 2021.
- ALMUTLEB, E. S. Assessing the Structure of Tear Ferning in a Group of Healthy Young Subjects: A Pilot Study. *The Open Ophthalmology Journal*, v. 17, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://www.openophthalmologyjournal.com/VOLUME/17/ELOCATOR/e187436412301130/FULLTEXT/>>. Acesso em: 22 ago. 2025.
- ARAÚJO, R. L. S.; CORRÊA, J. R.; GALERA, P. D. Ultrastructural Morphology of Goblet Cells of the Conjunctiva of Dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v. 22, n. 6, p. 891–897, 2019.
- ARGÜESO, P. Human ocular mucins: The endowed guardians of sight. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 180, p. 114074, 1 jan. 2022.
- BECKWITH-COHEN, B. et al. Comparison of tear pH in dogs, horses, and cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 75, n. 5, p. 494–499, 2014.
- BERZINA, I.; TERENTJEVA, A.; KOVALCUKA, L. Difference in cytological findings of healthy and conjunctivitis/keratoconjunctivitis affected canine eyes between variably experienced evaluators. *Veterinary World*, v. 15, n. 7, p. 1852–1856, jul. 2022.
- BRASIL, M. da A. e P. *Mapa do Leite*. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite/>>.
- CHIGBU, D. I.; MINHAS, B. K. Immunopathology of allergic conjunctivitis. *Eur. Med. J*, v. 3, p. 76–83, 2018.
- CONCEIÇÃO, F. R.; GIL TURNES, C. Moraxella bovis: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. *Ciência Rural*, v. 33, p. 779–788, ago. 2003.
- CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Produção de leite é responsável por geração de renda, de empregos e importante fonte de proteína e nutrientes* CRMV-SP, 6 set. 2023. . Disponível em: <<https://crmvsp.gov.br/producao-de-leite-e-responsavel-por-geracao-de-renda-de-empregos-e-importante-fonte-de-proteina-e-nutrientes/>>. Acesso em: 18 maio. 2025.
- DAVIDSON, H. J.; KUONEN, V. J. The Tear Film and Ocular Mucins. *Veterinary Ophthalmology*, v. 7, n. 2, p. 71–77, mar. 2004.
- DIMA, F. G.; FIKEDU, T. Review on infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Bacteriol Infect Dis 2021; 4 (4): 1-6. 2 J Bacteriol Infect Dis 2021 Volume 4 Issue*, v. 4, p. 3, 2021.
- DOUGHTY, M. J. Goblet Cells of the Normal Human Bulbar Conjunctiva and Their Assessment by Impression Cytology Sampling. *The Ocular Surface*, v. 10, n. 3, p. 149–169, 1 jul. 2012.
- FAGEHI, R. et al. Improvement in Tear Ferning Patterns of Sheep Tears After Addition of Various Electrolyte Solutions. *Frontiers in Medicine*, v. 8, 19 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.orghttps://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2021.721969/full>>. Acesso em: 22 abr. 2025.
- FARIAS, E. et al. Comparação de dois métodos de coleta de lágrima para quantificação proteica pelo método de Bradford. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 261–264, fev. 2013.
- FAYAD, A. R. et al. Dry-Eye Syndrome in Shih Tzu Dog: Ocular Surface Clinical and Morphological Aspects in the Different Stages of Keratoconjunctivitis Sicca. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 43, p. e07270, 17 jul. 2023.
- FUNK, L. D. et al. Associations between infectious bovine keratoconjunctivitis at weaning and ultrasonographically measured body composition traits in yearling cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 244, n. 1, p. 100–106, 2014.

- GAFEN, H. B. et al. Relative and Quantitative Characterization of the Bovine Bacterial Ocular Surface Microbiome in the Context of Suspected Ocular Squamous Cell Carcinoma. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, v. 13, n. 12, p. 1976, 13 jun. 2023.
- GELATT, K. J. N. *Veterinary ophthalmology*. 6. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2021.
- GIPSON, I. K. Distribution of mucins at the ocular surface. *Experimental eye research*, v. 78, n. 3, p. 379–388, 2004.
- HARTLEY, C.; WILLIAMS, D. L.; ADAMS, V. J. Effect of Age, Gender, Weight, and Time of Day on Tear Production in Normal Dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v. 9, n. 1, p. 53–57, 2006.
- IZCI, C. et al. Clinical and light microscopic studies of the conjunctival tissues of dogs with bilateral keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 90, n. 3, p. 223–230, 3 abr. 2015.
- KUMAR, S. D.; PRABHAKARAN, K. P.; SUDHARSAN, M. Stage I: Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in a Crossbred Jersey Cow and Its Clinical Management: A Case Report. *The Pharma Innovation Journal*, v. 10, n. 8S, p. 448–450, 2021.
- LATKANY, R.; MILLER, D.; ZEEV, M. S.-B. Diagnosis of Dry Eye Disease and Emerging Technologies. *Clinical Ophthalmology*, p. 581, mar. 2014.
- LEMP, M. A. et al. Tear Osmolarity in the Diagnosis and Management of Dry Eye Disease. *American Journal of Ophthalmology*, v. 151, n. 5, p. 792–798.e1, 1 maio 2011.
- LEONARD, B. C. et al. Comprehensive clinical, diagnostic, and advanced imaging characterization of the ocular surface in spontaneous aqueous deficient dry eye disease in dogs. *Cornea*, v. 38, n. 12, p. 1568–1575, 2019.
- LIU, Y. et al. Imaging Assessment of Conjunctival Goblet Cells in Dry Eye Disease. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 52, n. 5, p. 576–588, 2024.
- LOY, J. D.; CLOTHIER, K. A.; MAIER, G. Component causes of infectious bovine keratoconjunctivitis—non-moraxella organisms in the epidemiology of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 37, n. 2, p. 295–308, 2021.
- MA, J.; RUBIN, B. K.; VOYNOW, J. A. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*, v. 154, n. 1, p. 169–176, 1 jul. 2018.
- MAGGIO, F. Ocular Surface Disease in Dogs Part 1: Aetiopathogenesis and Clinical Signs. *Companion Animal*, v. 24, n. 5, p. 240–245, 2 maio 2019.
- MASMALI, A. M. et al. Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears, and Refresh Plus. *Molecular vision*, v. 24, p. 305, 2018.
- MASMALI, A. M.; MURPHY, P. J.; PURSLOW, C. Development of a new grading scale for tear ferning. *Contact Lens and Anterior Eye*, v. 37, n. 3, p. 178–184, 2014.
- MASMALI, A. M.; PURSLOW, C.; MURPHY, P. J. The Tear Ferning Test: A Simple Clinical Technique to Evaluate the Ocular Tear Film. *Clinical and Experimental Optometry*, v. 97, n. 5, p. 399–406, 1 set. 2014.
- MOORE, C. P. et al. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 28, n. 12, p. 1925–1932, 1 dez. 1987.
- MURUBE, J. Tear crystallization test: two centuries of history. *The Ocular Surface*, v. 2, n. 1, p. 7–9, 2004.
- ORIÁ, A. P. et al. Tear Ferning Test in Healthy Dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v. 21, n. 4, p. 391–398, jul. 2018.
- PAULE, W. J. *The comparative histochemistry of the Harderian gland*. [s.l.] The Ohio State University, 1957.

PEARCE, E. I.; TOMLINSON, A. Spatial Location Studies on the Chemical Composition of Human Tear Ferns. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, v. 20, n. 4, p. 306–313, jul. 2000.

PEARCE, J. W.; MOORE, C. P. Food animal ophthalmology. Em: GELATT, K. N.; GILGER, B. C.; KERN, T. J. (Ed.). *Veterinary Ophthalmology*. 6. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2021. p. 1610–1660.

PECHE, N.; EULE, J. C. Intraocular pressure measurements in cattle, sheep, and goats with 2 different types of tonometers. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 82, n. 3, p. 208–215, 2018.

PINARD, C. L. et al. Normal Anatomical and Histochemical Characteristics of the Lacrimal Glands in the American Bison and Cattle. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 32, n. 5, p. 257–262, out. 2003.

RICCI, C. L. et al. Morphological and Ultrastructural Study of the Palpebral Conjunctiva of Healthy Domestic Cats. *Veterinary Ophthalmology*, v. 26, n. 3, p. 219–224, 2023.

ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret Int J Ophthalmol*, v. 2, n. 4, p. 32–41, 1984.

SAĞLAM, K.; DÜZ, E. Evaluation of tear secretion by phenol red thread test in Holstein cows. *MEDYCYNA WETERYNARYNA-VETERINARY MEDICINE-SCIENCE AND PRACTICE*, v. 78, n. 7, 2022. Disponível em: <<https://avesis.omu.edu.tr/yayin/1a7050d8-def4-4280-a5ed-4cf4fe29b0c2/evaluation-of-tear-secretion-by-phenol-red-thread-test-in-holstein-cows>>. Acesso em: 25 abr. 2025.

SEBBAG, L.; MOCHEL, J. P. An Eye on the Dog as the Scientist's Best Friend for Translational Research in Ophthalmology: Focus on the Ocular Surface. *Medicinal Research Reviews*, v. 40, n. 6, p. 2566–2604, nov. 2020.

SILVA, L. R. et al. Tear Ferning Test in Horses and Its Correlation with Ocular Surface Evaluation. *Veterinary Ophthalmology*, v. 19, n. 2, p. 117–123, mar. 2016.

SIMMS, D. et al. Results of a production analysis survey of cow herds in Kansas (1993). *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, n. 1, p. 128–131, 1993.

UNITED STATES, D. of A. *Production: Beef and Veal – Commodity 0111000*. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/0111000>>. Acesso em: 18 maio. 2025.

VELOSO, J. F. et al. The Use of Tear Ferning Test in Cats for Evaluation of Ocular Surface. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 62, n. 1, p. 23, dez. 2020.

VITOR, R. C. et al. Evaluation of tear film breakup time, Schirmer tear test, blink rate and tear ferning test in Shih-Tzu dogs. 2023a. Disponível em: <<https://scholar.archive.org/work/6ogmarfx6bbh5k7v65lnjzd7iq/access/wayback/https://assets.researchsquare.com/files/rs-3152086/v1/3341ef8a-233f-4e41-81f3-1406e8bf1a02.pdf?c=1705936076>>. Acesso em: 4 dez. 2025.

VITOR, R. C. et al. *Evaluation of tear film breakup time, Schirmer tear test, blink rate and tear ferning test in Shih-Tzu dogs* Research Square, , 21 jul. 2023b. . Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-3152086/v1>>. Acesso em: 22 abr. 2025.

WEIGERT, R. Expand, push, break, release, repair: A unique way to secrete macromolecules. *Science Signaling*, v. 15, n. 752, p. eadd5975, 20 set. 2022.

WELSS, J. et al. The distribution of conjunctival goblet cells in mice. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, v. 234, p. 151664, 1 mar. 2021.

WIESER, B.; TICHY, A.; NELL, B. Correlation between Corneal Sensitivity and Quantity of Reflex Tearing in Cows, Horses, Goats, Sheep, Dogs, Cats, Rabbits, and Guinea Pigs. *Veterinary Ophthalmology*, v. 16, n. 4, p. 251–262, jul. 2013.

WILLCOX, M. D. et al. TFOS DEWS II tear film report. *The ocular surface*, v. 15, n. 3, p. 366–403, 2017.

YOU, Y. et al. Investigation of Conjunctival Goblet Cell and Tear MUC5AC Protein in Patients With Graves' Ophthalmopathy. *Translational Vision Science & Technology*, v. 12, n. 10, p. 19, 27 out. 2023.