

PRODUÇÃO LACRIMAL E DENSIDADE DE CÉLULAS CALICIFORMES CONJUNTIVAIIS EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU

ALINE MARIA VASCONCELOS LIMA¹, NILO SÉRGIO TRONCOSO CHAVES², ANDRÉIA VITOR COUTO DO AMARAL³,
JÚLIA DE MIRANDA MORAES⁴, CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES⁵

1- Pós-Graduanda em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás –
alinevetufg@hotmail.com

2 – Professor Doutor da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

3 - Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás

4 - Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás.

5 - Médico Veterinário graduado pela Universidade Federal de Goiás

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar quantitativa e qualitativamente a produção lacrimal de cães da raça Shih Tzu, confrontando a produção lacrimal na raça Shih Tzu e a descrita em outras raças. A avaliação quantitativa foi realizada em 35 animais, por meio dos testes lacrimais de Schirmer 1 e 2 (TLS-1 e TLS-2), na ausência e na presença de anestesia local, respectivamente. Uma avaliação qualitativa, relativa à camada lacrimal mucosa, foi realizada por meio da obtenção da densidade de células caliciformes (DCC) conjuntivais, em 15 animais. Os valores médios obtidos para TLS-1 foram $19,66 \pm 7,30$ e

$21,97 \pm 5,69$ para o olho esquerdo (OE) e olho direito (OD), respectivamente. Os valores médios obtidos para TLS-2 foram $10,71 \pm 6,10$ e $9,14 \pm 4,78$ para OE e OD, respectivamente. Tanto os valores de TLS-1 quanto os de TLS-2 encontrados para a raça Shih Tzu estão dentro dos padrões de produção lacrimal normal descritos para cães hígdos de outras raças. A densidade de células caliciformes média encontrada para o OE foi de $13,64 \pm 3,44$; e para o OD, de $13,64 \pm 4,07$, valores inferiores aos descritos para cães hígdos de outras raças.

PALAVRAS-CHAVE: braquicefálico; cão; lágrima; mucina; Schirmer.

ABSTRACT

TEAR PRODUCTION AND CONJUNCTIVAL GOBLET CELL DENSITY IN SHIH-TZU DOGS

This study aimed to evaluate the Shih Tzu tear production quantity and quality, in order to compare it with tear production of different breeds previously described. The tear production quantitative evaluation was performed in 35 animals, by Schirmer tear tests 1 and 2 (STT-1 and STT-2), in absence or presence the local anesthetic, respectively. Regarding the mucin tear layer, a qualitative

tear production evaluation was performed in 15 animals through conjunctival goblet cell density (CGCD) analysis. The mean values obtained to STT-1 were 19.66 ± 7.30 and 21.97 ± 5.69 for left eye (LE) and right eye (RE), respectively. The mean values obtained to STT-2 were 10.71 ± 6.10 and 9.14 ± 4.78 for LE and RE, respectively. Both STT-1 and STT-2 values found to the

Shih Tzu dogs are within tear production standards of other breeds previously described. The mean CGCD found to LE was 13.64 ± 3.44 , and to RE it was $13.64 \pm$

4.07. These values are lower than those described for other breeds.

KEYWORDS: brachycephalic; dog; mucin; Schirmer; tear.

INTRODUÇÃO

A raça canina Shih Tzu é conhecida principalmente pelo porte pequeno, pelagem exuberante e por suas marcantes características braquicefálicas, como largura e comprimento cranianos aproximadamente iguais e fossa orbital rasa, culminando, respectivamente, num formato arredondado da cabeça e globo ocular proeminente (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA, 2007). Notadamente, as enfermidades oculares assumem proporções relevantes em cães Shih Tzu, destacando-se as lesões que envolvem a superfície ocular, como a ceratoconjuntivite seca e as ceratites pigmentares e ulcerativas (BRANDÃO et al., 2004; WOERDT, 2004; TOLAR et al., 2006). A exoftalmia e a lagoftalmia relativa são fatores anatômicos que corroboram sobremaneira para a fisiopatogenia das lesões oftálmicas no Shih Tzu, uma vez que podem promover tanto inadequada distribuição como evaporação precoce do filme lacrimal sobre a superfície ocular (MOORE, 1999; WOERDT, 2004; SLATTER, 2005). Entretanto, não se pode afirmar que tais elementos sejam os únicos responsáveis por desencadear as lesões oculares nesses animais (SAITO & KOTANI, 1999).

A avaliação da higidez da superfície ocular também deve abordar outros fatores, como a quantidade e a qualidade do filme lacrimal produzido, visto que a lágrima é um fluido imprescindível para manutenção da saúde ocular, especialmente corneana. Estudos que abordam os componentes do filme lacrimal são realizados a fim de acessar a integridade do aparato lacrimal, bem como a higidez da superfície ocular (MOORE et al., 1987).

O teste lacrimal de Schirmer (TLS) é o método padrão para quantificar a produção aquosa da lágrima no cão, podendo ser executado sem anestesia da superfície ocular (TLS-1), ou após instilação de colírio anestésico (TLS-2) (WILLIAMS, 2005). O TLS-1 envolve o estímulo de lacrimagem, e inclui as secreções lacrimais basal e reflexa. O TLS-2 estima somente a secreção lacrimal basal, uma vez que a secreção lacrimal reflexa é suprimida pela anestesia da superfície ocular (SAITO & KOTANI, 1999; BEECH et al., 2003). A higidez da superfície

ocular, bem como a qualidade do filme lacrimal produzido, também pode ser avaliada por meio da quantificação das células calciformes conjuntivais, a qual fornece uma mensuração indireta da produção da mucina pré-ocular (MOORE et al., 1987).

O presente trabalho objetivou avaliar a integridade de componentes do aparato lacrimal e a saúde da superfície ocular de cães da raça Shih-tzu por meio do TLS-1, TLS-2 e da obtenção da densidade de células calciformes conjuntivais.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta cães da raça Shih Tzu, entre dois e cinco anos de idade, foram avaliados em canis particulares do município de Goiânia. A avaliação consistiu de identificação, exame clínico e oftálmico. O exame clínico compreendeu a observação do estado geral, do grau de hidratação e da coloração das mucosas conjuntival, gengival e genital; a aferição da frequência cardíaco-respiratória, do pulso e da temperatura retal; e palpação dos linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos. O exame oftalmológico foi realizado com auxílio de fonte de luz, lente de magnificação e oftalmoscópio direto (Pan Optic, Welch Allyn®, New York, USA). Foram examinados o aspecto e simetria do globo ocular, as conjuntivas palpebral e bulbar, a região periocular, a córnea, o humor aquoso, a íris, a lente e o fundo ocular. Foram incluídos no experimento trinta e cinco animais, sendo 33 fêmeas e dois machos, os quais não apresentaram qualquer alteração aos exames físico e oftálmico.

Os animais foram testados no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, sempre no período vespertino. Os Testes Lacrimais de Schirmer foram executados nos olhos direito e esquerdo dos 35 animais, de acordo com o procedimento descrito por MOORE (1999), utilizando-se tiras de papel de filtro Whatman nº. 41 (Teste de Schirmer Ophthalmos, Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil). Os mesmos animais submetidos ao TLS-1 foram testados com o TLS-2, conforme a descrição de BERGER & KING

(1998), utilizando-se como colírio anestésico o cloridrato de proparacaína a 0,5% (Anestalcon, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

Logo após os TLS-1 e TLS-2, foi realizada a biópsia conjuntival nos olhos direito e esquerdo de 15 animais. Após a limpeza ocular com solução fisiológica, foi instilado, em ambos os olhos, um colírio anestésico à base de cloridrato de proparacaína a 0,5% (Anestalcon, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), na frequência de uma gota a cada 30 segundos, durante três minutos, como foi recomendado por SLATTER (2005). A cada minuto também se instilou uma gota de cloridrato de fenilefrina a 10% (Fenilefrina, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil). Em seguida, o fórnice conjuntival ventral nasal foi delicadamente pinçado e um fragmento conjuntival de cerca de cinco milímetros foi retirado com auxílio de uma tesoura de ponta romba. Os cães foram protegidos com colares elizabetanos por 24 horas e receberam instilação local de colírio antibiótico a base de tobramicina (Tobramicina, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) na posologia de uma gota a cada quatro horas, durante 48 horas. Cada amostra conjuntival biopsiada foi imediatamente inserida em um recipiente contendo formalina tampoadada a 10%, para fixação. Após 24 horas em formalina, os espécimes foram recortados, inseridos em cassetes individuais e identificados. De acordo com a técnica utilizada rotineiramente pelo Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, houve o processamento e inclusão das amostras em parafina, seguidos de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), de acordo com a técnica descrita por LUNA (1968).

A contagem das células caliciformes (CC) foi realizada no Setor de Patologia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. A DCC, determinada de acordo com CULLEN et al. (1999) e CULLEN et al. (2005), baseou-se na contagem destas e das células epiteliais, incluindo as células epiteliais escamosas, poligonais e basais. As CC foram identificadas pela presença de material intracelular PAS-positivo, conforme o descrito por MOORE et al. (1987). Utilizando-se de uma câmera fotográfica (CCD Color camera SAC – 410NDR, Samsung Electronics, Korea) acoplada a um micros-

cópio trinocular, com aumento de 100X, três imagens fotográficas foram obtidas de cada lâmina. As imagens foram transferidas para o software de análise de imagens Axio Vision 3.1 (Carl Zeiss-Jena Vision, Munchen-Hallbergmoos, Alemanha), o qual foi utilizado para a contagem das células. De cada imagem obtida, 50 CE foram contadas em uma determinada região, onde, posteriormente, se procedeu a contagem de CC. A DCC foi representada pela expressão: número de CC / 50 CE. Esse procedimento foi repetido nas três imagens de cada lâmina, sendo que a média delas resultou na DCC para o olho representado pela respectiva lâmina. O índice de CC foi calculado dividindo-se a DCC por 50.

Os dados obtidos foram avaliados adotando-se um nível de significância de 0,05 e teste T de Student para dados pareados. Análise de regressão foi utilizada para verificar se existiu influência significativa entre os testes lacrimais de Schirmer e o índice de células caliciformes (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e desvios-padrão de cada variável estudada e os valores encontrados para p estão distribuídos na Tabela 1.

TABELA 1 – Média e desvio-padrão de cada variável nos olhos direito e esquerdo

Variável	Média	Desvio-padrão	P
TLS1			
Olho Esquerdo	19,66*	7,3	
Olho Direito	21,97*	5,69	0,047
TLS2			
Olho Esquerdo	10,71	6,1	
Olho Direito	9,14	4,78	0,216
DCC			
Olho Esquerdo	13,64	3,44	
Olho Direito	13,64	4,07	1
ICC			
Olho Esquerdo	0,273	0,069	
Olho Direito	0,273	0,081	1

TLS1: Teste lacrimal de Schirmer 1; TLS2: Teste lacrimal de Schirmer 2; DCC: Densidade de células caliciformes; ICC: Índice de células caliciformes.

Os valores médios de TLS-1 encontrados nos cães Shih Tzu avaliados no presente estudo estão incluídos acima do limite mínimo de 15 mm/min para produção lacrimal proposto por MOORE (1999) para cães hígdos. Tais valores foram próximos aos descritos por HIRSH & KASWAN (1995), SAITO & KOTANI (1999), SLATTER (2005) e WYMAN et al. (2005) para cães hígdos adultos, que corresponderam a $21,3 \pm 3,8$ mm/min; $18,8 \pm 2,3$ mm/min; $19,8 \pm 5,3$ mm/min e $18,64 \pm 4,47$ mm/min, respectivamente. Contudo, quando comparados com os resultados obtidos por SAITO & KOTANI (2001) e HAMOR et al. (2000) para cães hígdos adultos de variadas raças – de $20,2 \pm 2,5$ mm/min e $18,89 \pm 2,62$ mm/min, para a raça Beagle; de $22,9 \pm 4,1$ mm/min para o Retriever do Labrador; de $21,8 \pm 3,7$ mm/min para o Retriever Dourado; e de $15,8 \pm 1,8$ mm/min para o Pastor de Shetland – os valores obtidos para TLS-1 no presente estudo foram ora semelhantes, ora diferentes.

Os valores médios encontrados para o TLS-2 nos cães Shih Tzu estudados estão dentro do intervalo de valores descrito por GELATT et al. (1975), que foram de $11,6 \pm 6,1$ mm/min para cães hígdos. O mesmo fato ocorreu quando comparados com aqueles valores obtidos por SAITO & KOTANI (1999), que constataram um TLS-2 médio de $8,2 \pm 5,4$ mm/min para cães Shih Tzu hígdos. Os valores médios encontrados para o TLS-1 nos dois olhos foram significativamente maiores que os encontrados para o TLS-2. Essa observação está coerente com o descrito por SAITO & KOTANI (1999) e BEECH et al. (2003), uma vez que o TLS-1 envolve, além da produção lacrimal basal, o estímulo de lacrimejamento reflexo, enquanto o TLS-2 estima unicamente a secreção basal.

Embora outros anestésicos já tenham sido utilizados para execução do TLS-2 (GELATT et al.; 1975; SAITO & KOTANI, 1999; SAITO & KOTANI, 2001; TROST et al., 2007), o protocolo de anestesia da superfície ocular utilizado neste estudo está de acordo com o proposto por LAMBERTS et al. (1979) e BERGER & KING (1998). A escolha do cloridrato de proparacaina a 0,5% para anestesia da superfície ocular foi influenciada pelos seguintes fatores: disponibilidade comercial do fármaco, custo, baixa toxicidade córneo-conjuntival e efetividade anestésica para a superfície ocular (AMARAL, 2005; OTERO, 2005). Supõe-se que o princípio do fármaco anestésico poderia alterar os valores de

TLS-2; entretanto, na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos que avaliassem a produção lacrimal frente ao uso de diferentes colírios anestésicos.

MOORE et al. (1987) e CULLEN et al. (2005) não encontraram diferenças significativas entre os valores de TLS-1 e TLS-2 para os olhos esquerdo e direito de cães. Contrariando esses autores, este estudo revelou diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito quanto aos valores de TLS-1. Não foi possível identificar a causa dessa discrepância entre os olhos. Em contrapartida, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de TLS-2 obtidos para os olhos esquerdo e direito.

A quantificação das células caliciformes conjuntivais fornece uma mensuração indireta da produção de mucina, considerada um sensível indicador da hígidez da superfície ocular (MOORE et al., 1987; KJNOSHITA et al., 1983). CULLEN et al. (2005) encontraram uma DCC média de 28 células caliciformes para 50 epiteliais para cães hígdos, valor muito superior ao observado para os cães Shi tzu avaliados no presente estudo. Com o objetivo de demonstrar a heterogeneidade da distribuição de células caliciformes na conjuntiva canina, MOORE et al. (1987) obtiveram um índice médio de $0,29 \pm 0,043$ no fórnice nasal ventral de cães hígdos da raça Beagle, valores que se aproximam dos encontrados para os cães Shih Tzu estudados. Contudo, MOORE et al. (1987) relataram diferenças significativas entre o ICC no fórnice conjuntival nasal ventral para os dois sexos, com valores médios de $0,26 \pm 0,027$ para machos e de $0,33 \pm 0,015$ para fêmeas. No presente estudo, especificamente para as fêmeas, foram obtidos ICC de $0,28 \pm 0,07$ para o olho esquerdo e de $0,27 \pm 0,08$ para o olho direito. Esses valores são significativamente inferiores aos descritos por MOORE et al. (1987) para cadelas hígdas da raça Beagle.

Embora pouco se saiba sobre os fatores que influenciam a densidade e distribuição das células caliciformes conjuntivais, o grau de hidratação conjuntival foi apontado por MOORE et al. (1987) como um fator exógeno relevante. Corroborando com essa observação, há outros estudos que demonstraram uma relação direta entre a ceratoconjuntivite seca e a diminuição da densidade de células caliciformes (RALPH, 1975; MOORE et al., 2001). Apesar de a produção lacrimal observada nos cães Shih Tzu estudados estar dentro dos padrões de nor-

malidade, supõe-se que a evaporação do filme lacrimal que recobre a superfície ocular ocorra mais rapidamente nesses cães, devido à exoftalmia e lagofthalmia características da raça. Tal condição poderia levar à deficiência de hidratação conjuntival e promover diminuição do número de células caliciformes. Em contrapartida, a deficiência de células caliciformes leva à redução da produção da camada mucosa do filme lacrimal pré-ocular, a qual, segundo DAVISON & KUONEN (2004), age como interface entre o epitélio corneano hidrofóbico e o fluido lacrimal aquoso. Portanto, uma produção deficiente de mucina pré-ocular poderia aumentar ainda mais a evaporação lacrimal, agravar a desidratação da superfície ocular e predispor os cães Shih Tzu ao desenvolvimento de afecções córneo-conjuntivais.

No presente trabalho, a influência dos valores dos testes lacrimais Schirmer sobre os valores de ICC não foi estatisticamente significativa, constatação que corrobora com KIM et al. (1992), que não observaram uma correlação significativa entre valores de TLS e DCC em humanos hígidos. Contudo, tal associação foi identificada por RALPH (1975), MOORE et al. (1987) e MOORE et al. (2001), que apontaram o grau de hidratação conjuntival como um fator contribuidor para a variação da DCC.

CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, o filme de lágrima nos cães da raça Shih Tzu não sofre alteração na quantidade conforme demonstraram os testes de TLS 1 e 2, porém, há variação qualitativa devido à densidade reduzida das células caliciformes.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida à mestrandia; e ao Prof. Luiz Fernando Froes Fleury pelo auxílio na leitura das lâminas.

REFERÊNCIAS

AMARAL, A.V.C. **Estudo clínico e histológico das pálpebras, conjuntiva e córnea hígidas submetidas a tratamento local com soluções anestésicas em coelhos. 2005.** 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia. disponível em http://www.ufg.br/this2/uploads/files/66/Dissertacao2005_Andreia_Vitor.pdf

BEECH, J.; ZAPPALA, R. A.; SMITH, G.; LINDBORG, S. Schirmer tear test results in normal horses and ponies: effect of age, season, environment, sex, time of day and placement of trips. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.6, n. 3, p.251-254, 2003.

BERGER, S.L.; KING, V.L. The Fluctuation of Tear Production in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Ithaca, v.34, p.79-83, 1998.

BRANDÃO, C.V.S; RANZANI; J.J.T.; MARINHO; L.F.L.P.; RODRIGUES, G. N.; CREMONINI, D.N.; PEIXOTO, T.P.; LIMA, L.S.A.; CHIURCIU, J. L. V. **Análise retrospectiva de 45 casos de proptose em cães (1998-2003).** In: 8a Mostra Científica. 2004. Botucatu-SP. [on line]. Botucatu: FMVZ - UNESP, 2004. Disponível em: www.fmvz.unesp.br/cursos/8aMostra/anais/Cl_nica_e_Cirurgia_Animal/CCA04.htm. Acesso em: 03 mai.2006.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA. **Shih-tzu.** [on line]. Disponível em: www.cbck.org. Acesso em: 16 out. 2007.

CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; MACCARVILLE, C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, N.8, v.4, p.215-224, 2005.

CULLEN, C.L.; NJAA, B.L.; GRAHN, B.H. Ulcerative keratitis associated with qualitative tear film abnormalities in cats. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, n.2, p.197-204, 1999.

DAVIDSON, H. J., KUONEN, V. J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.7, n.2, p.71-77, 2004.

GELATT, K.N.; PEIFFER, R.L.; ERICKSON, J.L.; GUM, G.G. Evaluation of tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.166, p.368-370, 1975.

HAMOR, R.E.; ROBERTS, S.M.; SEVERIN, G.A.; CHAVKIN, M..J. Evaluation of results for Schirmer tear tests conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, n.61, p.1422-1425, 2000.

HIRSH, S.G.; KASWAN, R.L. A comparative study of Schirmer tear test strips in dogs. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, Oxford, v.5, p.215-217, 1995.

KIM, S.D.; KIM, J.K.; HAN, H.K. Normal Conjunctival Goblet Cell Density in Korean Measured by Impression Cytology. **Journal of Korean Ophthalmology Society**, v.33, n.5, p.427-435, 1992.

KINOSHITA, S.; KIROPES, T.C.; FRIEND, J.; THOFT, R.A. Goblet cell density in ocular surface disease: A better indicator than tear mucin. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, n.101, p.1284, 1983.

- LAMBERTS, D.W.; FOSTER, C.S.; PERRY, H.D. Schirmer test after topical anesthesia and the tear meniscus height in normal eyes. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.97, n.6, p.1082-1085, 1979.
- LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: Mc Graw Hill, 1968. 258 p.
- MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, cap.16, p.583-607.
- MOORE, C.P.; MCHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. Effect of Cyclosporine on conjunctival mucin in a canine Keratoconjunctivitis sicca model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.42, p.653-659, 2001.
- MOORE, C.P.; WILSMAN, N.J.; NORDHEIM, E.V.; MAJORS, L.J.; COLLIER, L.L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.28, p.1925-1932, 1987.
- OTERO, P.E. **Dor: Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. 1ª ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2005. 293 p.
- RALPH, R.A. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. **Investigative Ophthalmology**, St. Louis, v.14, p.299, 1975.
- SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.1, p.7-11, 2001.
- SAITO, A.; KOTANI, T. Tear production in dogs with epiphora and corneal epitheliopathy. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.2, p.173-178, 1999.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221 p.
- SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3 ed. São Paulo: Editora Roca, 2005. 686 p.
- TOLAR, E.L.; HENDRIX, D.V.; ROHRBACH, B.W.; PLUMMER C.E.; BROOKS, D.E.; GELATT, K.N. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993-2003). **Journal American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.228, n.1, p.80-85, 2006.
- TROST, K.; SKALICKY, M.; NELL, B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.3, n.10, p.143-146, 2007.
- WILLIAMS, D.L. Analysis of tear uptake by the Shirmer tear test strip in the canine eye. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.8, n.5, p. 325-330, 2005.
- WOERDT, A.V.D. Adnexal surgery in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.7, n.5, p.284-290; 2004.
- WYMAN, M.; GILGER, B.; MUELLER, P. Clinical evaluation of a new Schirmer tear test in the dog. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, Oxford, v.5, p.211-214, 2005.

Protocolado em: 09 nov. 2009 Aceito em: 13 abr. 2011.