

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%)
E CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (0,5%) NO TEMPO
DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES COM
CERATOCONJUNTIVITE SECA E CÃES SAUDÁVEIS E O
EFEITO DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) EM
GATOS SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL**

Gabriela Morais Madruga

CUIABÁ – MT

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%)
E CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (0,5%) NO TEMPO
DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES COM
CERATOCONJUNTIVITE SECA E CÃES SAUDÁVEIS E O
EFEITO DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) EM
GATOS SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL**

Autora: Gabriela Morais Madruga
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pinto Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Barbalho Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Clínica Médica e Cirúrgica, dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestra em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ – MT

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M827e Morais Madruga, Gabriela
EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) E
CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (0,5%) NO TEMPO DE
RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES COM
CERATOCONJUNTIVITE SECA E CÃES SAUDÁVEIS E O EFEITO
DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) EM GATOS
SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL / Gabriela Morais
Madruga. -- 2017
66 f. ; 30 cm.

Orientador: Alexandre Pinto Ribeiro.
Co-orientador: Tiago Barbalho Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2017.
Inclui bibliografia.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) E CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (0,5%) NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA E CÃES SAUDÁVEIS E O EFEITO DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) EM GATOS SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL"

AUTOR : Mestranda Gabriela Morais Madruga

Dissertação defendida e aprovada em 16/02/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutor Alexandre Pinto Ribeiro
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutor Roberto Lopes de Souza
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutor Ivan Ricardo Martinez Padua
Instituição : Universidade Estadual Paulista/UNESP

Examinador Suplente Doutora Valéria Régia Franco Sousa
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CUIABÁ, 16/02/2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não conseguiria conquistar este objetivo.

À minha mãe, por estar sempre ao meu lado tanto presente quanto em pensamentos. Sei que sempre estive presente em suas orações no dia a dia. Tenho o maior orgulho de ter escolhido para vir nesta vida como sua filha.

Ao meu pai, que ausente em minha vida terrestre mas presente na minha vida espiritual, que esteve sempre comigo em todos os momentos. Agradeço a ele por ter me proporcionado a melhor qualidade de vida que ele pôde me proporcionar e sei que hoje ele tem o maior orgulho de mim onde quer que ele esteja.

À minha irmã, que nem sei se chamo de irmã ou de mãe. Agradeço por ser sua irmã, e saber que sempre posso contar com você. Naquelas horas de estresse ela sempre tinha uma palavra positiva para me ajudar e apoiar. Sem palavras para dizer o quanto lhe amo.

Ao meu irmão, por todo apoio e carinho sempre, que mesmo na distância sempre teve orgulho de mim em todos os momentos.

Aos meus cunhados André e Raquel, por me incentivarem na minha caminhada.

Aos meus sobrinhos Lucas e Felipe que são minhas vidinhas.

Ao meu namorado pelo apoio e todo suporte. Mesmo na distância, faz parte de cada conquista, pois sempre me incentivou para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Alexandre pelo apoio e paciência, sempre tentando me ajudar e me ensinar, sou muito grata por tudo.

Aos pacientes que sempre cooperaram para que pudéssemos alcançar nosso objetivo do estudo. Amo demais estes pacientes, que nas horas tristes e cansadas de projeto, chegar ao lado deles e receber um carinho, uma lambida ou uma rronada, um simples olhar nos deixava mais felizes.

Às meninas da residência que me acolheram como irmãs. Que se não fosse elas eu havia desistido de conquistar meu objetivo maior. Mantiveram minha sanidade e me apoiaram até a reta final. Em especial, as minhas companheiras de casa, Bianca e Helena, e amiga de alma e outras vidas Luana.

RESUMO

CAPÍTULO 1

EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO A 0,15% E CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA A 0,5% NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES SAUDÁVEIS E CÃES COM CERATOCONJUNTIVE SECA

Objetivou-se avaliar os efeitos do hialuronato de sódio a 0.15% (HS) e da carboximetilcelulose a 0.5% (CMC) no tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em 10 cães saudáveis e em 32 olhos de cães com ceratoconjuntivite seca (CCS). Ademais, considerou-se quantificar a densidade de células caliciformes (DCC) dos mesmos. O TRFL foi aferido para obtenção de valores basais e em momentos distintos após a instilação do HS e da CMC. A CCS foi graduada em leve, moderada e severa. A DCC foi quantificadas a partir de biópsias conjuntivais. O número da DCC diferiu apenas entre pacientes com CCS leve e severa ($P < 0.01$). O TRFL em cães saudáveis teve um aumento apenas após 1 minuto do tratamento com HS ($P < 0.01$). Relativamente ao período basal e entre os tratamentos, o HS elevou o TRFL de forma mais eficaz e permaneceu por até 30 minutos na superfície ocular, comparativamente à CMC, em todas as categorias de CCS ($P < 0.01$). Ao se agrupar os olhos saudáveis e os com CCS, o TRFL se correlacionou com a DCC ($r = 0.41$, $p = 0.006$). Conclui-se que com a severidade da CCS as CC tende a diminuir, sendo assim a permanência da lágrima na superfície ocular tende a reduzir de forma linear. O HS permanece por maior tempo na superfície ocular que a CMC em cães com CCS, mas que tais substâncias não elevam o TRFL em cães saudáveis.

Palavras-chave: células caliciformes, estabilidade lacrimal, lacrimomiméticos, instilações.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO A 0,15% NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE GATOS SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL

Objetivou-se avaliar os efeitos do colírio hialuronato de sódio (HS 0,15%) no tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em 13 gatos antes do procedimento anestésico e em 39 gatos submetidos à anestesia geral, além de quantificar a densidade de células caliciformes (DCC). O TRFL foi aferido para obtenção de valores basais e em momentos distintos após a instilação do HS em ambos grupos. As CC foram realizadas através de biópsias conjuntivais. Média± desvio padrão da densidade de células caliciformes dos gatos não submetidos ao procedimento anestésico no OD foi de $122,9 \pm 30,90$ e no OE $120,2 \pm 38,80$ ($p=0,84$). Decorridos 1, 10 e 20 minutos da instilação, o TRFL foi $10,73 \pm 3,32$, $10,98 \pm 3,94$ e $12,38 \pm 3,25$ segundos, respectivamente no grupo pré anestesia ($p=0,33$). Observou-se correlação entre o número de células caliciformes e o TRFL no período basal ($p=0,02$; $r=0,60$) e não houve correlação após os tratamentos. O TRFL decresceu significativamente nos três períodos dos olhos controles dos pacientes anestesiados comparados ao basal ($p<0,001$). Observou-se que o TRFL se elevou significativamente apenas no primeiro período após a anestesia (T40) ($p<0,0001$) dos olhos tratados com HS. Em todos os períodos avaliados, os olhos tratados com HS apresentaram TRFL significativamente mais altos que os olhos controles dos gatos anestesiados ($p<0,001$). Conclui-se que o número de células caliciformes se correlaciona com o TRFL, mas que a instilação de hialuronato de sódio a 0,15% não eleva o TRFL em gatos que apresentarem produção lacrimal normal. Em gatos anestesiados, o hialuronato de sódio foi capaz de manter a estabilidade do filme lacrimal por 60 minutos após a sua instilação. Recomenda-se o monitoramento da produção lacrimal e a instilação de HS a cada 60 minutos em gatos que forem submetidos a anestesia geral.

Palavras-chave: olhos de gatos, biópsia conjuntival, células caliciformes, lacrimomiméticos, distúrbios quali-quantitativo da lágrima

ABSTRACT

CHAPTER 1

EFFECTS OF THE 0.15% SODIUM HIALURONATE AND 0.5% CARBOXYMETHYLCELLULOSE ON TEAR FILM BREAKUP TIME IN DOGS WITH KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA AND IN HEALTHY DOGS.

This study aimed to evaluate the effect of the 0.15% sodium hyaluronate (SH) and of 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) on tear film breakup time (TFBUT) in 10 healthy dogs and in 32 eyes of dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS). In addition, the goblet cell density (GCD) of this population was quantified. TFBUT was assessed at baseline and at different time points following the instillation of SH and CMC. KCS was graded as mild, moderate and severe. GCD were quantified from conjunctival biopsies. The number of GCD differed significantly between patients with mild and moderate KCS ($P<0.01$). TFBUT of healthy dogs increased only at 1 minute after treatment with SH ($P<0.01$). Regarding baseline and treatments, SH significantly increased TFBUT for up to 30 minutes on the ocular surface, in comparison to CMC, in all categories of KCS ($P<0.01$). TFBUT and GCD correlated positively when the healthy and diseased eyes were grouped ($r=0.41$, $P=0.006$). It can be concluded that in GCD the TFBUT showed that the tear film stability tends to reduce in a linear fashion from the mild to severe form of KCS. And in dogs with KCS, SH lasts longer periods on the ocular surface than CMC, but such agents does not increase TFBUT in healthy dogs.

Keywords: goblet cells, tear stability, lacrimomimetics, instillations

CHAPTER 2

EFFECT OF 0.15% SODIUM HYALURONATE ON TEAR FILM BREAK UP TIME OF HEALTHY CATS, BEFORE AND AFTER GENERAL ANAESTHESIA

This study aimed to evaluate the effect of eye drops sodium hyaluronate (SH 0.15%) on tear film rupture time (TRFL) in 13 cats before anaesthetic procedure and in 39 cats submitted to general anaesthesia. In addition, Goblet cells (CC) were quantified through conjunctival biopsies. TFBUT was measured to obtain basal values and at different times after instillation of SH in both groups. Mean \pm standard deviation of the goblet cell density of cats not submitted to the anaesthetic procedure in the OD was 122.9 ± 30.90 and in the OS was 120.2 ± 38.80 ($p = 0.84$). After 1, 10 and 20 minutes of instillation, the TFBUT was 10.73 ± 3.32 , 10.98 ± 3.94 and 12.38 ± 3.25 seconds, respectively in the pre-anaesthetic group ($p = 0.33$). A correlation was observed between the number of goblet cells and TFBUT at baseline ($p = 0.02$, $r = 0.60$) and there was no correlation after treatments. TFBUT of the control eyes of the anesthetized patients were observed to decrease significantly in the three periods after anaesthesia compared with basal ($p < 0.001$). TFBUT significantly increased only in the first period after anaesthesia in SH treated eyes (T40) ($p < 0.0001$). In all evaluated periods, SH treated eyes showed significantly higher TFBUT than the control eyes ($p < 0.001$). It can be concluded that the number of goblet cells correlates with TFBUT but that instillation of 0.15% sodium hyaluronate does not elevate TFBUT in cats with normal lacrimal production. In anesthetized cats, sodium hyaluronate was able to maintain the stability of the tear film for 60 minutes after instillation. Monitoring of lacrimal production and SH instillation is recommended every 60 minutes in cats undergoing general anaesthesia.

Keywords: cat eyes, conjunctiva specimen, goblet cells, lacrimomimetics, qualitative disorder of the tears.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Nota-se o sinal de ruptura do filme lacrimal, interpretado pela observação de estrias escuras na superfície ocular de cor verde-amarelada.....13

Figura 2. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) antes (basal) e após 1, 5 e 10 minutos da instilação de hialuronato de sódio a 0,15% e de carboximetilcelulose a 0,5% em cães saudáveis. * $p < 0,01$ em relação ao basal e aos demais momentos de ambos os tratamentos.....15

Figura 3. Olhos de cães com ceratoconjuntivite (CCS) leve (A), moderada (B e severa (C). Em A pode se observar leve edema em um cão com CCS leve. Observe em B, melanose corneal (seta preta) e neovascularização em cão com CCS moderada. Observe em C a neovascularização e a melanose corneal (seta laranja), além da oftalmorréia exacerbada em um cão com CCS severa.16

Figura 4. Comparações entre os valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) entre os cães saudáveis e os pacientes com ceratoconjuntivite seca leve, moderada e severa.17

Figura 5. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) antes (basal) e após 1, 5, 10, 30 e 60 minutos da instilação do hialuronato de sódio a 0,15% (barras cinzas) e da carboximetilcelulose a 0,5% (barras brancas) em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS) leve (A e D), moderada (B e E) e severa (C e F). Valores de p sobre as barras diferem significativamente do período basal.....18

Figura 6. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal, antes (basal) e após 1, 5, 10, 30 e 60 minutos dos tratamentos com hialuronato de sódio à 0,15% (triângulo fechado) e carboximetilcelulose à 0,5% (círculo aberto) em cães com CCS leve (A), moderada (B), severa (C) e o agrupamento das 3 categorias (D). *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,0001$) em relação aos tratamentos.....19

Figura 7. Imagens representativas da marcação das células caliciformes (setas) em cães com CCS leve (A), moderada (B) e severa (C) Barra=20µm. Em D, observa-se os valores das células caliciformes entre os cães saudáveis e os com ceratoconjuntivite seca (CCS) leve, moderada e severa.....20

Figura 8. Gráfico da regressão linear mostrando correlação positiva entre o tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) e o número de células caliciformes, ao se agrupar os 10 olhos dos cães saudáveis e os 32 olhos de pacientes com ceratoconjuntivite seca leve, moderada e severa. A linha tracejada representa o intervalo de confiança de 95%.....21

Figura 9. Olho de gato demonstrando o aparecimento de estrias escuras (seta) no filme lacrimal fluorescente no canto dorsolateral da superfície ocular.....31

Figura 10. Imagem representativa da marcação das células caliciformes (setas) em gatos. Ácido Periódico de Schiff (PAS) de conjuntiva bulbar ventral de um gato saudável. Barra=20µm.....33

Figura 11. Curva de regressão linear (linha sólida), intervalo de confiança de 95% (linha pontilhada) e dispersão dos valores (círculos) demonstrando correlação positiva ($r=0,60$; $p=0,02$) entre o tempo de ruptura do filme lacrimal e a densidade de células caliciformes no período basal em gatos não anestesiados.....35

Figura 12. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) do período basal de gatos não anestesiados (barras brancas) e aos 40, 75 e 120 minutos após o início da anestesia nos olhos controle (A) e nos olhos tratados com uma gota de hialuronato de sódio a 0,15% (B). $*(p<0,001)$, $** (p<0,0001)$, relativamente aos demais momentos.....37

Figura 13. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal do período basal de gatos não anestesiados e aos 40, 75 e 120 minutos do início da anestesia (seta) nos olhos controle e nos olhos tratados com uma gota (seta tracejada) de hialuronato de sódio a 0,15%. $** (p<0,0001)$, $*(P=0,0092)$ em relação aos tratamentos.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média±desvio padrão (valores mínimo e máximo) do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos (s), entre os olhos direito e esquerdo no período basal e decorridos 1, 10 e 20 minutos (min) das instilações de hialuronato de sódio a 0,15% (HS). Na linha inferior, observam-se os resultados do teste de correlação de Person entre o TRFL e a densidade de células calciformes (DCC) em todos os períodos avaliados.....35

Tabela 2. Média±desvio padrão (valores mínimo e máximo) do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos, nos olhos controle e naqueles tratados com hialuronato de sódio a 0,15% ao final da anestesia (T40) e decorridos 35 (T75) e 80 minutos (T120) do final da anestesia.....36

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS- Ceratoconjuntivite seca
TRFL – Tempo de ruptura do filme lacrimal
TLS – Teste da lágrima de Schirmer
HS – Hialuronato de sódio
CMC- Carboximetilcelulose
PAS – Ácido periódico de Schiff
H&E – Hematoxilina e eosina
DQFL - diminuição qualitativa do filme lacrimal
HVF-1 – Herpes Vírus Felino do tipo 1
DCC- Densidade de células calciformes
CC- Células calciformes
OD- Olho direito
OE- Olho esquerdo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) E CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (0,5%) NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES COM CERATOCONJUNTIVE SECA E CÃES SAUDÁVEIS.	10
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 Aspectos éticos.....	11
2.2 Delineamento experimental	12
2.3 Histopatológicos das conjuntivas.....	14
2.3 Análise estatística	14
3 RESULTADOS.....	15
4 DISCUSSÃO	21
5 CONCLUSÃO	24
6 REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO A 0,15% NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE GATOS SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Aspectos éticos.....	30
2.2 Delineamento experimental	30
2.2.1 Pacientes não anestesiados	30
2.2.2 Pacientes submetidos à anestesia geral.....	32
2.3 Histopatológicos das conjuntivas.....	32
2.3 Análise estatística	34
3 RESULTADOS.....	34
4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÃO	42
6 REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO.....	46
APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	60
APÊNDICE C – QUALIS DO PERIÓDICO	61

CAPÍTULO 1- EFEITO DOS COLÍRIOS HIALURONATO DE SÓDIO (0,15%) E CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (0,5%) NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE CÃES COM CERATOCONJUNTIVE SECA E CÃES SAUDÁVEIS

1 INTRODUÇÃO

Em cães, as desordens do filme lacrimal são mais comumente originadas pela redução na produção da sua parte aquosa e denomina-se ceratoconjuntivite seca (CCS). Nessa espécie, a principal causa da CCS é a inflamação idiopática mediada por linfócitos T e B que levam a destruição das glândulas lacrimais (Giuliano, 2013). Outras causas incluem traumas, diabetes, hipotireoidismo, leishmaniose, cinomose, o uso de fármacos (atropina, etodolaco e as sulfonamidas), a remoção iatrogênica da glândula lacrimal da membrana nictitante e a blefaroconjuntivite crônica causada por anormalidades palpebrais e dos cílios (Ribeiro, 2015). Em cães, desordens qualitativas também podem se manifestar, sendo oriundas da deficiência da camada lipídica (produzida pelas glândulas tarsais) ou mucinosa (produzida pelas células calciformes conjuntivais), promovendo a instabilidade e a evaporação prematura do filme lacrimal (Williams, 2008; Ribeiro, 2015). O teste da lágrima de Schirmer (TLS) é a principal ferramenta utilizada para o diagnóstico da CCS em cães (Featherstone e Heinrich, 2013). Todavia, pacientes com anormalidades qualitativas podem apresentar TLS normal e redução no tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL). Ambas anormalidades da lágrima ensejam quadros de conjuntivite, desconforto ocular e ceratites (não ulcerativa e ulcerativa) que podem levar a cegueira (Williams, 2008; Ribeiro, 2015). Como tratamento dessas doenças, preconiza-se a lubrificação da superfície ocular com lacrimomiméticos até que lacrimoestimulantes como a ciclosporina ou o tacrolimus elevem o quantitativo aquoso da lágrima (Williams 2008; Ribeiro, 2015).

Lacrimomiméticos são lubrificantes sintéticos que complementam um ou mais componentes do filme lacrimal, aumentando o volume e a estabilidade dessa película, além de proteger a superfície ocular contra a dessecação (Araujo e Galera, 2016). O hialuronato de sódio (HS) é um glicosaminoglicano presente na lágrima com excelentes propriedades viscoelásticas, lubrificantes e de retenção de água (Araujo e Galera, 2016). A carboximetilcelulose (CMC) é o agente mais comumente

utilizado nas formulações comerciais e possui propriedades mucoadesivas e viscoelásticas que retêm o agente na superfície ocular (Araujo e Galera, 2016).

As células caliciformes são as células secretoras de muco da conjuntiva. A função deste muco pré ocular é na hidratação, lubrificação, limpeza e defesa contra patogênicos para a córnea (Cullen et al., 1999). A avaliação das células caliciformes é importante pois é um método indireto de avaliação da fase qualitativa do filme lacrimal (Sebbag et al., 2016). Relatado em cães a grande quantidade de células caliciformes no fórnix ventromedial (Moore et al., 1987), assim como em cavalos (Bourges-Abella et al., 2007).

A permanência na superfície ocular do HS e da CMC, já foram determinados em humanos com CCS, assim como em coelhos e ratos com CCS induzida experimentalmente (Mengher et al., 1986; Hamano et al., 1996; Johnson et al., 2006; Lee et al., 2011; Zheng et al., 2014; Yao et al., 2015). Estudos realizados em cães com CCS apenas demonstraram que o HS e diferentes lacrimomiméticos melhoram clinicamente os sinais relativos ao ressecamento da superfície ocular (Williams e Mann 2013, Hasegawa et al., 2016). Embora a literatura recomende que lacrimomiméticos sejam instilados de 4 a 6 vezes ao dia no início da terapia, nenhum estudo relativo ao tempo de retenção dessas substâncias na superfície ocular foi conduzido em cães (Williams e Mann 2013; Ribeiro, 2015).

Frente ao exposto, objetivou-se avaliar e comparar os efeitos do HS à 0,15% e da CMC a 0,5% sobre a estabilidade do filme lacrimal, através do TRFL em cães saudáveis e com CCS em diferentes estágios. Considerando que o número de células caliciformes (CC) pode ser utilizado para se auxiliar no diagnóstico de CCS e que apenas um estudo avaliou esse parâmetro em cães com CCS qualitativa (Cullen et al., 2005), considerou-se avaliar possíveis correlações entre a densidade de células caliciformes sobre os valores do TRFL na mesma população de cães estudada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O estudo experimental, conduzido em cães saudáveis e o estudo clínico, conduzido em pacientes com CCS foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso com os n° de protocolo 23108.118102/2015-51 e 23108.188779/2016-59.

2.2 Delineamento experimental

Como critério de seleção, os indivíduos foram submetidos ao exame clínico geral e oftálmico. Ademais, hemograma completo e avaliação da alaminotransferase, creatinina e uréia, foram realizados. Dentre os cães saudáveis, selecionaram-se 8 fêmeas e 2 machos, com peso médio de 2,5kg, das raças Poodle (n=4) e Yorkshire (n=6). Os 10 cães saudáveis foram alojados em gaiolas individuais, em uma sala com umidade relativa do ar entre 60 e 62% e temperatura 22 a 26°C, mantidos com água e comida a vontade.

Pacientes com TLS igual ou inferior a 15mm/minuto, que apresentassem pelo menos um dos sinais clínicos: oftalmorréia, hiperemia conjuntival, edema, neovascularização e melanose corneais foram diagnosticados com CCS. O grau de CCS foi distribuído de acordo com o TLS em três categorias: leve (11-15mm/min); moderado (6-10mm/min) e severo (0-5mm/min).

Previamente ao início do experimento, os indivíduos saudáveis foram adaptados por um período de 7 dias aos exames e aos examinadores. Para realização do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), instilou-se 0,1mL de fluoresceína sódica 1% (Allergan, Inc., São Paulo) sobre a conjuntiva bulbar dorsolateral dos cães. Após a instilação as pálpebras foram fechadas, ao se abrir havia o disparo do tempo por cronômetro. A superfície dorsolateral da córnea foi observada com auxílio de biomicroscópio com lâmpada de fenda (SL-14®, Kowa, Tokyo, Japan), com magnificação de 16x e filtro azul de cobalto para intensificar a luminescência da fluoresceína. A contagem se encerrou ao obter o primeiro sinal de ruptura do filme lacrimal, que foi interpretado pela observação de estrias escuras na superfície ocular de cor verde-amarelo (Fig. 1). O TRFL foi realizado individualmente para cada olho nos cães saudáveis.

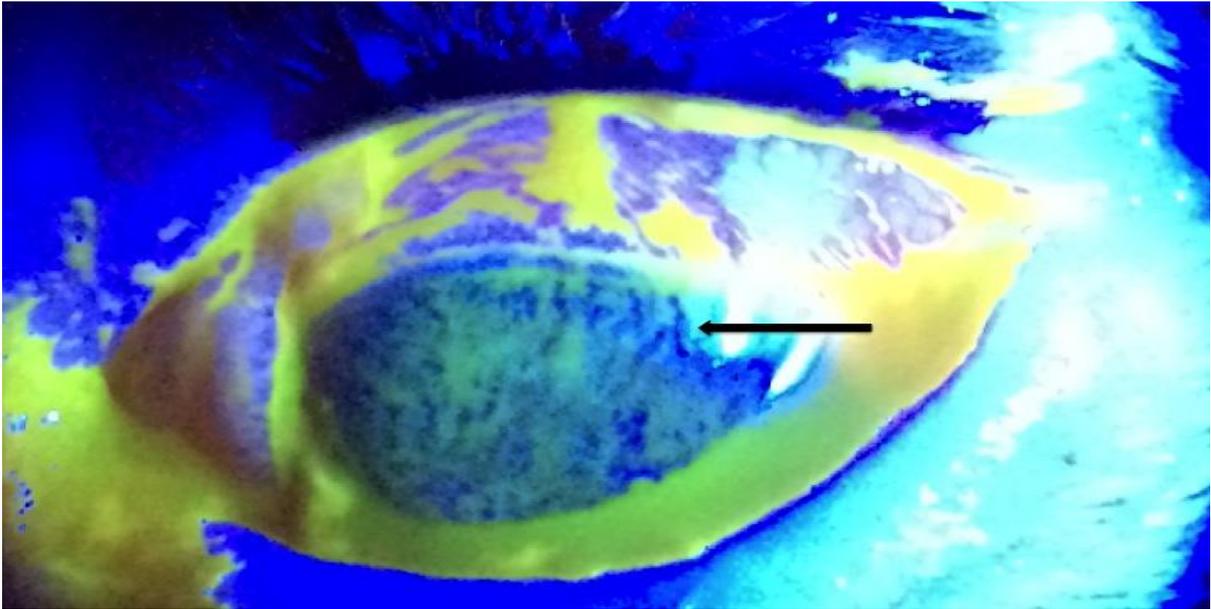


Figura 1. Nota-se o sinal de ruptura do filme lacrimal, interpretado pela observação de estrias escuras na superfície ocular de cor verde-amarelada. Imagem representativa de um TRFL de um cão do experimento com ceratoconjuntivite seca severa.

Após o período de adaptação, o TRFL foi aferido como descrito previamente para obtenção de valores basais. Posteriormente, o TRFL foi aferido decorridos 1, 5 e 10 minutos da instilação de uma gota de HS a 0,15% (Hyabak[®]) ou de CMC a 0,5% (FreshTears[®]). Em todas as avaliações, o examinador não tinha conhecimento se o indivíduo havia recebido ou não tratamento, tampouco quanto tempo havia decorrido da instilação dos fármacos a serem testados. Ainda, para evitar viés relativos a estimulação da produção de lágrima, cada aferição do TRFL, foi feita com intervalos regulares de 24 horas entre si. No período de adaptação e na fase experimental, o TRFL foi aferido sempre as 13 horas.

A mesma metodologia adotada para realização do teste do TRFL nos cães saudáveis foi repetida nos pacientes doentes. Entretanto, o período de adaptação ao TRFL foi de apenas dois dias, sendo que ao terceiro dia, valores basais do TRFL foram estabelecidos. Posteriormente, o TRFL foi aferido decorridos 1, 5, 10, 30 e 60 minutos da instilação de uma gota de HS a 0,15% (Hyabak[®]) ou de CMC a 0,5% (FreshTears[®]). Os mesmos critérios relativos aos intervalos entre as avaliações e aos horários estabelecidos para os cães saudáveis foram adotados para os cães com CCS.

2.3 Histopatológicos das conjuntivas

Ao final do último dia de experimento com os cães saudáveis e naqueles com CCS, um fragmento (3,0 X 3,0 X 3,0 mm de diâmetro) do fórnix da conjuntiva bulbar ventral, próxima ao canto nasal de ambos os olhos foi removida. O procedimento foi realizado após antissepsia dos olhos com polivinilpirrolidona-iodo (1:40) e decorridos 2 minutos da instilação de uma gota cloridrato de proximetacaína a 0,5% (Anestalcon®Alcon, São Paulo, SP, Brasil). Os fragmentos foram acondicionados em tubos de 1,5 ml e fixados por 24 horas em solução de formaldeído a 10 %. Posteriormente, as amostras foram processadas de forma rotineira e coradas com Hematoxilina e Eosina Ácido Periódico de Schiff (H&E e PAS). A quantificação das células caliciformes foi avaliada e contada a partir de 200 núcleos de células epiteliais da conjuntiva basal e a quantidade de células caliciformes presentes no mesmo local (Moore et al., 1987). Foram avaliados em objetiva de 40x e o número total foi determinado através da média.

2.3 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos cães saudáveis, para as análises estatísticas relativas ao TRFL e a densidade das células caliciformes (DCC) foram consideradas as médias entre os olhos direito (OD) e esquerdo (OE). Comparações dos valores do TRFL entre os períodos foram avaliados pela análise de variância de via única (1-ANOVA) para medidas repetidas, nos cães saudáveis e pela 1-ANOVA para os pacientes com CCS, ambos, com posterior avaliação pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. Os valores do TRFL entre os tratamentos foram avaliados pelo teste de análise de variância de via dupla, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Comparações relativas ao número de células caliciformes e ao TRFL entre os cães saudáveis e as diferentes categorias de cães com CCS foi realizada pelo teste 1-ANOVA, com posterior avaliação pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. Possíveis correlações entre o número de células caliciformes e o TLS foram avaliadas pelo teste de Person. Em todas as ocasiões, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados encontram-se descritos na forma de média \pm erro padrão.

3 RESULTADOS

Os resultados encontram-se expressos na forma de média \pm erro padrão (EP). Nos cães saudáveis, não houve diferença significativa relativamente ao TRFL entre o OD e OE, aferido antes e após as instilações de CMC ($p=0,24$) e HS ($p=0,23$). A média entre o OD e OE do TRFL aferido no período basal, foi de $11,34 \pm 4,3$ segundos. Decorridos 1 ($p=0,46$), 5 ($p=0,95$) e 10 minutos ($p=0,99$) da instilação da CMC, não se observou elevação no TRFL em comparação ao período basal (Fig. 1). Na instilação com HS, observou-se elevação no TRFL, apenas no primeiro minuto de avaliação, quando comparado ao basal ($p=0,003$) e aos demais momentos ($p<0,01$) (Fig. 2). Na comparação entre a CMC e o HS, o TRFL teve um aumento significativo de 3,8 segundos ($p<0,01$), apenas no primeiro minuto, após o tratamento com HS, quando comparado com o tratamento com CMC (Fig. 2).

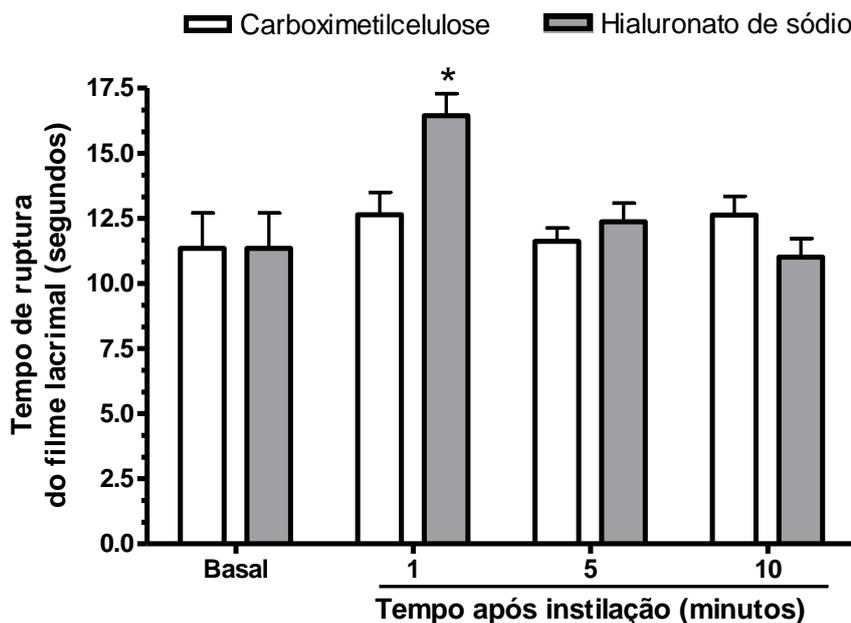


Figura 2. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) antes (basal) e após 1, 5 e 10 minutos da instilação de hialuronato de sódio a 0,15% e de carboximetilcelulose a 0,5% em cães saudáveis. * $p<0,01$ em relação ao basal e aos demais momentos de ambos os tratamentos

Trinta e dois olhos de 24 pacientes (14 fêmeas e 10 machos) apresentaram os critérios de inclusão, sendo que em 16, apenas um olho estava acometido e em

8, ambos os olhos estavam acometidos. As raças dos pacientes estudados eram boxer (n=1 olho), shi tzu (n=4 olhos), pequinês (n=1 olho), poodle (n=8 olhos), bulldog francês (n=1 olho), beagle (n=2 olhos), lhasa apso (n=3 olhos) e sem raça definida (n=12 olhos). A CCS dos 32 olhos selecionados ainda foi subdividida em categorias de acordo com o valor do TLS em: leve (11-14mm, n=10 olhos), moderada (6-10mm, n=10 olhos) e severa (0-5mm, n=12 olhos) (Fig 3 A-C).

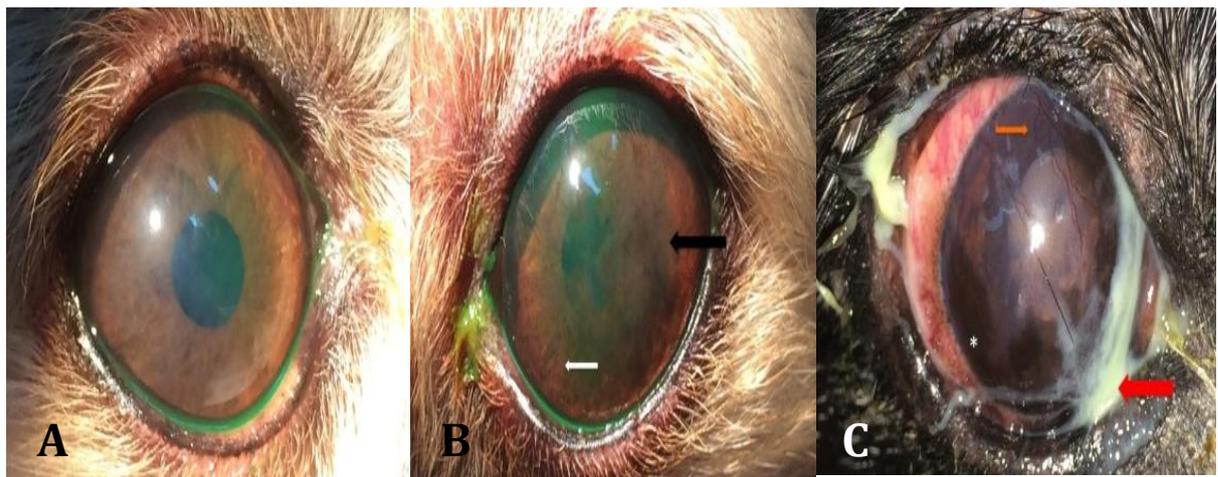


Figura 3. Olhos de cães com ceratoconjuntivite (CCS) leve (A), moderada (B e severa (C). Em A pode se observar leve edema em um cão com CCS leve. Observe em B, melanose corneal (seta preta) e neovascularização em cão com CCS moderada. Observe em C a neovascularização e a melanose corneal (seta laranja), além da oftalmorréia exacerbada em um cão com CCS severa.

Nos pacientes com CCS leve, moderada e severa, o TRFL aferido no período basal foi, respectivamente, $8,04 \pm 0,38$, $5,59 \pm 0,31$ e $4,44 \pm 0,33$ segundos. Ao se agrupar os 32 olhos das três categorias, o tempo do TRFL foi de $5,93 \pm 0,33$ segundos. Os valores do TRFL dos cães saudáveis diferiram significativamente das demais categorias de pacientes com CCS ($p < 0,01$) (Fig. 4). Nas comparações entre as categorias, se observou significância apenas entre os pacientes com CCS leve e severa ($p < 0,01$) (Fig. 4).

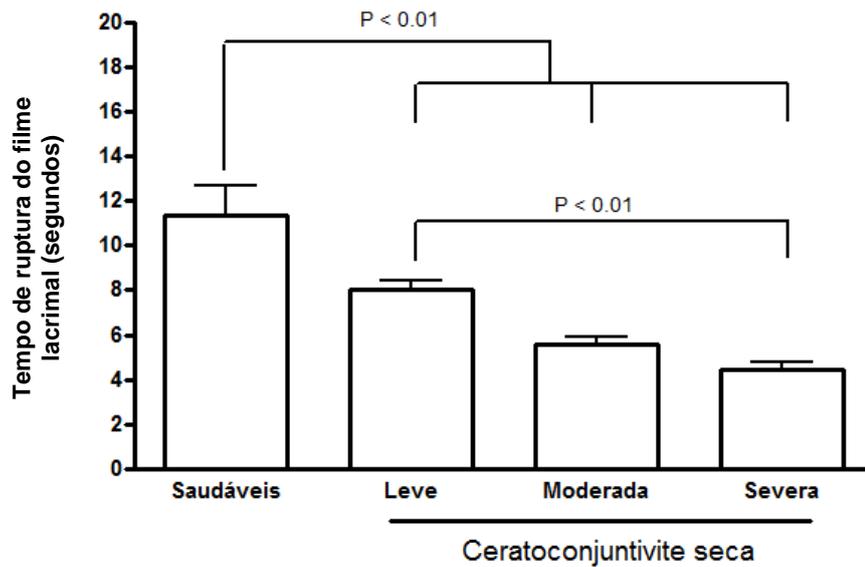


Figura 4. Comparações entre os valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) entre os cães saudáveis e os pacientes com ceratoconjuntivite seca leve, moderada e severa.

Nos cães que apresentaram CCS leve, o TRFL só se elevou significativamente decorridos 1 minuto da instilação da CMC ($p=0,0005$) (Fig. 5A). Nos pacientes com CCS moderada e severa, esse parâmetro se elevou significativamente do primeiro ao 10 minuto da instilação da CMC ($p<0,05$) (Fig. 5B e C). Após a instilação do HS nos pacientes com CCS leve, o TRFL se elevou significativamente apenas até o 10º minuto ($p<0,05$) (Fig. 5D), sendo que nas categorias moderada e severa, esse parâmetro se elevou significativamente até o 30º minuto de avaliação ($p<0,05$) (Fig. 5D e F).

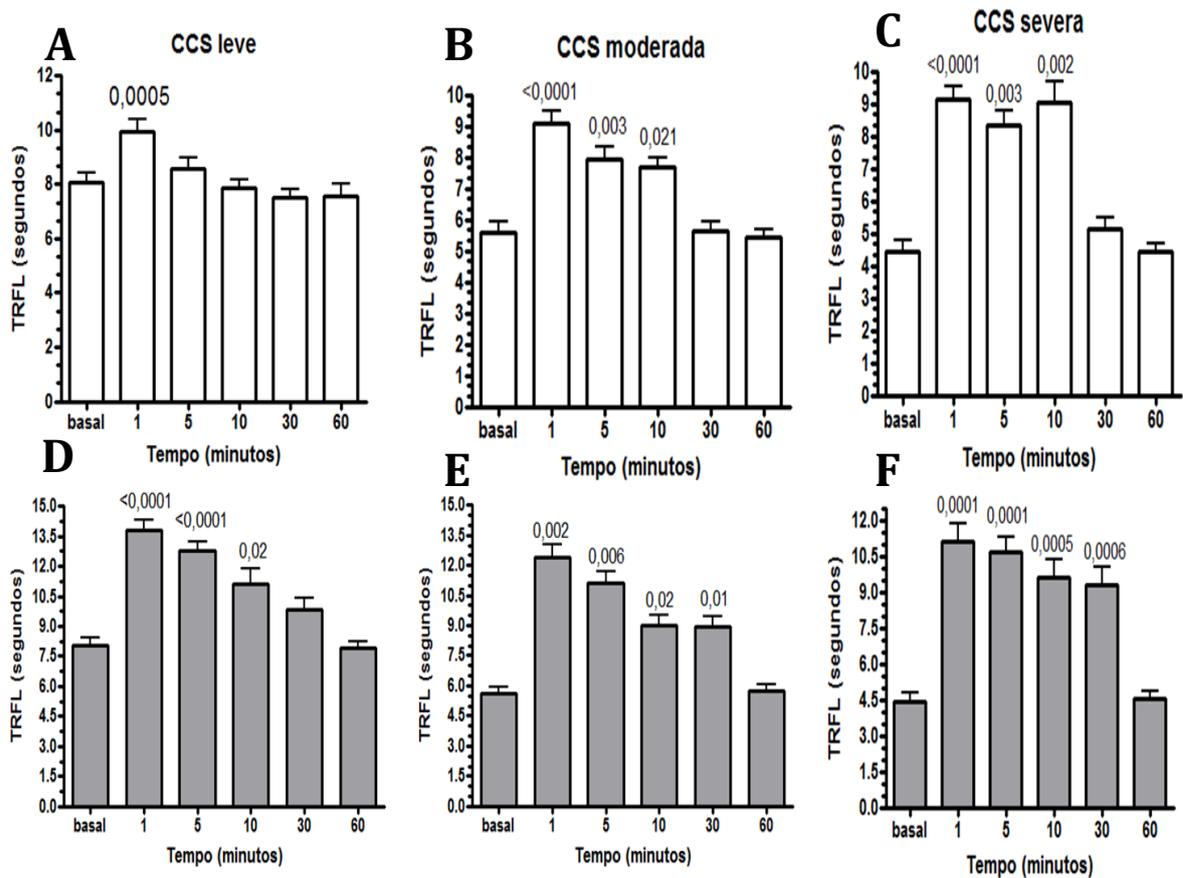


Figura 5. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) antes (basal) e após 1, 5, 10, 30 e 60 minutos da instilação do hialuronato de sódio a 0,15% (barras cinzas) e da carboximetilcelulose a 0,5% (barras brancas) em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS) leve (A e D), moderada (B e E) e severa (C e F). Valores de p sobre as barras diferem significativamente do período basal.

Nas comparações entre os tratamentos, observou-se que o HS elevou significativamente o TRFL ($p < 0,01$), comparativamente à CMC, em quase todos os momentos avaliados e em todas as categorias de CCS (Fig. 6A, B e C). Ao se agrupar os 32 olhos com CCS, o HS elevou o TRFL ($p < 0,01$), do primeiro ao 30º minuto de avaliação (Fig. 6D).

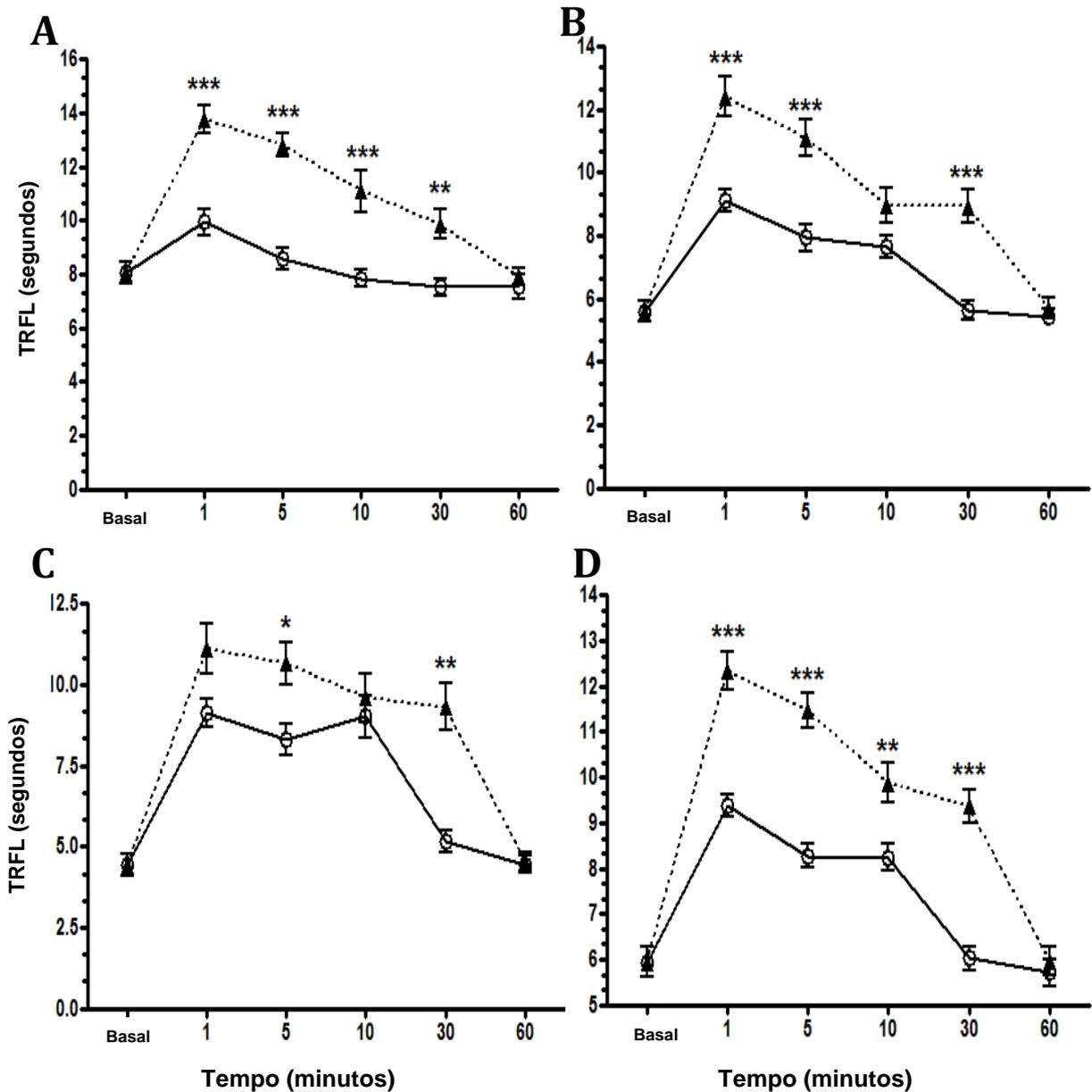


Figura 6. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal, antes (basal) e após 1, 5, 10, 30 e 60 minutos dos tratamentos com hialuronato de sódio à 0,15% (triângulo fechado) e carboximetilcelulose à 0,5% (círculo aberto) em cães com CCS leve (A), moderada (B), severa (C) e o agrupamento das 3 categorias (D). *(p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,000/1) em relação aos tratamentos.

A média da densidade das células calciformes (DCC) entre o OD e o OE de cães saudáveis foi de 111 ± 5.76 (Fig. 7A). A média da DCC nas categorias de CCS leve, moderada e severa, foram, respectivamente, $109,2 \pm 5,22$, $88,1 \pm 10,71$ e $47,25 \pm 11,11$ (Fig. 7B, C e D). O número de CC dos cães saudáveis foi significativamente maior, apenas quando comparada com a dos pacientes com CCS severa (p<0,01) (Fig. 7E). Nos pacientes com CCS, se observou diminuição nas CC

entre as categorias leve e severa ($p < 0,001$) (Fig. 7C). Nos cães saudáveis, não houve correlação entre o TRFL e o número de CC ($r = 0,11$, $p = 0,33$). Também não se observou correlação entre o TRFL e as CC na CCS leve ($r = 0,11$, $p = 0,74$), moderada ($r = -0,01$, $p = 0,95$) e severa ($r = 0,08$, $p = 0,79$). Todavia, ao se correlacionar o TRFL e as CC, agrupando-se os cães saudáveis e as diferentes categorias de CCS, se observou significância ($r = 0,41$, $p = 0,006$) (Fig. 8).

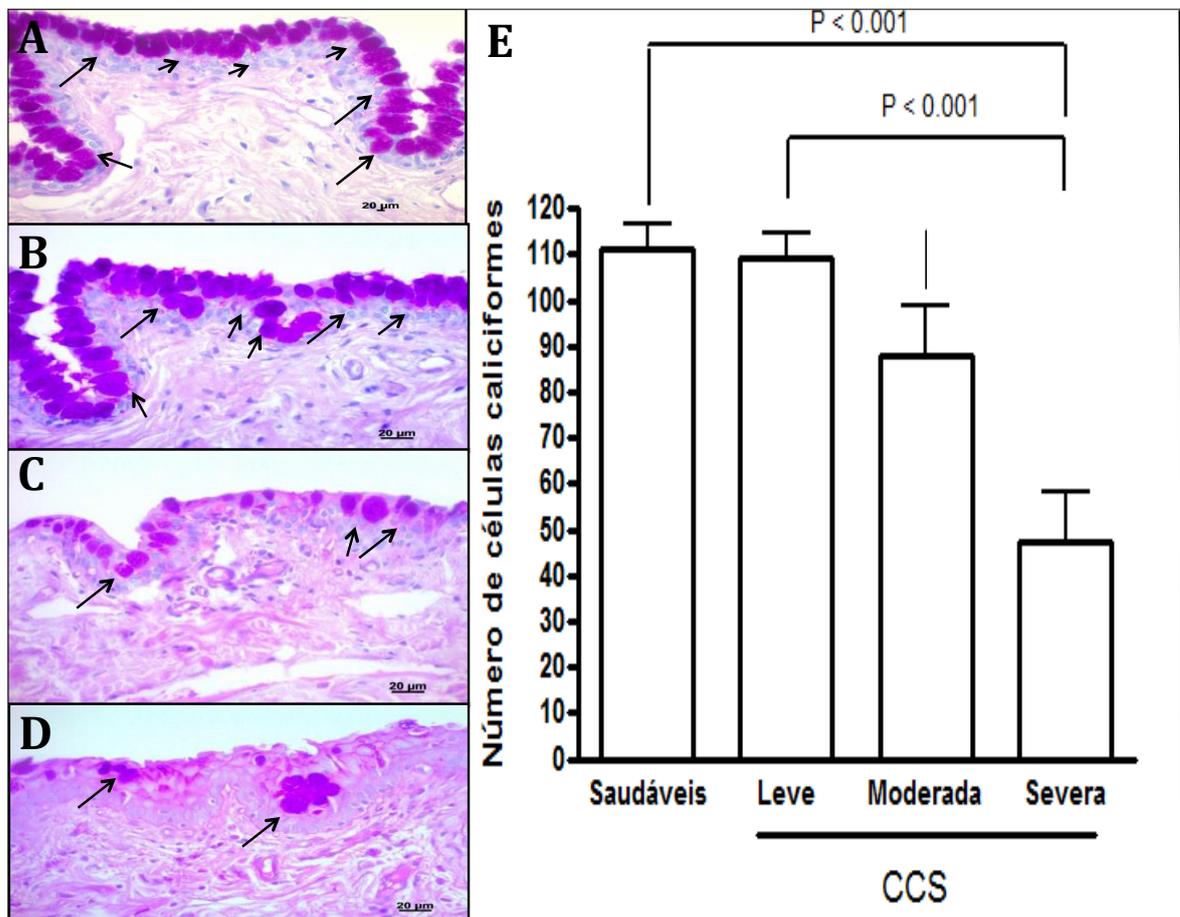


Figura 7. Imagens representativas da marcação das células caliciformes (setas) em cães saudáveis (A), com CCS leve (B), moderada (C) e severa (D) Barra=20μm. Em E, observa-se os valores das células caliciformes entre os cães saudáveis e os com ceratoconjuntivite seca (CCS) leve, moderada e severa.

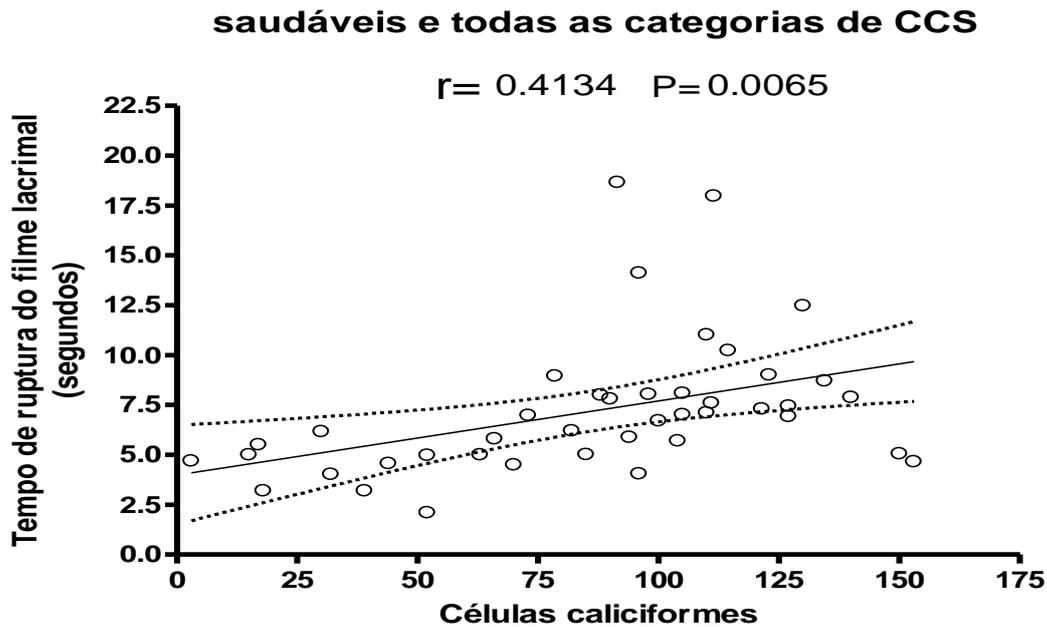


Figura 8. Gráfico da regressão linear mostrando correlação positiva entre o tempo de ruptura do filme lacrimal (segundos) e o número de células calciformes, ao se agrupar os 10 olhos dos cães saudáveis e os 32 olhos de pacientes com ceratoconjuntivite seca leve, moderada e severa. A linha tracejada representa o intervalo de confiança de 95%.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o valor médio do TRFL em cães saudáveis (poodles e yorkshires) foi de 11.34 segundos (amplitude de 6.96 a 18.66 segundos). Em beagles, tais valores variaram de 19.67 a 21.53 segundos (amplitude de 10 a 35 segundos) (Moore et al., 1987; Saito e Kotani, 2001). Em cães saudáveis de raças mesocefálicas diversas, o TRFL foi de 15.21 segundos (amplitude de 7.0 a 26.0 segundos) (Evans et al., 2012). Em cães braquicefálicos saudáveis, os resultados reportados em diferentes partes do mundo variaram, de 10.77 (Estados Unidos) a 13.66 segundos (Brasil) (Arnold et al., 2014; Kobashigawa et al., 2015). Embora o presente estudo realizado nos cães saudáveis tenha sido conduzido em ambiente controlado de temperatura e umidade, admite-se que tais diferenças reportadas no TRFL de cães possam ser atribuídas a diferenças relativas à temperatura e a umidade (Moore et al., 1987; Saito e Kotani, 2001; Arnold et al., 2014; Kobashigawa et al., 2015).

Admite-se que lacrimomiméticos possam amenizar os sinais de irritação ocular provocados pela blefaroconjuntivite oriunda do contato dos pelos e cílios em cães com anormalidades palpebrais e naqueles com ceratite ulcerativa (Ribeiro, 2015). Diferentemente do que fora hipotetizado, exceto pelo efeito do HS que elevou o TRFL em 3.8 segundos decorrido 1 minuto de sua instilação, tais substâncias não permaneceram na superfície ocular de cães saudáveis decorridos 5 minutos de sua instilação. Os mesmos autores também constataram que essas substâncias não elevaram o TRFL em gatos em experimento com metodologia similar. Acredita-se que estímulo neuronal e reflexo químico provocado por tais substâncias, possa ter estimulado o lacrimejamento e a eliminação precoce de tais substâncias nos cães saudáveis. Dessa forma, aconselha-se que tais substâncias sejam testadas em concentrações mais elevadas, haja vista que em pacientes com tais alterações, o TLS geralmente se encontra acima de 15 milímetros/minuto.

O presente estudo foi o primeiro a considerar o TRFL em diferentes categorias de cães com CCS, sendo que esse parâmetro foi significativamente menor em todas as categorias estudadas, comparativamente aos valores dos cães saudáveis. Embora os valores desse parâmetro decresceram de acordo com a severidade da doença, só houve diferença significativa entre as categorias leve e severa. Considerando os 32 olhos estudados, o TRFL aferido (5.93 segundos, amplitude de 2.10 a 11.02 segundos) foi similar àqueles reportados em outra pesquisa (6.2 a 7 segundos) conduzida em cães com CCS (Chen e Powell, 2015). Todavia, Chen e Powell (2015) não separaram os olhos por categorias, sendo que o TLS dos pacientes variou de 0 a 13 milímetros/minuto. Em cães diabéticos com CCS qualitativa, o TRFL foi de 6.55 segundos, também similar que àquele descrito em nossa pesquisa (Cullen et al., 2005).

A despeito da eficácia de lacrimoestimulantes como a ciclosporina e o tacrolimus no tratamento de cães com CCS, tais medicações levam, em média, 30 dias para elevar o quantitativo aquoso da lágrima (Williams, 2008; Ribeiro, 2015). Dessa forma se torna indispensável que no início da terapia da CCS, lacrimomiméticos sejam prescritos para aliviar os sinais dessa afecção. Diversos estudos avaliaram a eficácia do HS em humanos com CCS (Mengher et al., 1986; Hamano et al., 1996; Johnson et al., 2006). Em um deles, observou-se que a instilação de uma gota de HS a 0,1% foi capaz de elevar o TRFL por até 40 minutos (Mengher et al., 1986). Outros autores demonstraram que o mesmo agente, em

concentrações de 0,1 % elevaram o TRFL em até 180 minutos (Hamano et al., 1996; Johnson et al., 2006). In vitro, relatou-se que a CMC pode permanecer ligada às células epiteliais da córnea humana por até 2 horas (Garrett et al., 2007). Todavia, estudos em humanos com CCS, demonstraram que na concentração de 0.5%, a CMC pode elevar o TRFL em apenas 2 segundos, por até 5 minutos (Simmons e Vehige, 2007). Nos demais estudos, não consideraram avaliar a permanência da CMC em minutos na superfície ocular de humanos com CCS. Apenas foi reportado que após várias semanas sob terapia com CMC a 0.5%, comparativamente ao período pré-tratamento, houve elevação no TRFL. (Lee et al., 2011). Lee et al. (2011) demonstraram que a CMC a 0,5% e o HS a 0,1%, elevam o TRFL de forma similar, decorridos 4 e 8 semanas de tratamento contínuo em humanos com CCS. Em coelhos e ratos com CCS induzida experimentalmente, constatou-se que a CMC a 0,5% e o HS a 0,1% elevam o TRFL por até 20 minutos, sem diferença significativa entre ambos (Zheng et al., 2014).

Em todas as categorias de CCS avaliadas, nossos resultados demonstraram que apesar do HS a 0.15% e a CMC a 0.5% elevarem o TRFL, observou-se que o primeiro fármaco elevou esse parâmetro de forma mais eficaz e duradoura, quando comparado com o segundo. De fato, ao se agrupar os 32 olhos doentes, o HS a 0.15% elevou o TRFL por até 30 minutos, sendo que a CMC a 0.5% elevou tal parâmetro por apenas 10 minutos. Dessa forma, admite-se que tais fármacos devam ser instilados, pelo menos a cada 30 minutos e não a cada 4 horas como recomendado pela literatura veterinária (Ribeiro, 2015; Williams e Mann 2013). Estudos em cães, demonstraram que os sinais clínicos oriundos da CCS são mais amenizados quando a concentração do HS é aumentada e sua molécula é modificada (Williams e Mann, 2013). De fato, tanto a CMC a 1% quanto o HS a 0.3% apresentam potencial em elevar o TRFL de forma significativamente mais alta, em humanos com CCS e em animais de laboratório com CCS induzida experimentalmente, que as concentrações de CMC a 0.5% e de HS a 0.1% (Simmons e Vehige 2007; Zheng et al., 2014). Entretanto, Park et al. 2015, não reportou diferenças entre o 0,1%, 0,15% e 0,3% de Hialuronato de sódio em olhos com CCS em humanos. A combinação de CMC e HS no mesmo colírio, também elevaram o TRFL e melhoraram a qualidade das CC de forma substancial, quanto comparado com o uso isolado de cada agente em camundongos com CCS experimentalmente induzida (She et al., 2015).

Moore et al. (1987) descreveram que o número de CC varia de acordo com diferentes regiões da conjuntiva de beagles saudáveis, mas não correlacionaram o TRFL com esses achados. Cullen et al. (2005) quantificaram o número de CC em cães saudáveis, cataratosos e cataratosos com diabetes, mas levaram em consideração avaliar a proporção de CC em relação às células epiteliais da conjuntiva palpebral. Apesar dos autores constatarem redução significativa no TRFL de cães diabéticos, não foi constatado significância estatística relativamente a densidade de CC nos cães diabéticos, em comparação as outras categorias (Cullen et al. 2005). Em nosso estudo, observou-se que o número de CC foi similar em cães saudáveis e com CCS leve e que apesar do quantitativo dessas células cair em pacientes com a forma moderada, só se observou redução significativa na forma severa da doença. Todavia, correlação positiva entre o TRFL e o número de células calciformes foi constatada ao se agrupar as três categorias de CCS com os cães saudáveis. Embora o TLS seja o teste ouro para diagnosticar e estadiar a CCS dos cães, nossos resultados sugerem que com a severidade da CCS as CC tende a diminuir, sendo assim a permanência da lágrima na superfície ocular tende a reduzir de forma linear.

5 CONCLUSÃO

A instilação de HS a 0,15% e de CMC a 0,5% eleva o TRFL em cães com ceratoconjuntivite seca; porém, o hialuronato de sódio apresentou maior tempo de retenção na superfície ocular e foi mais eficiente que a CMC em elevar o TRFL próximo dos valores basais. Em cães saudáveis, tais agentes não elevaram o TRFL. Dessa forma, admite-se que mais que 6 instilações diárias possam ser necessárias para manter a superfície ocular de cães com CCS lubrificada, pois, o mesmo não permanece na superfície corneal mais que 30 minutos. Ao se correlacionar as CC com o TRFL de cães saudáveis e os com CCS, a permanência da lágrima na superfície ocular tende a reduzir de forma linear. Tais achados sugerem que a CCS imunomediada em cães tende a mudar de um distúrbio quantitativo para um qualitativo à medida que a doença progride.

6 REFERÊNCIAS

ARAUJO, D.M.L.; GALERA, P.D. Ocular lubricants: what is the best choice? *Ciência Rural*, v.46, p.2055-2063, 2016.

ARNOLD, T.S.; WITTENBURG, L.A.; POWELL, C.C. Effect of topical naltrexone 0.3% on corneal sensitivity and tear parameters in normal brachycephalic dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v.17, p.328-333, 2014.

BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; DIQUELOU, A. et al. Comparison of cytologic and histologic evaluations of conjunctiva in the normal equine eye. *Veterinary ophthalmology*, v.10, p. 12-18, 2007.

CHEN T, POWELL CC. Effect of once daily topical 0.3% naltrexone on tear parameters and corneal sensitivity in dogs with uncontrolled keratoconjunctivitis sicca: a double-masked randomized placebo-controlled clinical trial. *Vet. Ophthalmol.*, v.18, p.497-501, 2015.

CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A. et al. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v.8, p.215-224, 2005.

EVANS, P.M., LYNCH, G.L, LABELLE P. Effects of oral administration of diphenhydramine on pupil diameter, intraocular pressure, tear production, tear film quality, conjunctival goblet cell density, and corneal sensitivity of clinically normal adult dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.73, p.1983-1986, 2012.

FEATHERSTONE, H.J.; HEINRICH, C.L.; Ophthalmic examination and diagnostics. In: GELATT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. (Eds.) *Veterinary ophthalmology*. 5th ed. Iowa:Wiley-Blackwell, 2013. p.533-613.

GARRETT, Q.; SIMMONS, P.A.; XU, S. et al. Carboxymethyl cellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.48, p.1559-1567, 2007.

GIULIANO, E.A. Diseases and surgery of canine lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. (Eds.) *Veterinary ophthalmology*. 5th ed. Iowa:Wiley-Blackwell, 2013. p.912-945.

HAMANO, T.; HORIMOTO, K.; LEE, M. et al. Sodium hyaluronate eye drops enhance tear film stability. *Jpn. J. Ophthalmol.*, v.40, p.62-65, 1996.

HASEGAWA, T.; TANAKA, S.; SAWA, S. Clinical trial of a tear substitute containing 0.1% polyvinyl alcohol, 0.3% sodium hyaluronate, and 5% dodecahydrosqualene in 14 dogs with keratoconjunctivitis sicca: a pilot study. *In: 47th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Monterey, CA October 26-29, 2016. Vet. Ophthalmol.*, v.19, p.26, 2016.

JOHNSON, M.E.; MURPHY, P.J.; BOULTON, M. Effectiveness of sodium hyaluronate eye drops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v.244, p.109-112, 2006.

KOBASHIGAWA, K.K.; LIMA, T.B.; PADUA, I.R.M. Ophthalmic parameters in adult Shih Tzu dogs. *Cienc. Rural.*, v.45, p.1280-1285, 2015.

LEE, J.H.; AHN, H.S., KIM, E.K. et al. Efficacy of Sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose in treating mild to moderate dry eye disease. *Cornea*. v.30, p.175-179, 2011.

MENGHER, L.S.; PANDHER, K.S.; BRON, A.J. et al. Effect of sodium hyaluronate (0.1%) on break-up time (NIBUT) in patients with dry eyes. *Br. J. Ophthalmol.* v.70, p.442-447, 1986.

MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V. et al. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.28, p.1925-1932, 1987.

PARK, Y.; SONG, J.S.; CHOI, C.Y. et al. A randomized multicenter study comparing 0.1%, 0.15%, and 0.3% sodium hyaluronate with 0.05% cyclosporine in the treatment

of dry eye. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2016. Ahead of print. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jop.2016.0086>. Acesso em: 04 jan. 2017.

RIBEIRO, A.P. Oftalmologia. In: CRIVELLENTI, Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S. (Eds.). *Casos de rotina em medicina veterinária de pequenos animais*, 2.ed. São Paulo: MedVet., 2015. p. 683-722.

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

SEBBAG, L.; REILLY, C.M.; EID R. et al. Goblet cell density and distribution in cats with clinically and histologically normal conjunctiva. *Veterinary Ophthalmology*, v.19, p. 1-6, 2016.

SHE, Y.; LI, J.; XIAO, B.; LU, H. et al. Ocul Evaluation of a Novel Artificial Tear in the Prevention and Treatment of Dry Eye in an Animal Model. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, v.31, p.525-30, 2015.

SIMMONS, P.A.; VEHIGE, J.G. Clinical performance of a mid-viscosity artificial tear for dry eye treatment. *Cornea*, v.26, p.294–302, 2007.

WILLIAMS, D.L.; MANN, B.K. A crosslinked HA-based hydrogel ameliorates dry eye symptoms in dogs. *Int J Biomater.* 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690250/>. Acessado em: 04 jan. 2017.

WILLIAMS; D. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.38, P.251-268, 2008.

YAO, K.; BAO, Y.; YE, J. et al. Efficacy of 1% carboxymethylcellulose sodium for treating dry eye after phacoemulsification: results from a multicenter, open-label, randomized, controlled study. *BMC Ophthalmol.*, v.15, p.2-10, 2015.

ZHENG, X.; GOTO, T.; OHASHI, Y. Comparison of *in vivo* efficacy of different ocular

lubricants in dry eye animal models. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* v.29, p.3454-3460, 2014.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO COLÍRIO HIALURONATO DE SÓDIO A 0,15% NO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL DE GATOS SAUDÁVEIS ANTES E APÓS A ANESTESIA GERAL

1 INTRODUÇÃO

O filme lacrimal mantém a superfície ocular úmida, fornece nutrientes para a córnea e proteção contra agentes patogênicos, além de ajudar a eliminar os resíduos da superfície ocular proporcionando uma superfície lisa para a refração óptica (Gum e MacKay 2013; Sebbag et al., 2015). A camada mais interna do filme lacrimal é composta por mucina, que é secretada por células caliciformes presentes na conjuntiva (Gum e MacKay 2013, Sebbag et al., 2016). A intermediária, é composta por água que é secretada pelas glândulas lacrimal principal e da terceira pálpebra (Gum e MacKay 2013). A mais externa é composta por lipídeos e é secretada pelas glândulas tarsais (Gum e MacKay 2013; Sebbag et al., 2015). A deficiência quantitativa do filme lacrimal, refere-se à diminuição da secreção aquosa e manifesta-se clinicamente como ceratoconjuntivite seca (Stiles, 2013; Ribeiro, 2015). A deficiência da camada lipídica ou mucinosa, resultam, individualmente ou associação em distúrbios qualitativos do filme lacrimal (DQFL), promovendo a instabilidade e a evaporação prematura dessa película (Stiles, 2013; Ribeiro, 2015). Ambas anormalidades da lágrima ensejam quadros de conjuntivite, desconforto ocular, ceratite ulcerativa e não ulcerativa que podem levar a cegueira (Stiles, 2013; Ribeiro, 2015).

A avaliação das DQFL relativa à disfunção de lipídeos do filme lacrimal pode ser feita pela meibometria, ou por biópsia das glândulas tarsais (Lim et al., 2009; Sebbag et al., 2015). A produção de mucina pode ser quantificada por histologia conjuntival, para se avaliar a densidade das células caliciformes (Lim e Cullen, 2005; Sebbag et al., 2016). Clinicamente, as DQFL são avaliadas pelo tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) (Lim et al., 2009; Sebbag et al., 2015). Em gatos saudáveis e naqueles com conjuntivites bacterianas e virais, o TRFL não apresenta correlação com o teste da lágrima de Schirmer (Lim e Cullen, 2005, Sebbag et al., 2015). Nesta

espécie, as deficiências do filme lacrimal são desordens qualitativas em sua grande maioria e ocorrem secundariamente a blefarconjuntivite crônica e ao herpes vírus felino do tipo 1 (HVF-1), no qual ensejam diminuição do TRFL resultando em lesão ceratoconjuntival (Lim e Cullen 2005, Lim et al., 2009). Ademais, o uso de parasimpatolíticos tópicos e sistêmicos, acepromazina, alfa-2 agonistas, cetamina e demais agentes anestésicos reduzem significativamente a quantidade e a qualidade da lágrima em gatos (Arnett et al., 1984; Cullen et al., 2005; Ghaffari et al, 2010; Peche et al., 2015; Di Pietro et al., 2016; Ghaffari et al., 2016).

Lacrimomiméticos são lubrificantes sintéticos que complementam um ou mais componentes do filme lacrimal, aumentando o volume e a estabilidade dessa película, além de proteger a superfície ocular contra a dessecação (Araujo & Galera, 2016). Eles estão disponíveis diferentes formulações compostas por hipromelose, dextrana, carboximetilcelulose, ácido hialurônico e ácido poliacrílico. O hialuronato de sódio (HS) é um glicosaminoglicano presente na lágrima com excelentes propriedades viscoelásticas, lubrificantes e de retenção de água (Araujo & Galera, 2016). Em coelhos e ratos com CCS induzida experimentalmente, constatou-se que o HS a 0,1% eleva o TRFL por até 20 minutos (Zheng et al., 2014). Em humanos com CCS, uma única instilação de HS eleva o TRFL de 40 a 180 minutos (Mengher et al., 1986; Hamano et al., 1996; Johnson et al., 2006; Lee et al., 2011).

O uso de lacrimoestimulantes imunossupressores como a ciclosporina e o tacrolimus, podem não trazer benefícios em gatos com DQFL, haja vista que o HVF-1 é um dos causadores da afecção (Stiles, 2013). Em gatos, lacrimomiméticos também são prescritos em pacientes com irritação da superfície ocular oriunda de agenesia palpebral, com fins de amenizar o atrito de pêlos com a superfície ocular (Maciel et al., 2015). Nas ocasiões expostas acima, a literatura recomenda que gatos devam ser tratados com lacrimomiméticos de 4 a 6 vezes ao dia (Stiles, 2013; Ribeiro, 2015). Além disso, recomenda-se que lacrimomiméticos sejam instilados a cada 15 minutos em olhos de gatos submetidos à cirurgia, independentemente do tempo que permanecerem anestesiados (Di Pietro, 2016). Peche et al. (2015) constaram que após a anestesia geral, olhos de gatos apresentaram significativamente menos blefarospasmo e hiperemia conjuntival quando tratados com uma gota do lacrimomimético ácido poliacrílico no momento da intubação. Entretanto, até o presente, nenhum estudo avaliou a permanência de lacrimomiméticos na superfície ocular de gatos saudáveis e naqueles submetidos a

anestesia geral. Ademais, considerando-se que procedimentos anestésicos podem reduzir a produção e a qualidade da lágrima, respectivamente, por até 18 e 20 horas, nos parece oportuno avaliar a permanência de agentes lacrimomiméticos na superfície ocular dessa espécie (Cullen et al., 2005; Peche et al., 2015). Frente ao exposto, objetivou-se avaliar a permanência do hialuronato de sódio à 0,15% na superfície ocular de gatos saudáveis, antes e após a anestesia geral, por meio do TRFL. Ademais, considerou-se avaliar possíveis correlações entre o número de células caliciformes sobre os valores do TRFL após a instilação do HS em gatos saudáveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comitê de ética no Uso de Animais (protocolos: 23108.118102/2015-51 e 23108.188779/2016-59).

2.2 Delineamento experimental

2.2.1 Pacientes não anestesiados

Como critério de seleção, os indivíduos foram submetidos à exame clínico geral e oftálmico. Ademais, sorologia para leucemia viral e imunodeficiência felina (Alere®, Korea), hemograma completo e avaliação da alaminotransferase, creatinina e uréia, foram realizados. Apenas os indivíduos saudáveis e com consentimento dos proprietários foram incluídos na pesquisa.

No grupo dos pacientes não anestesiados, selecionaram-se 13 animais (11 gatas e dois gatos) que não foram submetidos a anestesia geral. Nesse experimento, os indivíduos selecionados foram alojados em gaiolas individuais, em uma sala com umidade relativa do ar entre 60 e 62%, temperatura entre 22 a 26° C, com água e comida a vontade. Previamente ao início do experimento, os indivíduos foram adaptados por um período de 7 dias aos exames e aos examinadores. Para realização do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), instilou-se 0,1mL de fluoresceína sódica 1% (Allergan, Inc., São Paulo) sobre a conjuntiva bulbar

dorsolateral dos gatos. Após a instilação as pálpebras foram fechadas, ao se abrir havia o disparo do tempo por cronômetro. A superfície dorsolateral da córnea foi observada com auxílio de biomicroscópio com lâmpada de fenda (SL-14, Kowa Company, Tokyo, Japan), com magnificação de 16x e filtro azul de cobalto para intensificar a luminescência da fluoresceína. A contagem se encerrou ao obter o primeiro sinal de ruptura do filme lacrimal, que foi interpretado pela observação de estrias escuras no filme lacrimal de cor fluorescente verde-amarelo (Fig. 9). Após o período de adaptação, o TRFL foi aferido em ambos os olhos como descrito previamente para obtenção de valores basais. Posteriormente, o TRFL foi aferido em ambos os olhos decorridos 1, 10 e 20 minutos da instilação de uma gota da solução livre de preservativo, a base de hialuronato de sódio a 0,15% (HS) (Hyabak®, Genon, São Paulo, Brasil). Em todas as avaliações, o examinador não tinha conhecimento se o indivíduo havia recebido ou não tratamento, tampouco quanto tempo havia decorrido da instilação do fármaco. Ainda, para evitar viés relativos a estimulação da produção de lágrima, cada aferição do TRFL, foi feita com intervalos regulares de 24 horas entre si. No período de adaptação e na fase experimental, o TRFL foi aferido sempre às 10 horas.

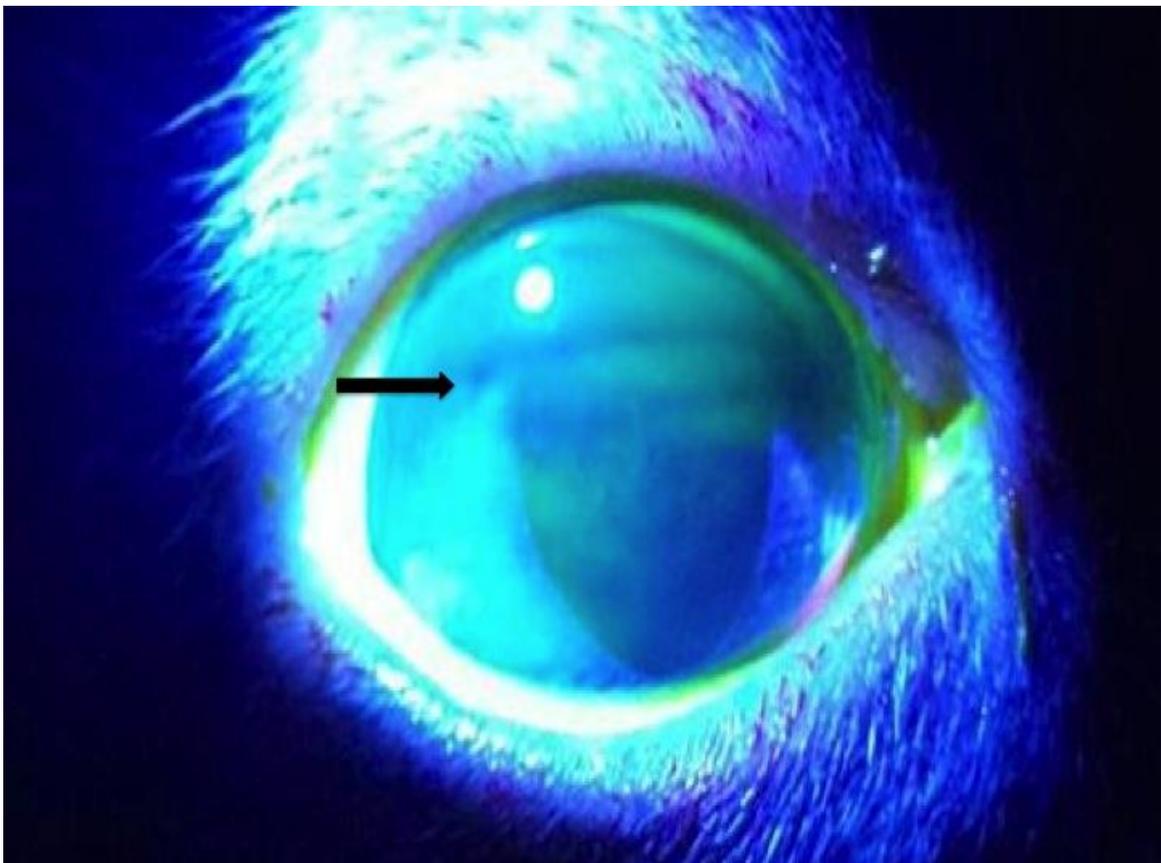


Figura 9. Olho de um gato do experimento demonstrando o aparecimento de estrias escuras (seta) no filme lacrimal fluorescente no canto dorsolateral da superfície ocular.

2.2.2 Pacientes submetidos à anestesia geral

Em um segundo experimento, os animais selecionados foram submetidos a cirurgia de castração eletiva. Como medicação pré-anestésica, os pacientes receberam na mesma seringa uma mistura contendo 10mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina Agener[®], Embu Guaçu, São Paulo, Brasil), 0,4mg/kg de midazolam (Midazolam ampola[®]; Hipolabor, Belo Horizonte, Brasil) e 3mg/kg de cloridrato de tramadol (Cloridrato de tramadol ampola[®]; União química, Pouso Alegre, Brasil). Para indução anestésica, foi utilizado propofol na dose de 5mg/kg ao efeito (Propovan[®], Cristália, São Carlos, Brasil) e a manutenção foi feita com isoflurano (1,5 V%) (Isoflurano; BioChimico, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil). Em todos os procedimentos, o isoflurano era desligado sempre aos 40 minutos do início da anestesia, independentemente se a orquiectomia ou a ovariectomia terminassem antes desse período. Cirurgias com duração acima de 40 minutos não foram consideradas. Manipulação da cabeça era evitada, e o paciente sempre ficava em decúbito dorsal durante todo o procedimento.

Para realização do experimento com os animais anestesiados, 39 pacientes (15 fêmeas e 24 machos) foram selecionados. A média de idade foi de 2 anos e o peso corporal a média foi de 3,0 kg. O TRFL foi aferido às cegas, com a mesma técnica utilizada no primeiro experimento. Os TRFL foram avaliados ao final do procedimento anestésico (T40) e decorridos, 35 (T75) e 80 minutos (T120) do final da anestesia. Para se evitar viés devido a lavagem do HS com soro fisiológico após cada aferição, os 39 indivíduos foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos (n=13 animais/cada) relativos aos tempos de avaliação do TRFL. Em todas as ocasiões, um dos olhos foi sorteado e tratado com uma gota de HS (sempre após 15 minutos da indução anestésica) e o outro foi utilizado como controle.

2.3 Histopatológicos das conjuntivas

Ao final do primeiro experimento, os olhos foram lavados com polivinilpirrolidona-iodo diluída em soro fisiológico (1:40). Decorridos 5 minutos, instilou-se uma gota cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon® Alcon Laboratories do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e após 2 minutos foi retirado um fragmento (3,0 X 3,0 X 3,0 mm de diâmetro) da conjuntiva da face anterior da terceira pálpebra de ambos os olhos. Os fragmentos foram acondicionados em tubos de 1,5 ml e fixados por 24 horas em solução de formaldeído a 10 %. Posteriormente, as amostras foram processadas de forma rotineira e coradas com Hematoxilina e Eosina e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Para quantificação das células caliciformes, considerou-se contar 200 núcleos de células epiteliais da conjuntiva basal e a quantidade de células caliciformes presentes no mesmo local (Sebbag et al., 2016). As lâminas foram avaliadas em objetiva de 40x e o número total foi determinado através da média de dois campos (Fig. 10).

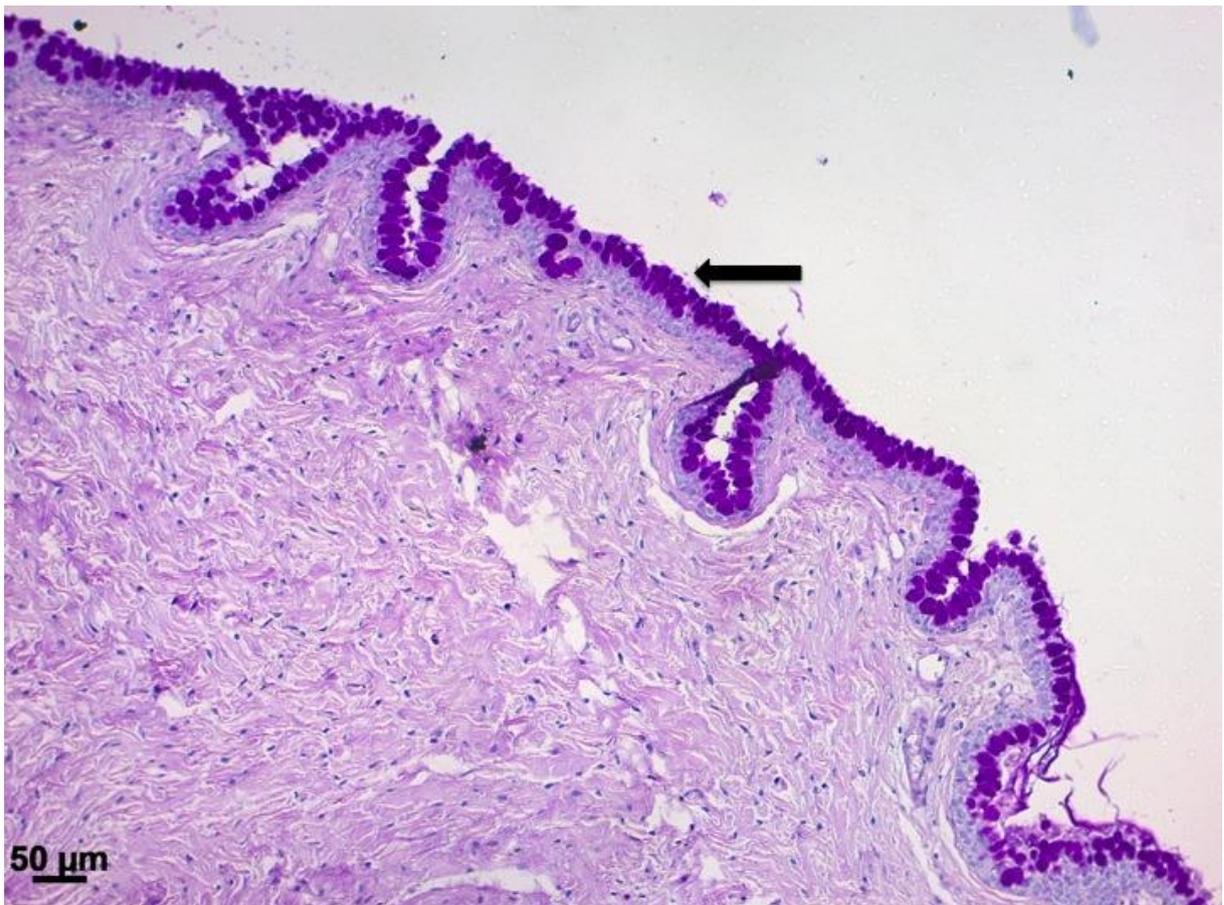


Figura 10. Imagem representativa da marcação das células caliciformes (seta) em gatos. Ácido Periódico de Schiff (PAS) de conjuntiva bulbar ventral de um gato saudável. Barra=50μm.

2.3 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos gatos que não foram anestesiados, a comparação dos valores do TRFL entre os períodos e entre os tratamentos foi realizado por análise de variância de via única (1-ANOVA) para medidas repetidas. O número de células caliciformes entre os olhos direito e esquerdo, foram comparados ao teste T *Student* pareado. Nos gatos anestesiados, empregou-se 1-ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey com intuito de se averiguar o efeito do tratamento entre o período basal dos gatos não anestesiados e os demais períodos pós-anestesia. Comparações entre os olhos tratados e controle dos gatos anestesiados foram realizadas 2-ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Nos gatos não anestesiados, possíveis correlações entre o número de células caliciformes e o TRFL de cada período foram averiguadas ao teste de Person. Em todas as ocasiões, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

Os resultados encontram-se expressos na forma de média \pm desvio padrão (DP). Nos gatos não anestesiados, o TRFL não diferiu significativamente entre os olhos direito e esquerdo, no período basal e decorridos 1, 10 e 20 minutos das instilações do HS ($p=0,33$) (Tabela 1). As células caliciformes foram facilmente identificadas devido a presença do PAS intracelular e devido a sua conformação. A média de células caliciformes dos olhos direitos foi de $122,9 \pm 30,90$ (mínimo 92 e máximo 176) e de $120,2 \pm 38,80$ nos olhos esquerdo (mínimo 60 e máximo 224) ($p=0,84$). O número de células caliciformes se correlacionou positivamente, apenas com os valores do TRFL obtidos no período basal de ambos os olhos ($p=0,02$; $r=0,60$) (Tabela 1, Fig.11). Todavia, não se observaram correlações entre o TRFL e o número de células caliciformes decorridos 1, 10 e 20 minutos das instilações do HS ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1: Média \pm desvio padrão (valores mínimo e máximo) do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos (s), entre os olhos direito e esquerdo no período basal e decorridos 1, 10 e 20 minutos (min) das instilações de hialuronato de sódio a

0,15% (HS) em gatos não anestesiados. Na linha inferior, observam-se os resultados do teste de correlação de Person entre o TRFL e a densidade de células calciformes (DCC) em todos os períodos avaliados.

	Basal	1 min	10 min	20 min	Valor de p
TRFL	10,03±3,06 s (5,80 -16,37)	10,73± 3,32s (5,44 -14,86)	10,98±3,94 s (5,45-17,16)	12,38±3,25s (8,28 -18,41)	0,84
TRFL/DCC	r=0,60 p=0,02*	r= 0,38 p= 0,18	r= -0,01 p= 0,96	r= 0,02 p= 0,92	

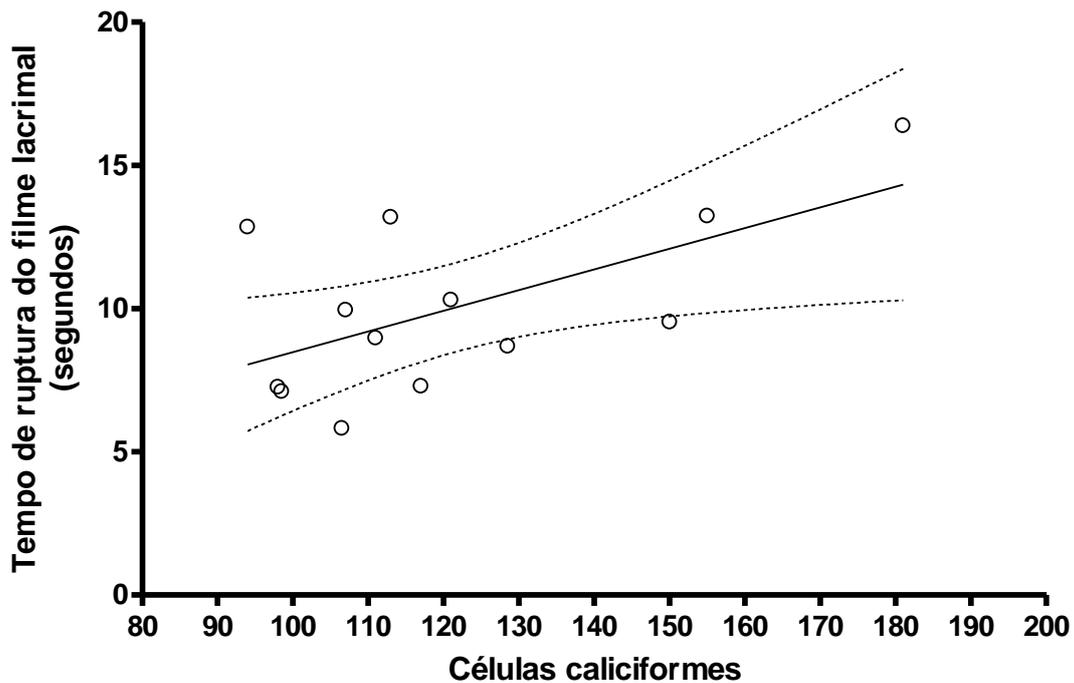


Figura 11. Curva de regressão linear (linha sólida), intervalo de confiança de 95% (linha pontilhada) e dispersão dos valores (círculos) demonstrando correlação positiva ($r=0,60$; $p=0,02$) entre o tempo de ruptura do filme lacrimal e a densidade de células calciformes no período basal em gatos não anestesiados.

Ao se comparar os valores do TRFL dos olhos controles dos pacientes anestesiados, com os valores basais dos gatos não anestesiados, observou-se que esse parâmetro decresceu significativamente nos três períodos após a anestesia

($p < 0,001$) (Fig. 12A, Tabela 2). Nos olhos controle, as comparações entre os três períodos após anestesia demonstraram que, embora os valores do TRFL se elevarem do T40 ao T120, em 1,57 segundos, tais diferenças não foram significativas. ($p = 0,20$) (Fig. 12A, Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão (valores mínimo e máximo) do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em segundos, nos olhos controle e naqueles tratados com hialuronato de sódio a 0,15% ao final da anestesia (T40) e decorridos 35 (T75) e 80 minutos (T120) do final da anestesia.

TRFL	Basal	T40	T75	T120
Controle	10,03 \pm 3,06 s (5,80 - 16,37)	3,79 \pm 0,77 (2,55-5,4)	4,49 \pm 1,27 (3,11-7,28)	5,36 \pm 2,13 (1,03-9,42)
Hialuronato de sódio	10,03 \pm 3,06 s (5,80 - 16,37)	16,38 \pm 2,57 aA (12,33-21,6)	10,54 \pm 3,33 A (4,49-15,57)	8,46 \pm 2,38 A (5,27-13,4)

Letra minúscula difere dos demais momentos dentro de um mesmo tratamento ($p < 0,001$). Letra maiúscula difere dos olhos controle ($p < 0,0001$).

Ao comparar os valores do TRFL dos olhos tratados com HS nos pacientes anestesiados, com os valores basais dos gatos não anestesiados, observou-se que esse parâmetro se elevou significativamente apenas no primeiro período após a anestesia ($p < 0,0001$) (Fig. 12 B, Tabela 2). A figura 12B evidencia, nos olhos tratados com HS, um aumento significativo em T40 comparativamente ao período de tempo T75 e T120, assim como também ao basal do grupo não anestesiado. Nos olhos tratados com HS, as comparações entre os três períodos após anestesia demonstraram que, os valores do TRFL reduziram significativamente do T40 ao T120, em 7,92 segundos ($p < 0,001$) (Fig. 12B Tabela 2). Entretanto no último período de avaliação, os valores do TRFL dos olhos tratados permaneceram 1,57 segundos mais baixos que os valores do TRFL basal, tal diferença não foi significativa ($p = 0,50$) (Fig. 12B, Tabela 2). Em todos os períodos avaliados, os olhos tratados com HS apresentaram TRFL significativamente mais altos que os olhos controles ($p < 0,001$) (Fig. 13).

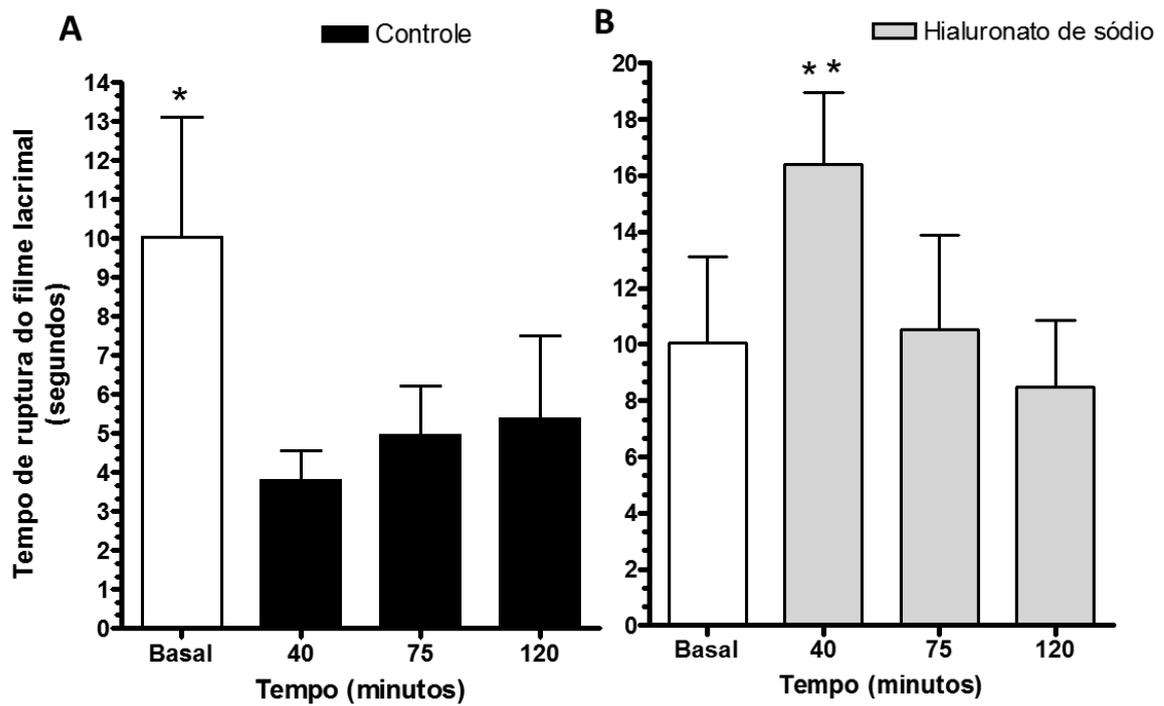


Figura 12. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) do período basal de gatos não anestesiados (barras brancas) e aos 40, 75 e 120 minutos após o início da anestesia nos olhos controle (A) e nos olhos tratados com uma gota de hialuronato de sódio a 0,15% (B). *(p<0,001), **(p<0,0001), relativamente aos demais momentos.

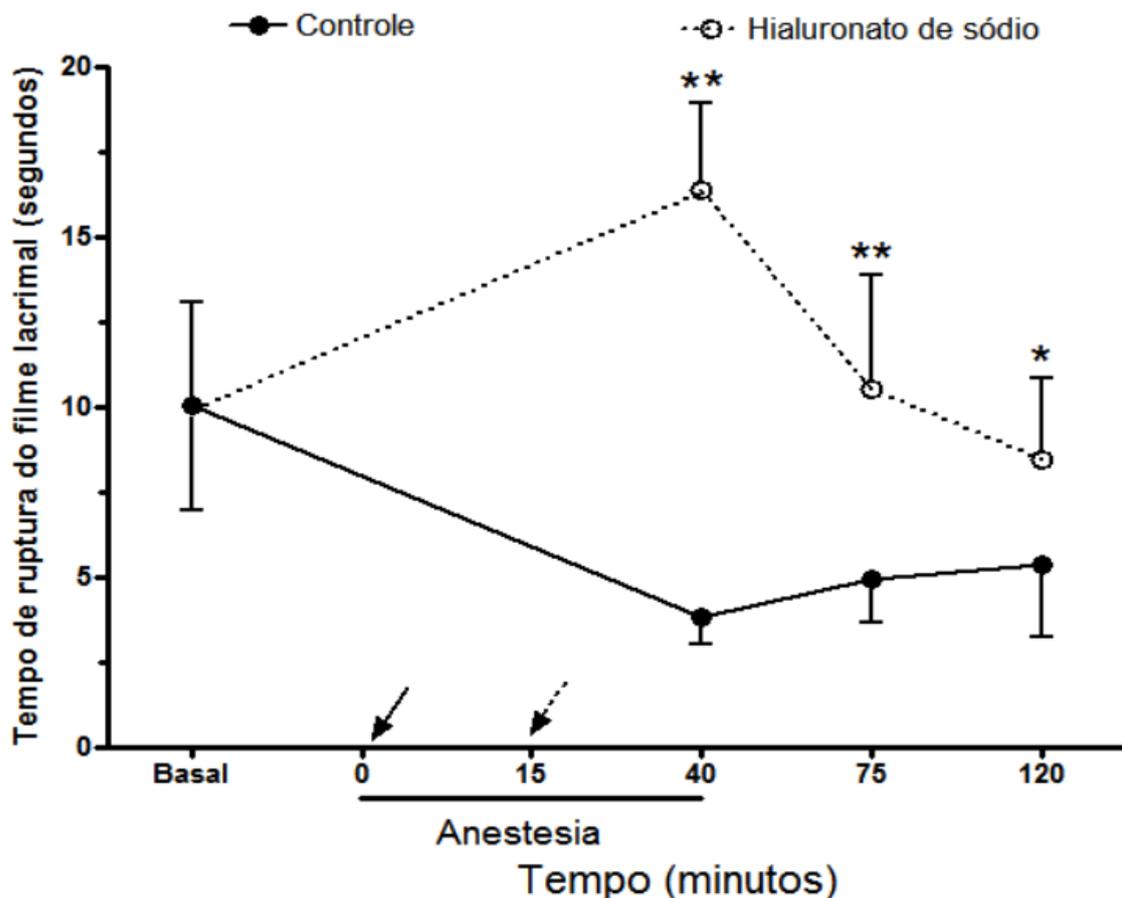


Figura 13. Valores do tempo de ruptura do filme lacrimal do período basal de gatos não anestesiados e aos 40, 75 e 120 minutos do início da anestesia (seta) nos olhos controle e nos olhos tratados com uma gota (seta tracejada) de hialuronato de sódio a 0,15%. **($p < 0,0001$), *($P = 0,0092$) em relação aos tratamentos.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a média TRFL no período basal entre os grupos foi de 10,03s, abaixo das médias já relatadas (Lim e Cullen 2005, Davis e Townsend 2011, Sebbag et al., 2015). Lim e Cullen (2005), observaram em seu estudo, que a média do TRFL em gatos saudáveis foi de 16,7 segundos (s). Enquanto que Davis e Townsend (2011), reportaram média de 13,55s. Sebbag et al. (2015) relataram que o TRFL médio de gatos saudáveis foi de 12,4s. Em humanos, tais discrepâncias podem ser associadas à temperatura, umidade do ambiente e a idade (Sweeney et al., 2013). Em nossa pesquisa, admite-se que a idade não influenciou nos resultados do TRFL, haja vista que os indivíduos apresentavam idade média de 3 anos e já foi reportado que idade não altera esse parâmetro (Sebbag et al., 2015). Relativamente

à temperatura e umidade, demonstrou-se não haver correlação entre a repetibilidade do TRFL em semanas com diferenças nesses parâmetros (Sebbag et al., 2015). No estudo de Sebbag et al. (2015), reportou-se que apesar de ausência de correlação estatística, que os valores mínimos e máximos do TRFL obtidas em temperatura de 22° C e umidade relativa do ar em 32%, foram levemente mais baixas, quando a temperatura se elevou e a umidade reduziu, respectivamente, em 1° C e 3%. Em nosso estudo, apesar dos indivíduos serem mantidos em temperatura similar e umidade 30% maior que àquela reportada por outros autores, os valores do TRFL observados em nosso estudo foram 2,3s mais baixos (Sebbag et al., 2015). Tal achado pode ser atribuído ao fato que na presente pesquisa, os autores avaliaram o TRFL após instilação de uma gota de fluoresceína na forma de colírio, no estudo de Sebbag et al. (2015), o TRFL foi aferido após a impregnação de um bastão de fluoresceína umedecido. Postula-se que o colírio de fluoresceína, possa auxiliar a lavar do filme lacrimal, comparativamente a impregnação direta do corante levemente diluído.

Em gatos, as afecções lacrimais são de ordem qualitativa em sua grande maioria (Stiles, 2013). Nessa espécie, o TRFL é mais fidedigno que o teste da lágrima de Schirmer (TLS) na avaliação de DQFL quando comparado ao teste de Schirmer (Lim e Cullen 2005, Lim et al., 2009). Em nossa pesquisa, não foi possível avaliar os efeitos de lacrimomiméticos em gatos doentes. Entretanto, considerou-se avaliar o efeito do HS a 0,15% em gatos saudáveis, pois tais substâncias são comumente prescritas em pacientes com agenesia palpebral, com o intuito de criar um filme protetor reduzindo a sensação de corpo estranho (Maciel et al., 2016). Nessas condições o TLS pode encontrar-se normal e até mesmo elevado (Maciel et al., 2016). Em nosso estudo com os gatos não anestesiados, a instilação de HS a 0,15% não elevou o TRFL em relação ao período basal ou em qualquer um dos momentos após o tratamento. Acredita-se que estímulo neuronal e químico reflexo provocado por tais substâncias, possa ter estimulado o lacrimejamento e a eliminação precoce de tais substâncias nos gatos saudáveis.

A avaliação das células caliciformes é um método indireto importante no qual proporciona o acesso a mucina pré-ocular (Sebbag et al., 2016). Reportou-se que em gatos acometidos por conjuntivite e naqueles infectados experimentalmente com o HVF-1, que a diminuição das células caliciformes ocorre em paralelo ao TRFL (Johnson et al., 1990, Lim et al., 2009). Todavia, outro estudo reportou não haver

diferenças no número de células caliciformes e no TRFL em gatos normais e naqueles com sequestro corneal (Grahn et al., 2005). No presente estudo, o TRFL se correlacionou positivamente com as células caliciformes apenas antes das instilações dos fármacos. Estudos em gatos com instabilidade do filme lacrimal devem ser conduzidos para evidenciar a existência de correlação entre o uso de lacrimomiméticos e o número de células caliciformes.

Admite-se que agentes analgésicos, sedativos e anestésicos reduzam significativamente a produção lacrimal em gatos (Cullen et al., 2005; Ghaffari et al., 2010; Peche et al., 2015; Di Pietro et al., 2016). Nesse contexto, a ausência de reflexo palpebral aliado a centralização do bulbo ocular promovem a evaporação do filme lacrimal (Cullen et al., 2005). Ademais, durante procedimentos anestésicos ocorre redução da sensibilidade corneal, que reduz o estímulo reflexo de produção de lágrimas; outros motivos incluem a redução do fluxo sanguíneo às glândulas lacrimais, ocasionando diminuição do seu metabolismo (Peche et al., 2015; Di Pietro et al., 2016). Embora em nosso estudo o objetivo não fosse avaliar o efeito de fármacos analgésicos sedativos e anestésicos na produção lacrimal, optou-se por utilizar o mesmo protocolo anestésico em todas as cirurgias com fins de padronização.

Na presente pesquisa, observou-se que o protocolo anestésico adotado proporcionou redução significativa do TRFL em todos os momentos avaliados. Um único estudo anterior a este considerou avaliar o TRFL em gatos jovens submetidos a cirurgias de castração (Cullen et al., 2005). Nesse estudo, apesar de Cullen et al. (2005) também terem utilizados isoflurano, os períodos em que os pacientes receberam esse gás variou de 15 minutos até 2 horas, diferentes dos 40 minutos adotados nos pacientes da presente pesquisa. No estudo de Cullen et al. (2005) embora os autores tivessem aferido o TRFL decorridos 8 e 20 horas do final da anestesia, os resultados desse parâmetro não foram descritos em cada um desses períodos de forma separada. Embora Cullen et al. (2005) terem observado redução no TRFL e no TLS após as anestésias, tais reduções, só apresentaram significância estatística no olho direito. Considerando a média dos três períodos aferidos após anestesia, em nosso estudo, o TRFL apresentou redução de 5,48 segundos, levemente mais baixo que aqueles descritos Cullen et al. (2005), em que a redução geral desse parâmetro foi de 4,20 segundos. Em gatos, demonstrou-se que a produção lacrimal tende a se normalizar de 6 a 18 horas após a anestesia geral

(Peche et al., 2015). Em nosso estudo, decorridos 80 minutos do final da anestesia, o TRFL dos olhos controle ainda apresentavam valores médios 46% mais baixos que aqueles apresentados pelos gatos não anestesiados.

Em um estudo realizado em gatos, reportou-se que a lubrificação ocular com ácido poliacrílico (carbomer 980) foi capaz de reduzir significativamente os escores de hiperemia conjuntival e blefarospasmo, decorridos duas horas de anestésias gerais (Peche et al., 2015). Um estudo que avaliou os efeitos de protocolos anestésicos distintos, sobre a irritação da superfície ocular em 39.431 pessoas submetidas à diferentes cirurgias, reportou que taxa de intercorrência da irritação da superfície ocular foi de apenas 0,02% (Kara-Junior et al., 2015). Ressalva-se que dos 9/39.431 procedimentos cirúrgicos, em 5, os indivíduos receberam agentes lubrificantes durante as anestésias (Kara-Junior et al., 2015). Em um outro estudo que considerou avaliar 199 olhos de cães submetidos à anestesia geral, constatou-se que a instilação de carmelose sódica (a cada 2 ou 4 horas) até o momento da extubação, não isentaram a ocorrência de uma úlcera corneal e da formação de leves erosões superficiais em 18,6% dos casos (Dawson e Sanchez, 2016).

Reportou-se o que o HS a 0,1% eleva o TRFL por até 20 minutos em coelhos e em ratos com CCS induzida experimentalmente (Zheng et al., 2014). Em humanos com CCS, uma única instilação de HS eleva o TRFL de 40 a 180 minutos (Mengher et al., 1986; Hamano et al., 1996; Johnson et al., 2006; Lee et al., 2011). Todavia, a ausência de estudos relativos ao tempo de permanência de lacrimomiméticos na superfície ocular de gatos saudáveis e naqueles anestesiados motivou a presente pesquisa. Nossos resultados demonstraram que em gatos anestesiados, uma gota de hialuronato de sódio a 0,15%, elevou o TRFL em 6,35 segundos, decorridos 25 minutos de sua instilação, comparativamente aos valores aferidos nos gatos não anestesiados. Entretanto, o filme lacrimal ficou estável por apenas 60 minutos após a instilação do HS. Di Pietro et al. (2016) sugeriram que durante a anestesia, olhos de gatos devem ser lubrificados a cada 15 minutos. Nossos achados demonstraram que, quando o HS for utilizado, a lubrificação ocular pode ocorrer a cada hora e não a cada 15 minutos, como recomendado previamente (Di Pietro et al., 2016). Frente ao exposto admite-se a importância de estudar a permanência de outros lacrimomiméticos na superfície ocular de gatos anestesiados e naqueles com DQFL.

Já no último período de avaliação, que ocorreu 80 minutos do final da anestesia, os valores do TRFL nos olhos tratados estavam 1,57 segundos abaixo

daqueles observados nos gatos não anestesiados. Nossos achados, aliados àqueles reportados na literatura veterinária e humana, salientam que a instilação de lágrimas deve continuar por mais de 80 minutos do final de procedimentos anestésicos (Kara-Junior et al., 2015; Peche et al., 2015; Dawson e Sanchez, 2016).

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado, conclui-se que o número de células caliciformes se correlaciona com o TRFL, mas que a instilação de hialuronato de sódio a 0,15% não eleva o TRFL em gatos que apresentarem produção lacrimal normal. Em gatos saudáveis anestesiados, o hialuronato de sódio foi capaz de manter a estabilidade do filme lacrimal por apenas 60 minutos após a instilação do colírio. Considerando que decorridos 80 minutos do final da anestesia, o TRFL ainda permanece 46% abaixo daquele observado em gatos saudáveis não anestesiados, recomenda-se que o monitoramento da produção lacrimal, assim como a lubrificação da superfície ocular devam se estender além desse período.

6 REFERÊNCIAS

ARAUJO, D.M.L.; GALERA, P.D. Ocular lubricants: what is the best choice? *Ciência Rural*, v.46, p.2055-2063, 2016.

ARNETT, B.D.; BRIGHTMAN, A.H.; MUSSELMAN, E.E. Effect of atropine sulfate on tear production in the cat when used with ketamine hydrochloride and acetylpromazine maleate. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 185, p. 214–215, 1984.

CULLEN C.L.; LIM C.; SYKES J. Tear film breakup times in young healthy cats before and after anesthesia. *Veterinary ophthalmology*, v.8, n. 3, p.159-165, 2005.

DAVIS, K.; TOWNSEND, W. Tear- film osmolarity in normal cats and cats with conjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology*, v.14, p. 54-59, 2011.

DAWSON, C.; SANCHEZ, RF. A prospective study of the prevalence of corneal surface disease in dogs receiving prophylactic topical lubrication under general anesthesia. *Vet. Ophthalmol.*, v.19, p.124-129, 2016.

GHAFFARI, M.S.; JAVADZADEH, R.; RAJAEI, S.M. Effects of two concentrations of topical tropicamide on the Schirmer tear test in clinically normal cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 18, n. 12, p. 965-969, 2016.

GHAFFARI, M.S.; MALMASI, A.; BOKAIE, S. Effect of acepromazine or xylazine on tear production as measured by Schirmer tear test in normal cats. *Veterinary Ophthalmology*, v.13, p.1–3, 2010.

GRAHN, B.H.; SISLER, S.; STOREY, E. Qualitative tear film and conjunctival goblet cell assessment of cats with corneal sequestra. *Veterinary Ophthalmology*, v.8, p.167–170, 2005.

GUM, G.G.; MACKAY, E.O. Physiology of the eye. In: Gelatt K.N. *Veterinary ophthalmology*. 5ed. New York: John Wiley & Sons, 2013. p.171-208.

HAMANO, T.; HORIMOTO, K.; LEE, M. et al. Sodium hyaluronate eyedrops enhance tear film stability. *Japanese Journal of Ophthalmology*, v. 40, p.62-65, 1996.

JOHNSON, M.E.; MURPHY, P.J.; BOULTON, M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Archives of Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 244, p.109-112, 2006.

JOHNSON, B.W.; WHITELEY, H.E.; MCLAUGHLIN, S.A. Effects of inflammation and aqueous tear film deficiency on conjunctival morphology and ocular mucus composition in cats. *American Journal of Veterinary Research*. v.51, p.820–824, 1990.

KARA-JUNIOR N.; ESPINDOLA, R.F.; VALVERDE FILHO, J. et al. Ocular risk management in patients undergoing general anesthesia: an analysis of 39,431 surgeries. *Clinics (Sao Paulo)*, v.70, p.541-543, 2015.

LEE, J.H.; AHN, H.S.; KIM, E.K. et al. Efficacy of Sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose in treating mild to moderate dry eye disease. *Cornea*, v. 30, p.175-179, 2011.

LIM, C.C.; CULLEN, C.L. Schirmer tear test values and tear film break-up times in cats with conjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology*, v. 8, p.305-310, 2005.

LIM, C.C.; RELLY, C.M.; THOMASY, S.M. et al. Effects of feline herpesvirus type 1 on tear film break-up time, Schirmer tear test results, and conjunctival goblet cell density in experimentally infected cats. *American Journal of veterinary research*, v.70, p. 394-403, 2009.

MACIEL, C.E.S.; RIBEIRO, A.P.; RUIZ, T. et al. Descrição clínico-cirúrgica de quatro casos de transposição da comissura labial para correção de coloboma palpebral em gatos Camila do Espírito. *Acta Sci. Vet.*, v.44, supp.1, p.1-6, 2016.

MENGHER, L.S.; PANDHER, K.S.; BRON, A.J. et al. Effect of sodium hyaluronate (0.1%) on break-up time (NIBUT) in patients with dry eyes. *British Journal of Ophthalmology*, v.70, p. 442-447, 1986.

PECHE, N.; KÖSTLIN, R.; REESE, S. et al. Postanaesthetic tear production and ocular irritation in cats. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, v.43, n.2, p.75-82, 2015.

DI PIETRO, S.; MACRI, F.; BONARRIGO, T. et al. Effects of medetomidine-ketamine combination on Schirmer tear test I results of clinically normal cats. *American Journal of Veterinary Research*, v.77, n.3, p-310-314, 2016.

RIBEIRO, A.P. Oftalmologia. In: Crivellenti, L.Z. & Borin-Crivellenti S. Casos de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais, 1ed. São Paulo: MedVet, 2015. p.417-459.

SEBBAG, L.; KASS, P.H.; MAGGS, D.J. References values, interest correlations, and test-retest repeatability of selected tear film tests in healthy cats. *Journal of the American veterinary medical association*, v. 246, p. 426-435, 2015.

SEBBAG, L.; REILLY, C.M.; EID R. et al. Goblet cell density and distribution in cats with clinically and histologically normal conjunctiva. *Veterinary Ophthalmology*, v.19, p. 1-6, 2016.

STILES, J. Feline Ophthalmology. In: Gelatt K.N. *Veterinary ophthalmology*. 5ed. New York: John Wiley & Sons, 2013. p. 1477-1559.

SWEENEY D.F.; MILLAR, T.J.; RAJU, S.R. Tear film stability: a review. *Experimental eye research*, v. 117, p. 28-38, 2013.

ZHENG, X.; GOTO, T.; OHASHI, Y. Comparison of *in vivo* efficacy of different ocular lubricants in dry eye animal models. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* v.29, p.3454-3460. 2014.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of 0.15% sodium hyaluronate and 0.5% carboxymethylcellulose on tear film breakup time in healthy dogs and in dogs with keratoconjunctivitis sicca

[Efeito do hialuronato de sódio a 0.15% e da carboximetilcelulose sódica a 0.5% no tempo de ruptura do filme lacrimal de cães saudáveis e com ceratoconjuntivite seca]

G. M. Madruga, A.P. Ribeiro*, T.B.Magalhães, L.A.S. Rondelli, F.H. Furlan,

Universidade Federal de Mato Grosso - Cuiabá, MT

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of the 0.15% sodium hyaluronate (SH) and of 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) on tear film breakup time (TFBUT) in 10 healthy dogs and in 32 eyes of dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS). In addition, the goblet cell density (GCD) of this population was quantified. TFBUT was assessed at baseline and at different time points following the instillation of SH and CMC. KCS was graded as mild, moderate and severe. GCD were quantified from conjunctival biopsies. The number of GCD differed significantly between patients with mild and moderate KCS ($P<0.01$). TFBUT of healthy dogs increased only at 1 minute after treatment with SH ($P<0.01$). Regarding baseline and treatments, SH significantly increased TFBUT for up to 30 minutes on the ocular surface, in comparison to CMC, in all categories of KCS ($P<0.01$). TFBUT and GCD correlated positively when the healthy and diseased eyes were grouped ($r=0.41$, $P=0.006$). It can be concluded that in dogs with KCS, SH lasts longer periods on the ocular surface than CMC, but such agents does not increase TFBUT in healthy dogs.

Keywords: goblet cells, tear stability, lacrimomimetics, instillations

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos do hialuronato de sódio a 0.15% (HS) e da carboximetilcelulose a 0.5% (CMC) no tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) em 10 cães saudáveis e em 32 olhos de cães com ceratoconjuntivite seca (CCS). Ademais, considerou-se quantificar a densidade de células caliciformes (DCC) dos mesmos. O TRFL foi aferido para obtenção de valores basais e em momentos distintos após a instilação do HS e da CMC. Graduou-se a CCS em leve, moderada e severa. A DCC foi quantificada a partir de biópsias conjuntivais. A DCC diferiu apenas entre pacientes com CCS leve e severa ($P<0.01$). Em cães saudáveis, o TRFL se elevou apenas após 1 minuto do tratamento com HS

(P<0.01). Relativamente ao período basal e entre os tratamentos, o HS elevou o TRFL de forma mais eficaz e permaneceu por até 30 minutos na superfície ocular, comparativamente à CMC, em todas as categorias de CCS (P<0.01). Ao se agrupar os olhos saudáveis e os com CCS, o TRFL se correlacionou com a DCC ($r=0.41$, $p=0.006$). Conclui-se que o HS permanece por maior tempo na superfície ocular que a CMC em cães com CCS, mas que tais substâncias não elevam o TRFL em cães saudáveis.

Palavras-chave: células caliciformes, estabilidade lacrimal, lacrimomiméticos, instilações.

INTRODUCTION

In dogs, tear film abnormalities most commonly arose from the decrease in its aqueous component and are known as keratoconjunctivitis sicca (KCS). In this species, KCS usually results from idiopathic immune-mediated T and B-cell inflammation, which lead to destruction of the lacrimal glands (Giuliano, 2013). Other causes include drug toxicity (sulfonamides, etodolac, and atropine), anesthetic agents, neurogenic, iatrogenic (excision of nictitans gland), endocrine disorders, irradiation, infectious lacrimal adenitis (distemper and leishmaniasis), chronic blepharoconjunctivitis, and congenital hypoplasia (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015). In dogs, this can also occur as a qualitative abnormality, due to deficiency in the lipid (produced by tarsal glands) or mucin (produced by conjunctival goblet cells) layers, resulting in tear film evaporation and instability, respectively (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015). Schirmer tear test (STT) is the main tool used to diagnose KCS in dogs (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015). In addition, grading the KCS in accordance with STT results as mild, moderate and severe may dictate the prognosis of this disease (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015). Nonetheless, patients with qualitative abnormalities may present STT within the reference ranges and decreased tear film breakup time (TFBUT). Both tear deficiencies cause conjunctivitis, ocular discomfort, and ulcerative and non-ulcerative keratites that may lead to blindness (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015). For the management of these diseases, lacrimomimetics are recommended until lacrimostimulants, such as cyclosporine and tacrolimus are able to rise STT values above 15 mm/min. (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015).

Lacrimomimetics are tear film substitutes that attempt to supplement all parts of the tear film, increasing the volume and stability of this layer, and protecting the ocular surface against desiccation (Araujo and Galera, 2016). Sodium hyaluronate (SH) is a glycosaminoglycan, present in natural tears, with excellent viscoelastic, lubricating and water retention properties (Araujo and Galera, 2016). Carboxymethylcellulose (CMC) is the most commonly used agent in commercial formulations, as it has desirable mucoadhesive and

viscoelastic properties and a high retention time on the ocular surface (Araujo and Galera, 2016).

The retention time of the SH and CMC on the ocular surface have been determined in humans with KCS, as well as in rabbits and rats with experimentally-induced KCS (Mengher *et al.*, 1986; Hamano *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2015). Studies carried out in dogs only have shown that SH and other lacrimomimetics improve the clinical signs related to the ocular surface desiccation (Williams and Mann 2013, Hasegawa *et al.*, 2016). Although the literature recommend that lacrimomimetics should be instilled more than 6 times a day, studies with regard to retention time of such agents on the ocular surface of dogs have not been published (Williams and Mann 2013; Ribeiro, 2015).

Thus, this study aimed to determine and compare the effects of 0.15% SH and 0.5% CMC on the stability of the tear film, by means of TFBUT assessment in healthy dogs and in those with KCS with different grades. Considering that the conjunctival goblet cell density (GCD) may help to diagnose KCS and, so far, only one study evaluated such parameter in dogs with qualitative KCS (Cullen *et al.*, 2005), we also considerate to assess possible correlations between the GCD and TFBUT in the population of dogs studied.

MATERIALS AND METHODS

The experimental and clinical study were approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals of XXXX (protocols 23108.118102/2015-51 and 23108.188779/2016-59). Ten healthy (8 female and two male) dogs, of breeds poodle (n=4) and yorkshires (n=6), with average age and weight of 3 years and 2.5kg, respectively, were used. For the inclusion criteria, healthy animals were selected based on a full clinical and ophthalmic examination. In addition, complete blood cell count, as well as alanine transaminase, creatinine, and urea were carried out. Selected dogs were kept in a room with 500 lux luminosity, 60 to 62% of relative humidity, 22 to 26 °C of temperature (Medidor Multifunção ITMP-600[®], Instrutemp Instrumentos de Medição Ltda, Brasil), were exposed to 12 hours of light/dark cycle, fed with dog dry pellet twice daily, and provided with water *ad libitum*.

Patients admitted to the ophthalmology service of the Veterinary Teaching Hospital of the XXXXX with STT values less than 15mm/minutes, presenting at least one of the following clinical signs: ocular discharge, conjunctival hyperemia, and corneal abnormalities such as edema, neovascularization, and melanosis were diagnosed with KCS. The degree of KCS were graded in accordance with STT readings into three categories: mild (11-

14mm/min.), moderate (6-10mm/min.), and severe (0-5mm/min.) (Giuliano, 2013). Only dogs with the immune-mediated form of KCS were included in the study.

Previously to the beginning of the experiment, healthy individuals were adapted for a period of 7 days to the procedures and examiners. The TFBUT was performed following the instillation of one drop of 0.1 mL of 1% sodium fluorescein (Fluoresceínasódica 1%, Allergan[®], Inc., São Paulo) at the dorsal bulbar conjunctiva and the eyelid was held closed. After a manually controlled blink, the eyelids were gently held open in synchrony with the start of a chronometer and the dorsolateral corneal surface was observed with 16x magnification and cobalt blue filter of a slit-lamp biomicroscope (SL-14[®], Kowa Company, Tokyo, Japan). The chronometer was stopped when the first sign of tear film breakup was seen, which was interpreted by the observation of one or more dark striae among the green fluorescence of the ocular surface. The TFBUT was performed in one eye at a time, and at the end of the procedure, the ocular surface was rinsed with saline.

After the acclimation period, TFBUT was performed as aforementioned before in order to obtain baseline values. Afterwards, TFBUT was assessed following 1, 5, and 10 minutes of the instillation of one drop of a preservative free 0.15% sodium hyaluronate (SH) (Hyabak 0,15%[®], Genon, São Paulo, Brasil) or 0.5% sodium carboxymethylcellulose (CMC) (Fresh Tears 0,5%[®], Allergan, Inc., São Paulo). In all occasions, the evaluations were performed in a blind fashion in regard to treatments and time points. In addition, in order to avoid bias in regard to lacrimal stimulation, each measurement was performed with a washout period of 24 hours. During the acclimation period and the experimental phase, TFBUT was always assessed at 1 P.M.

The same methodology adopted to assess TFBUT in healthy dogs were used in the patients with KCS. Except that the patients enrolled in this study were owned client dogs, allowed to participate in the experiment with the owner consent. In this population, the period of acclimation was of only two days. At day three, baseline TFBUT values were established. Afterwards, these parameters were assessed following 1, 5, 10, 30 and 60 minutes of the instillation of the same lacrimomimetics used in the healthy subjects. The same criteria with regard to intervals between evaluations, as well as the hour of the day established to perform the TFBUT in healthy dogs were adopted to the dogs with KCS.

At the end of the experimental phase, the ocular surface was rinsed with 0.5% povidone-iodine solution. Afterwards, one drop of 0.5% proxymetacaine (Anestalcon[®] Alcon Laboratorios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) was instilled and following a two minute interval, a specimen of conjunctiva measuring 3.0 mm² was collected

from the ventral nasal fornix. Samples were routinely prepared and stained with Hematoxylin and Eosin and Acid Periodic Schiff. Under 40x of magnification the nuclei of 200 epithelial basal conjunctival cells were counted, and the amount of goblet cells present at those sites were quantified (GCD).

Shapiro-Wilk test was used to assess data normality. Comparisons of TFBUT values among periods were assessed by one way analysis of variance (1-ANOVA for repeated measures in healthy dogs and regular 1-ANOVA for dogs with KCS), followed by Tukey's test. TFBUT values between treatments were assessed by a 2-ANOVA, followed by Bonferroni's test. TFBUT and GCD values among healthy and diseased dogs were compared by Tukey's test. Possible correlations between the GCD and TFBUT values were assessed by Person's test. In all occasions, differences were considered significant when $P < 0.05$. Data were present as mean \pm standard error of mean.

RESULTS

In healthy dogs, TFBUT assessed before and after treatments with CMC ($P=0.24$) and SH ($P=0.23$) did not change significantly between the RE and LE. Average TFBUT assessed during baseline was 11.34 ± 4.30 seconds. Following 1 ($P=0.46$), 5 ($P=0.95$), and 10 minutes ($P=0.99$) of the instillation of CMC, TFBUT values did not change, in comparison to baseline values (Fig. 1). After treatment with SH, TFBUT increased significantly only in the first minute of evaluation, when compared to baseline ($P=0.003$) and the other time points ($P<0.01$) (Fig. 1). Comparisons between CMC and SH showed that the TFBUT increased significantly by 3.8 seconds ($P<0.01$) in SH treated-eyes, only in the first minute of evaluation (Fig. 1).

Third two eyes of 24 patients (14 females and 10 males) with KCS met the inclusion criteria. Only one eye was affected in 16 dogs, and in 8, both eyes were affected. Breeds enrolled were boxer (1 eye), shi tzu (4 eyes), pechinese (1 eye), poodle (8 eyes), french bulldog (1 eye), beagle (2 eyes), lhasa apso (3 eyes), and mixed breed (12 eyes). From the 32 eyes included, 10 were graded as mild, 10 as moderate, and 12 as severe KCS.

TFBUT assessed during baseline in dogs with mild, moderate, and severe KCS, was, 8.04 ± 0.38 , 5.59 ± 0.31 , and 4.44 ± 0.33 seconds, respectively. When the 32 eyes with KCS were grouped, TFBUT was 5.93 ± 0.33 seconds. Average TFBUT of healthy dogs was significantly higher, when compared to all categories of dogs with KCS ($P<0.01$). In comparisons among categories, statistical significance was observed only between patients with mild and severe KCS ($P<0.01$).

In dogs with mild KCS, TFBUT values increased significantly only in the first minute of evaluation, following the instillation of CMC ($P=0.0005$) (Fig. 2A). In patients with moderate and severe KCS, such parameter increased significantly only during the first 10 minutes of evaluation, following the instillation of CMC ($P<0.05$) (Fig. 2B and C); the same results were achieved after the eyes were treated with SH, in patients with mild KCS ($P<0.05$) (Fig. 2D). In the eyes graded as moderate and severe, such parameter increased significantly up to 30 minutes ($P<0.05$) (Fig. 2D and F).

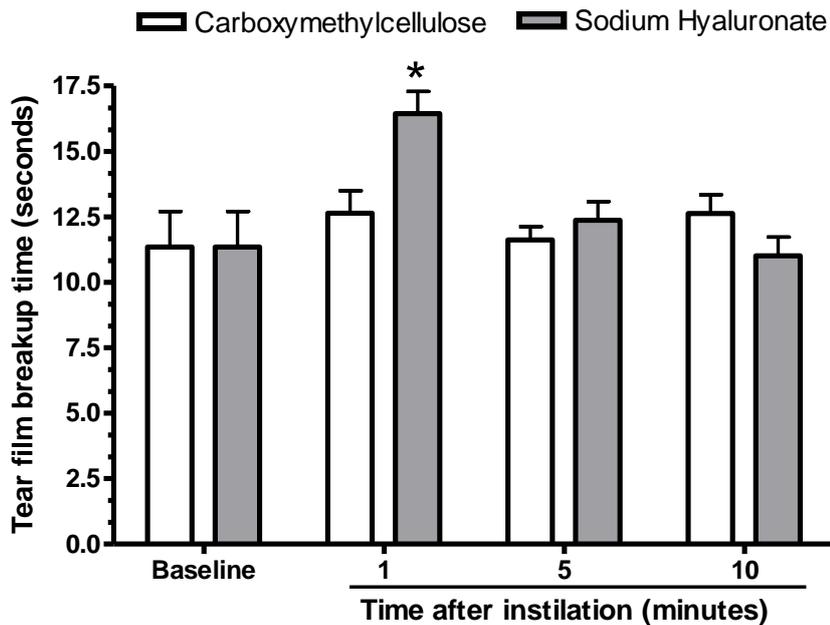


Figure 1. Values of tear film breakup time before (baseline) and following 1, 5, and 10 minutes of the instillation of 0.15% sodium hyaluronate and 0.5% carboxymethylcellulose in healthy dogs. * $P<0.01$ in comparison to baseline and other time points of both agents.

Comparisons between treatments showed that SH was significantly more efficient in increasing the TFBUT values in almost all time points, and in all categories of KCS ($P<0.01$) (Fig. 3A, B and C). When the 32 eyes with KCS were grouped, higher values of TFBUT were seen for up to 30 minutes after treatment with SH ($P<0.01$) (Fig. 3D).

In healthy dogs, average conjunctival GCD between RE and LE was 111 ± 5.76 . Average GCD in the eyes with mild, moderate, and severe KCS was 109.20 ± 5.22 , 88.10 ± 10.71 , and 47.25 ± 11.11 , respectively (Fig. 4A, B and C). GCD of healthy dogs was significantly higher, only when compared with the eyes graded with severe KCS ($P<0.01$) (Fig. 4D). Among dogs with KCS, statistical significance was only observed between the eyes graded as mild and severe ($P<0.01$) (Fig. 4D). In healthy dogs, TFBUT and GCD did not

correlate ($r=0.11$, $P=0.33$). Likewise, correlations between the same parameters were not found in the eyes with mild ($r=0.11$, $P=0.74$), moderate ($r=-0.01$, $P=0.95$), and severe KCS ($r=0.08$, $P=0.79$). However, when the eyes of healthy dogs were grouped with the eyes of all categories of KCS, positive correlation between TFBUT and GC was observed ($r=0.41$, $P=0.006$) (Fig. 5).

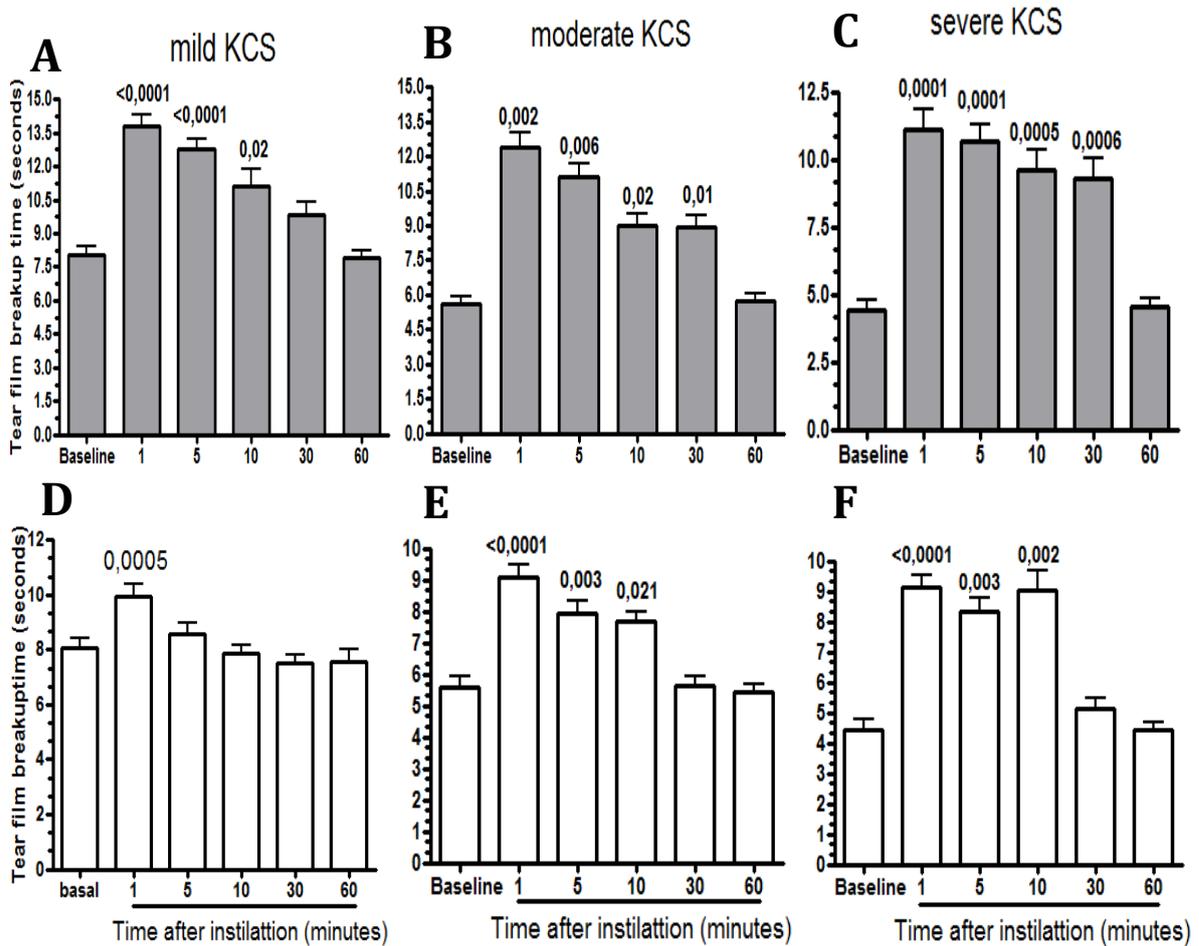


Figure 2. Values of tear film breakup time before (baseline) and following 1, 5, 10, 30, and 60 minutes of the instillation of 0.15% sodium hyaluronate (white bars) and 0.5% carboxymethylcellulose (grey bars) in dogs with mild (A and D), moderate (B and E), and severe (C and F) keratoconjunctivitis sicca (KCS). P values above bars differ significantly from baseline.

DISCUSSION

In the present study, average TFBUT in healthy dogs (poodles and yorkshires) was 11.34 seconds (range 6.96 to 18.66 seconds). In beagles, such values varied from 19.67 to 21.53 seconds in two studies (Moore *et al.*, 1987; Saito e Kotani, 2001). In healthy mesocephalic breeds, average TFBUT was 15.21 seconds (range 7.0 to 26.0 seconds) (Evans *et al.*, 2012).

In healthy brachycephalic breeds, values reported in different parts of the world varied from 10.77 (United States) to 13.66 seconds (Brazil) (Arnold *et al.*, 2014; Kobashigawa *et al.*, 2015). Although the study performed in healthy dogs has been conducted in a controlled environment, it is assumed that changes in the TFBUT values reported the literature may be related to differences with regard to temperature and humidity (Moore *et al.*, 1987; Saito e Kotani, 2001; Arnold *et al.*, 2014; Kobashigawa *et al.*, 2015).

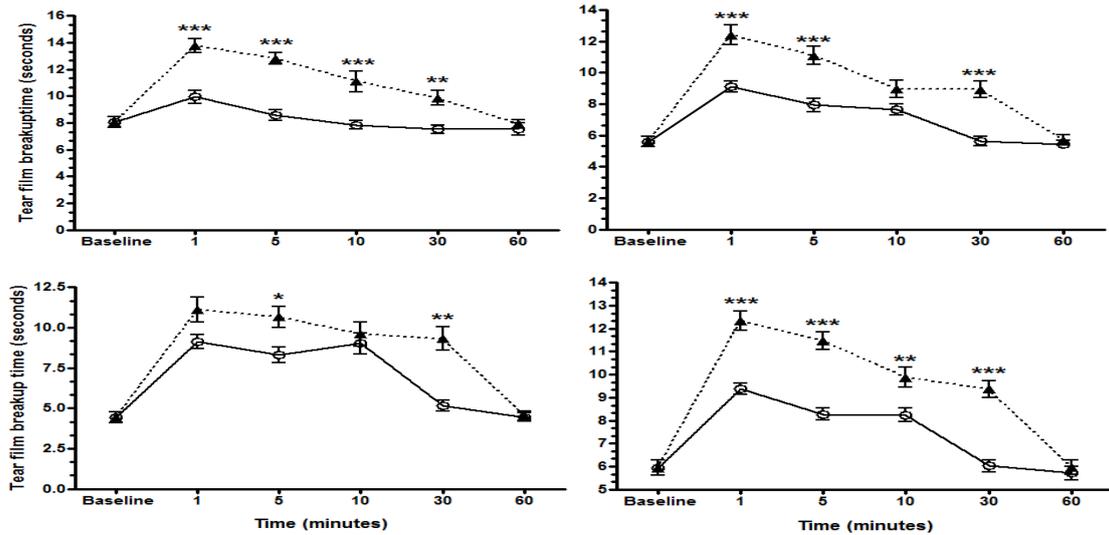


Figure 3. Values of tear film breakup time before (baseline) and following 1, 5, 10, 30, and 60 minutes of the instillation of 0.15% sodium hyaluronate (triangle) and 0.5% carboxymethylcellulose (circle) in dogs with mild (A), moderate (B), severe (C) keratoconjunctivitis sicca (KCS), and after grouping all categories (D). *(P<0.05), **(P<0.01), and ***(P<0.0001) between treatments.

It is assumed that lacrimomimetics may reduce the signs of ocular discomfort related to blepharoconjunctivitis caused by the contact of hair and cilia, in dogs with eyelid abnormalities, and in those with ulcerative keratitis (Ribeiro, 2015). Differently from our hypothesis, except by the fact that TFBUT increased 3.8 seconds, following 1 minute of the instillation of SH, both lacrimomimetics tested in the present study did not remain on the ocular surface of healthy dogs for not even 5 minutes. The same authors have observed similar results in a experiment conducted in healthy cats. It is believed that neuronal and chemical reflexes evoked by such agents may have stimulated tear secretion, helping these lubricants to be washed out from the ocular surface. Therefore, it is advised to test the effects of the same agents in higher concentrations, once dogs with acute blepharoconjunctivitis and

ulcerative keratitis without KCS, usually present STT values above 15 mm/minutes (Ribeiro, 2015).

The present study was the first one to evaluate the TFBUT in different categories of dogs with KCS. Although values of such parameter decreased in accordance with the disease severity, statistical significance was only observed between the eyes graded as mild and severe. Considering the 32 eyes with KCS, TFBUT values (5.93 seconds, range 2.10 to 11.2 seconds) were similar to those reported in another research (6.2 to 7 seconds) conducted in dogs with KCS (Chen and Powell, 2015). In the study of Chen and Powell (2015), STT values ranged from 0 to 13 mm/minute, but authors did not separate the eyes with KCS in different categories. In diabetic dogs with qualitative KCS, TFBUT was 6.55 seconds, also similar with the ones observed in our study (Cullen *et al.*, 2005).

In dogs with KCS, responsive eyes to cyclosporine and tacrolimus therapy take at least 30 days to achieve STT values similar to that of healthy individuals (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015). Thus, lacrimomimetics should be used to alleviate the signs of such disease in the beginning of treatment. Several studies evaluated the effects of SH in humans with KCS (Mengher *et al.*, 1986; Hamano *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2006). Different authors have reported that one drop of 0.1% SH was able to enhance TFBUT for up to 40 minutes (Mengher *et al.*, 1986). Other authors have reported that the same agent, increased this parameter for up to 180 minutes (Hamano *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2006). *In vitro*, CMC remained bound to human corneal epithelium cells for up to 2 hours (Garrett *et al.*, 2007). However, studies in humans with KCS have shown that 0.5% CMC increased TFBUT by only 2 seconds during 5 minutes (Simmons e Vehige, 2007). Another research conducted in humans with KCS, did not considerate to assess the retention time of 0.5% CMC in minutes; authors have only reported that following several weeks of treatment, TFBUT values increased significantly in comparison to pre-treatment phase (Lee *et al.*, 2011). Comparisons between 0.5% CMC and 0.1% SH showed that TFBUT increase in a similar fashion in humans with KCS, under continuous treatment for 4 and 8 weeks (Lee *et al.*, 2011). It was observed that the same agents increased TFBUT for up to 20 minutes in rabbits and rats with experimentally-induced KCS, without statistical significance between both drugs (Zheng *et al.*, 2014).

In all categories of KCS evaluated herein, it was observed that both 0.1% SH and 0.5% CMC increased TFBUT, with the former being more efficient and lasting longer periods on the ocular surface. However, SH was able to remain in the ocular surface for only 30 minutes. Therefore, is reasonable to infer that such agents should be instilled every 30

minutes, and not every 4 to 6 hours, as recommended by the veterinary literature (Giuliano, 2013; Ribeiro, 2015; Williams and Mann 2013). A study carryout in dogs, have demonstrated that both application frequency and KCS symptoms are reduced, when the concentration of SH is increased and its molecule is modified (Williams and Mann, 2013). However, the same authors did not evaluate for how long this modified SH remained in the ocular surface of dogs with KCS (Williams and Mann, 2013). In humans with KCS, and in laboratory animals with experimentally-induced KCS, concentrations of 1% CMC and 0.3% SH were significantly more efficient in enhancing the TFBUT values than solutions of the same drugs with concentrations at 0.5% and 0.1% (Simmons e Vehige, 2007; Zheng *et al.*, 2014). However, Park *et al.* (2015) did not report differences when 0.1%, 0.15%, and 0.3% SH were compared in the eyes of humans with KCS. Another paper described that when both CMC and SH are compounded in the same solution, TFBUT and the GCD of rats improve substantially when compared with treatments where each agent are used separately (She *et al.*, 2015).

The number of epithelium conjunctival cells used to quantify the GCD vary substantially among the studies conducted in dogs, and does not allow direct comparisons with our results (Moore *et al.* 1987; Cullen *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2012). In those studies, authors did not considerate to correlate GCD with TFBUT (Moore *et al.* 1987; Cullen *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2012). Cullen *et al.* (2005) quantified the GCD in healthy dogs, and in those with senile and diabetic cataract. Despite authors have verified a significant reduction in TFBUT of diabetic dogs, GCD did not differ significantly between groups (Cullen *et al.* 2005). In our study, GCD was similar between healthy dogs and those with mild KCS. Despite the quantitative of these cells have decreased in patients with the moderate form of the disease, significant reduction was only observed in the eyes graded with severe KCS. However, positive correlation was noticed between TFBUT and GCD when all categories of eyes with KCS and the healthy eyes were grouped. STT is still considerate the gold standard test used to diagnose and grade the quantitative form of KCS in dogs (Giuliano, 2013). However, our results suggest that despite the absence of significance between GCD among the categories of healthy dogs and those with mild and moderate form of KCS, that the tear film stability tends to reduce in a linear fashion as the disease progresses.

CONCLUSION

In this study, 0.15% SH and 0.5% CMC were able to increase TFBUT only in dogs with KCS. However, SH was significantly more efficient and remained for longer periods in the ocular surface. Therefore, it is assumed that more than 6 instillations per day are necessary to

maintain the ocular surface of dogs with KCS lubricated, once HS does not remain in the ocular surface for more than 30 minutes. Correlations between GCD and TFBUT showed that the tear film stability tends to reduce in a linear fashion from the mild to severe form of KCS. Such findings suggest that immune-mediated KCS of dogs tends to shift from a quantitative to a quali-quantitative disorder as the disease progresses.

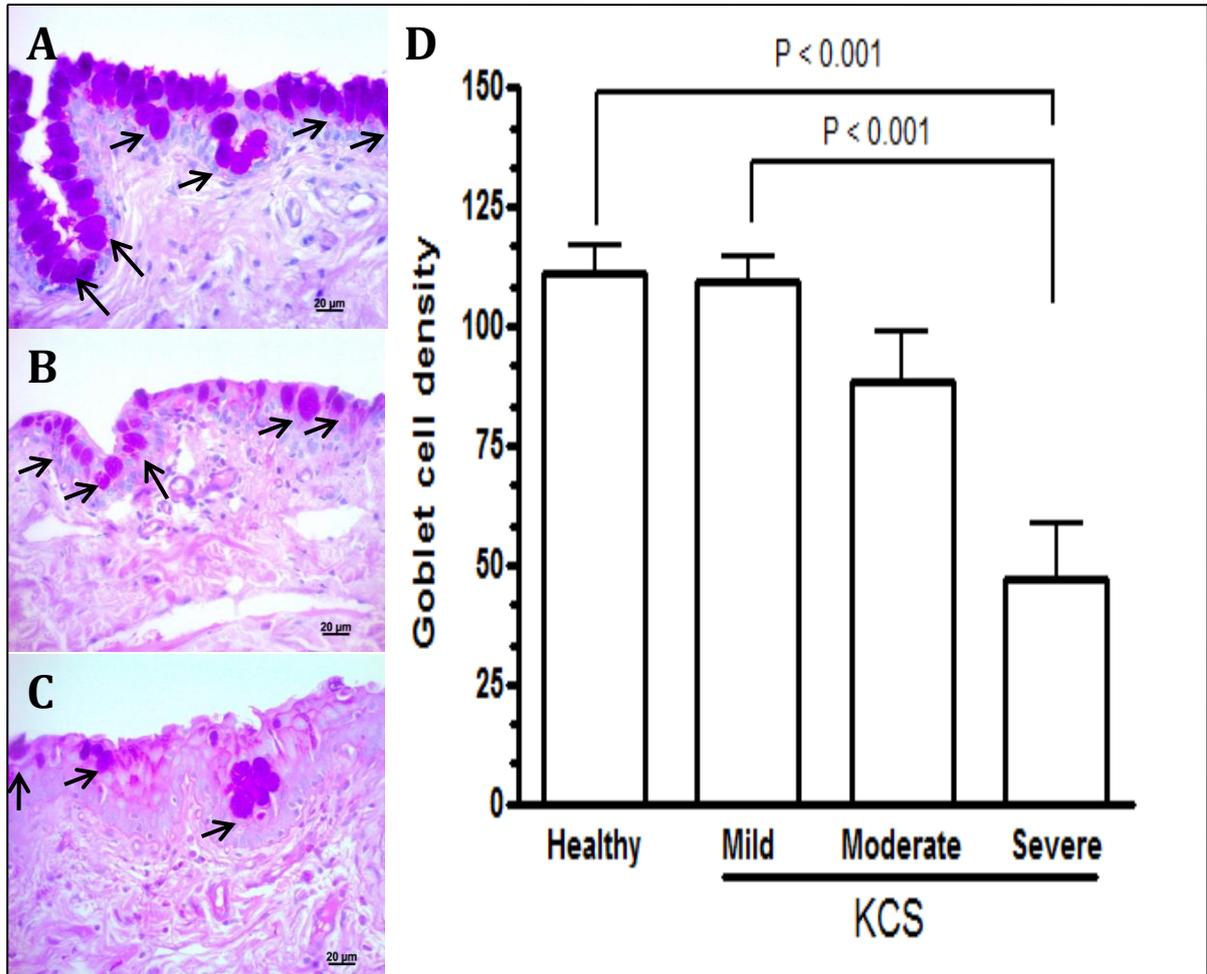


Figure 4. Representative images of conjunctival specimens depicting the periodic acid Schiff-positive goblet cells (GCD) (arrows) of dogs with mild (A), moderate (B), and severe (C) keratoconjunctivitis sicca (KCS). Bars=20μm. In D, it can be observed values of GCD among healthy dogs and those with KCS at different grades.

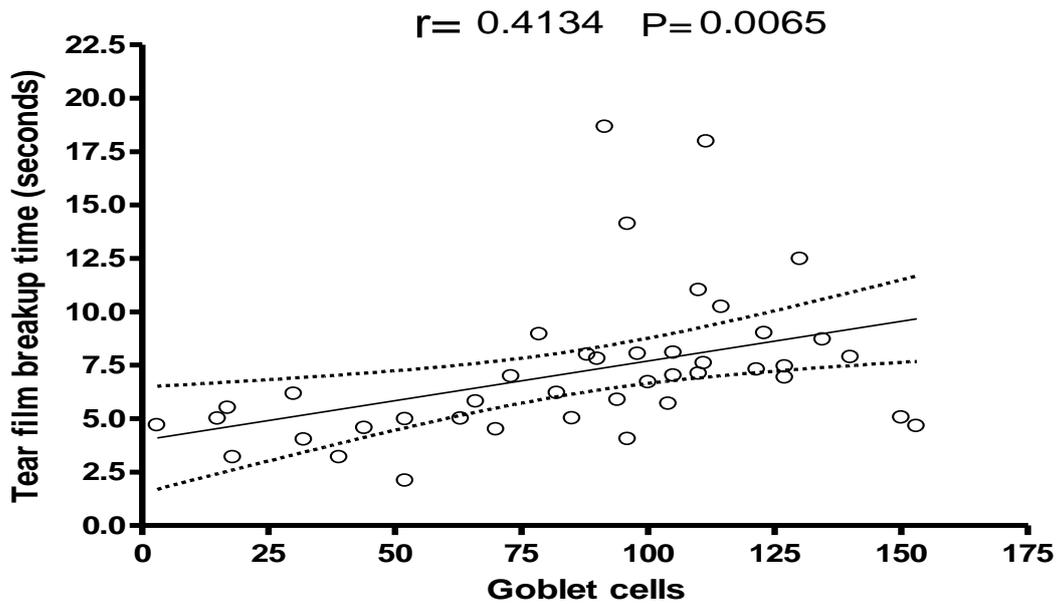


Figure 5. Linear regression curve indicating positive correlation between the tear film breakup time and the conjunctival goblet cells, considering the eyes of 10 healthy dogs and the 32 eyes of patients with mild, moderate, and severe keratoconjunctivitis sicca. The dotted line indicates the 95% confidence interval.

REFERENCES

- ARAUJO, D.M.L.; GALERA, P.D. Ocular lubricants: what is the best choice? *Cienc. Rural*, v.46, p.2055-2063, 2016.
- ARNOLD, T.S.; WITTENBURG, L.A.; POWELL, C.C. Effect of topical naltrexone 0.3% on corneal sensitivity and tear parameters in normal brachycephalic dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v.17, p.328-333, 2014.
- CHEN T, POWELL CC. Effect of once daily topical 0.3% naltrexone on tear parameters and corneal sensitivity in dogs with uncontrolled keratoconjunctivitis sicca: a double-masked randomized placebo-controlled clinical trial. *Vet. Ophthalmol.*, v.18, p.497-501, 2015.
- CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A. *et al.* Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v.8, p.215-224, 2005.
- EVANS, P.M., LYNCH, G.L, LABELLE P. Effects of oral administration of diphenhydramine on pupil diameter, intraocular pressure, tear production, tear film quality, conjunctival goblet cell density, and corneal sensitivity of clinically normal adult dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.73, p.1983-1986, 2012.
- GARRETT, Q.; SIMMONS, P.A.; XU, S. *et al.* Carboxymethylcellulose binds to human

- corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.48, p.1559-1567, 2007.
- GIULIANO, E.A. Diseases and surgery of canine lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. (Eds.) *Veterinary ophthalmology*. 5th ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2013. p.912-945.
- HAMANO, T.; HORIMOTO, K.; LEE, M. *et al.* Sodium hyaluronate eye drops enhance tear film stability. *Jpn. J. Ophthalmol.*, v.40. p.62-65, 1996.
- HASEGAWA, T.; TANAKA, S.; SAWA, S. Clinical trial of a tear substitute containing 0.1% polyvinyl alcohol, 0.3% sodium hyaluronate, and 5% dodecahydrosqualene in 14 dogs with keratoconjunctivitis sicca: a pilot study. 47th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Monterey, CA October 26-29, 2016. *Vet. Ophthalmol.*, v.19, p.26, 2016.
- JOHNSON, M.E.; MURPHY, P.J.; BOULTON, M. Effectiveness of sodium hyaluronate eye drops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v.244, p.109-112, 2006.
- KOBASHIGAWA, K.K.; LIMA, T.B.; PADUA, I.R.M. Ophthalmic parameters in adult Shih Tzu dogs. *Cienc. Rural.*, v.45, p.1280-1285, 2015.
- LEE, J.H.; AHN, H.S., KIM, E.K. *et al.* Efficacy of Sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose in treating mild to moderate dry eye disease. *Cornea*. v.30. p.175-179, 2011.
- MENGHER, L.S.; PANDHER, K.S.; BRON, A.J. *et al.* Effect of sodium hyaluronate (0.1%) on break-up time (NIBUT) in patients with dry eyes. *Br. J. Ophthalmol.* v.70. p.442-447, 1986.
- MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V. *et al.* Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.28, p.1925-1932, 1987.
- PARK, Y.; SONG, J.S.; CHOI, C.Y. *et al.* A randomized multicenter study comparing 0.1%, 0.15%, and 0.3% sodium hyaluronate with 0.05% cyclosporine in the treatment of dry eye. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2016. Ahead of print. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jop.2016.0086>. Accessed in: 04 jan. 2017.
- RIBEIRO, A.P. Oftalmologia. In: CRIVELLENTI, Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S. (Eds.). *Casos de rotina em medicina veterinária de pequenos animais*, 2.ed. São Paulo: MedVet, 2015. p. 683-722.
- SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Vet. Ophthalmol.*, v.4, p.7-11, 2001.

- SHE, Y.; LI, J.; XIAO, B.; LU, H. *et al.* Ocular evaluation of a novel artificial tear in the prevention and treatment of dry eye in an animal model. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, v.31, p.525-30. 2015.
- SIMMONS, P.A.; VEHIGE, J.G. Clinical performance of a mid-viscosity artificial tear for dry eye treatment. *Cornea*, v.26, p.294–302, 2007.
- WILLIAMS, D.L.; MANN, B.K. A crosslinked HA-based hydrogel ameliorates dry eye symptoms in dogs. *Int. J. Biomater.*, 2013. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690250/>. Accessed in: 04 jan. 2017.
- YAO, K.; BAO, Y.; YE, J. *et al.* Efficacy of 1% carboxymethylcellulose sodium for treating dry eye after phacoemulsification: results from a multicenter, open-label, randomized, controlled study. *BMC Ophthalmol.*, v.15, p.2-10, 2015.
- ZHENG, X.; GOTO, T.; OHASHI, Y. Comparison of *in vivo* efficacy of different ocular lubricants in dry eye animal models. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* v.29, p.3454-3460. 2014.

APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Manuscript ID ABMVZ-2017-9733



Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia <onbehalfof+abmvz.artigo+abmvz.org.br



Responder | v

sex 20/01/2017 15:55

Para: ribswimmer@icloud.com

Cc: gabrielamadruaga@hotmail.com; ribswimmer@icloud.com; tayane.bruna16@hotmail.com; leilane_go@hotmail.com; fhfurlan@gmail.com ↗

20-Jan-2017

Dear Dr. Ribeiro:

Your manuscript entitled "Effect of 0.15% sodium hyaluronate and 0.5% carboxymethylcellulose on tear film breakup time in healthy dogs and in dogs with keratoconjunctivitis sicca" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Your manuscript ID is ABMVZ-2017-9733.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Sincerely,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Editorial Office

APÊNDICE C – QUALIS DO PERIÓDICO

Periódicos Qualis

Dados para Consulta

*Evento de Classificação:

Área de Avaliação
 +

ISSN:

Título:

Classificação:

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0102-0935	ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	MEDICINA VETERINÁRIA	A2
1678-4162	ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ONLINE)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2