



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL EM OVINOS: ANÁLISE EM
ESCALAS, MÉTODO STEPANIZER® E CORRELAÇÃO COM ACHADOS
HISTOLÓGICOS DA CONJUNTIVA**

ALINE STEPHANIE SILVA CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS
BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL EM OVINOS: ANÁLISE EM
ESCALAS, MÉTODO STEPANIZER® E CORRELAÇÃO COM ACHADOS
HISTOLÓGICOS DA CONJUNTIVA**

ALUNA: ALINE STEPHANIE SILVA CARVALHO

ORIENTADORA: PROF^a DR^a PAULA DINIZ GALERA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: TESE/2025

BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL EM OVINOS: ANÁLISE EM
ESCALAS, MÉTODO STEPANIZER® E CORRELAÇÃO COM ACHADOS
HISTOLÓGICOS DA CONJUNTIVA**

ALINE STEPHANIE SILVA CARVALHO

**Dissertação de mestrado submetida ao
programa de pós-graduação em Ciências
Animais, como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Animais**

APROVADA POR:

**PAULA DINIZ GALERA, Ma. Dra. (FAV/Universidade de Brasília).
(ORIENTADORA)**

**ROBERTA MARTINS CRIVELARO THIESEN, Ma. Dra. (Universidade Federal do
Pará)**

TIAGO BARBALHO LIMA, Me. Dr. (Universidade Federal do Maranhão)

BRASÍLIA/DF, 27 DE NOVEMBRO DE 2025.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CARVALHO, A. S. S. **Teste de cristalização do filme lacrimal em ovinos: análise em escalas, método STEPanizer® e correlação com achados histológicos da conjuntiva.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2025, 47 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SS828tt Silva Carvalho, Aline Stephanie

TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL EM OVINOS: ANÁLISE EM ESCALAS, MÉTODO STEPANIZER® E CORRELAÇÃO COM

ACHADOS HISTOLÓGICOS DA CONJUNTIVA / Aline Stephanie Silva Carvalho; orientador Paula Diniz Galera. Brasília, 2025.

48 p.

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

1. lágrima. 2. ovinos. 3. células caliciformes. 4. teste de cristalização.
5. stepanizer. I. Diniz Galera, Paula, orient. II. Título.

EPÍGRAFE

“Não sou livre enquanto outra mulher for prisioneira, mesmo que as correntes dela sejam diferentes das minhas.” — Audre Lorde

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à memória da minha pequena companheira, a cadela com quem cresci, uma pinscher de presença marcante e alma imensa. Sinto sua falta todos os dias. Foi por ela que dei meus primeiros passos na medicina veterinária, guiada por um amor silencioso, profundo e transformador. Ao longo da caminhada, encontrei novas paixões, descobri forças que não sabia ter e abracei com ternura tudo o que esse caminho me trouxe: desafios, encantamentos e propósito.

Dedico, com todo o meu coração, aos meus pais: meus maiores exemplos de coragem e amor. Vocês batalharam por cada oportunidade que tive, sustentaram meus sonhos com sacrifício e esperança, e nunca soltaram minha mão. Este trabalho é fruto do esforço de vocês também, e carrega em cada linha a gratidão que palavras jamais conseguirão medir.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minha base e meu abrigo, que lutaram incansavelmente para me dar a oportunidade de estudar e seguir meus sonhos. Cada conquista minha carrega o peso e a beleza dos sacrifícios que vocês fizeram em silêncio. Vocês enfrentaram jornadas difíceis, renunciaram a tanto, e ainda assim nunca deixaram de sorrir para me encorajar. O amor de vocês foi bússola e sustento nos momentos de dúvida, e o exemplo que sempre me deram foi a mais poderosa lição de perseverança e dignidade. Tudo o que sou e tudo o que conquistei tem raízes no chão firme que vocês prepararam para mim. Obrigada por nunca soltarem minha mão, mesmo quando meus passos eram inseguros. Esse trabalho é, também, de vocês.

Aos meus animais de estimação, Yoshi, Pingo, Catusha, Matilda, Faísca, Haroldo e Teodoro, que com seus olhares sinceros, suas presenças afetuosas e personalidades únicas despertaram em mim um amor que se transformou em vocação. Sem vocês, eu talvez jamais tivesse descoberto o propósito que hoje me move.

Ao João, meu amor, que caminhou ao meu lado com firmeza mesmo quando tudo em mim vacilava. Você acreditou quando nem eu acreditava mais. Obrigada por cada palavra de encorajamento, por cada gesto de carinho e por me amar com tanta inteireza, especialmente nos dias mais difíceis. Sua presença foi alento e força.

À Inês e ao Rildo, meus sogros, que se tornaram uma segunda família para mim. Obrigada pelo acolhimento generoso, pelos conselhos sábios e por me oferecerem sempre um lar cheio de afeto e apoio ao longo dessa jornada.

À Brendha, parceira de experimento, de mestrado e de vida. Compartilhamos desafios, aprendizados, risadas e muitos momentos de cansaço. Sem você, essa caminhada teria sido mil vezes mais difícil. Ao Thiago, um irmão com quem eu tenho o prazer de compartilhar a vida: obrigada por cada gesto de carinho, escuta e apoio. E ao Pedro, que foi companheiro, amigo e sempre presente. Levarei vocês comigo por toda a vida.

Aos tantos amigos que passaram por esta caminhada, tantos que seria impossível citar todos aqui, deixo meu abraço mais sincero. Cada um teve um papel especial nesse percurso, e sou profundamente grata por cada memória compartilhada.

À equipe do Centro de Manejo de Ovinos (CMO) da Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília, meu sincero agradecimento, especialmente ao Ramón, que me auxiliou com paciência e leveza no manejo dos animais, sempre com cuidado e respeito.

Aos professores Ivo Pivato e Sérgio Cabral, obrigada por abrirem as portas da Fazenda Água Limpa e por todo apoio técnico e institucional que tornaram esse trabalho possível.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário (LDPV) da Universidade de Brasília, pelas incontáveis horas de trabalho, pelos ensinamentos e pela colaboração, especialmente ao professor Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, ao Juliano, Lucas e Thais. Serei eternamente grata.

Aos meus mestres na oftalmologia veterinária, que plantaram em mim o encantamento por essa área, meu respeito e reconhecimento. E especialmente à professora Paula Galera, minha orientadora, professora e mentora, obrigada por tudo. Você me guiou com sabedoria, acreditou em mim quando nem eu acreditava, me deu liberdade, direção e coragem. Suas broncas foram lições, e seu cuidado, um abraço. Você foi minha mãe acadêmica, e isso jamais será esquecido.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa construção: meu mais sincero e profundo agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 10 |
| LISTA DE TABELAS..... | 11 |
| LISTA DE ABREVIACÕES | 12 |
| CAPÍTULO I..... | 13 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1.1. OBJETIVO..... | 15 |
| 1.2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| FILME LACRIMAL PR-CORNEANO E SUA DINÂMICA | 15 |
| TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL (TCFL) | 17 |
| CONJUNTIVA..... | 18 |
| STEPANIZER®..... | 19 |
| CAPÍTULO II..... | 20 |
| 2.1.1. RESUMO..... | 21 |
| 2.1.2. ABSTRACT | 22 |
| 2.2. INTRODUÇÃO | 23 |
| 2.3. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 2.5. CONCLUSÕES..... | 39 |
| 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |

LISTA DE FIGURAS
CAPÍTULO II

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Janela de contagem (“ <i>Counting</i> ”) do software STEPanizer® | 25 |
| Figura 2. Distribuição das classificações nas escalas visuais | 28 |
| Figura 3. Regressão linear da associação STEPanizer e escalas | 30 |
| Figura 4. <i>Heatmap</i> das correlações entre as escalas, STEPanizer® e idade | 30 |
| Figura 5. TCFL de ovinos classificados de acordo com as escalas..... | 32 |
| Figura 6. TCFL de ovino classificado como Grau I e Tipo IV | 34 |
| Figura 7. Cortes histológicos conjuntivais classificados de acordo com o infiltrado inflamatório em HE | 35 |
| Figura 8. Cortes histológicos conjuntivais infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico em HE..... | 36 |
| Figura 9. Comparação entre TCFL e corte histológico conjuntival de um mesmo ovino em HE..... | 37 |
| Figura 10. Corte histológico de CCs em PAS | 38 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | Página |
|--|---------------|
| Tabela 1. Comparação da frequência dos graus de TCFL entre escalas Masmali e Rolando e sua correlação | 28 |
| Tabela 2. Correlação entre escalas visuais com a mediana de pontos do STEPanizer®.... | 29 |
| Tabela 3. Correlação entre escalas de TCFL e CCs e infiltrado inflamatório | 35 |

LISTA DE ABREVIACÕES

CCs – Culas Caliciformes

CCI – Ceratoconjuntivite Infecciosa

FL – Filme Lacrimal

FLPC – Filme Lacrimal Pr-Corneano

IC – Intervalo de Confiança

OD – Olho direito

OE – Olho esquerdo

SO – Superfície Ocular

TCFL – Teste de Cristalização do Filme Lacrimal

TBUT – “*Tear Break-Up Time*”, ou Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

TLS – Teste da Lágrima de Schirmer

VMO-1 – “*Vitelline Membrane Outer Layer Protein 1*”, ou Proteína 1 da Camada Externa da Membrana Vitelnica

CAPÍTULO I

1.1.INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos pilares da economia brasileira, como constatado pelo produto interno bruto (PIB) (MONTEIRO; BRISOLA; VIEIRA FILHO, 2021). A cadeia produtiva de pequenos ruminantes brasileira sofreu diversos desafios de desempenho econômico, diante do fato de que grande parte dos produtores são de pequeno porte e/ou da agropecuária familiar, especialmente nas regiões do Nordeste brasileiro. Apesar disso, a partir de 2012 conseguiu obter crescimento em escalabilidade de produção, com produtividade e sustentabilidade (GASQUES et al., 2012; SOUSA FILHO; BONFIM, 2013; BRASIL, 2017; FAO, 2018; JANK; ZERBINI; CLEAVER, 2018; MONTEIRO; BRISOLA; VIEIRA FILHO, 2021). Em 2019 a Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estimou que o rebanho brasileiro de ovinos totalizava cerca de 19,7 milhões de animais, com previsão de crescimento para 21 milhões em 2023 e alcançando 21,8 milhões em 2024, com grande prevalência na região Nordeste do país, seguida da região Sul e Centro-Oeste (IBGE, 2025). Atribui-se à região Centro-Oeste 5% do rebanho ovino brasileiro, com cerca de um milhão de animais (MAGALHÃES et al., 2020), sendo uma espécie cuja importância econômica vem merecendo destaque.

O bem-estar animal têm ganho destaque na Medicina Veterinária, tanto por questões éticas quanto por questões zootécnicas e de produtividade dos rebanhos (HUBER, 2024). Apesar da discussão de que ruminantes não necessitam de uma excelente visão como outras espécies para exercer seu comportamento natural, é evidente que afecções oculares repercutem negativamente em seu bem-estar e saúde (WILLIAMS, 2010). Animais com baixa visão e dor estão menos predispostos a executar atividades naturais para a espécie, como alimentação e hidratação. A presença de dor, desconforto, estresse e dificuldade de alimentação não devem estar presentes quando discutimos o bem-estar animal, de acordo com as “Cinco Liberdades” definidas pelo Comitê de Bem-Estar Animal de Animais de Produção, ou *Farm Animal Welfare Committee – FAWC*, ainda que o bem-estar não deva se limitar à capacidade de executar atividades naturais, já que isso não reflete em sua totalidade a saúde e funções metabólicas de um animal saudável (FAW CONCIL, 2009; WILLIAMS, 2010; MCCAUSLAND, 2014; HUBER, 2024).

A disfunção dos tecidos que compõem o aparato visual pode levar a consequências econômicas notáveis. Desde disfunções do filme lacrimal pré-corneano (FLPC),

da conjuntiva e de suas células caliciformes que protegem a superfície ocular (SO) de agentes infecciosos e físicos, até os efeitos do clima podem afetar toda a sua dinâmica (GIPSON, 2016). A ceratoconjuntivite infecciosa (CCI), por exemplo, causada comumente por *Mycoplasma conjunctivae* e *Moraxella ovis*, é amplamente relatada em ovinos e causa diversos impactos econômicos, como perda de peso, já que a dificuldade visual e fotofobia tornam a alimentação dificultosa (NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008; SAĞLAM et al., 2018; WILLIAMS et al., 2019; GULAYDIN et al., 2024). A perda de peso e cegueira parcial ou completa pode levar à redução da habilidade materna, menor conversão alimentar, custos com medicações e investimento de tempo e manejo para a conclusão do tratamento (AITKEN, 2007; CHAVES; LIMA; AMARAL, 2008; WILLIAMS et al., 2019; GULAYDIN et al., 2024). Dessa forma, fica clara a importância do entendimento da dinâmica do FLPC de animais de produção e sua associação com o bem-estar e sua conversão em altas taxas de produtividade, essencial para o equilíbrio da cadeia de pequenos ruminantes no Brasil.

1.1.1. OBJETIVO

Objetivou-se descrever o Teste de Cristalização do Filme Lacrimal (TCFL) ou “*Tear Ferning Test*” em ovinos, relacionando-o com as condições de temperatura e umidade do Centro-Oeste brasileiro, a idade dos animais, e comparando as escalas Rolando e Masmali em associação com a análise estereológica digital do software *STEPanizer*®. Além disso, objetivou-se correlacionar o TCFL com as características histológicas da conjuntiva ocular como avaliação do infiltrado celular e a contagem de células caliciformes.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA FILME LACRIMAL PRÉ-CORNEANO E SUA DINÂMICA

A superfície ocular (SO) é composta por diversas estruturas que, em perfeito equilíbrio, desempenham a manutenção da saúde da córnea, pálpebras, conjuntiva, terceira pálpebra e sistema lacrimal (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021a). O filme lacrimal pré-corneano (FLPC), componente essencial da SO, é produzido pelas glândulas lacrimais principais e acessórias, células caliciformes da conjuntiva e pelas glândulas de Meibômio, estas localizadas no tarso palpebral inferior e superior (HENDRIX; THOMASY; GUM, 2021). A qualidade do FLPC repercute na saúde das estruturas que compõem o olho, possibilitando um meio refrativo eficaz e conforto para o animal.

O FLPC é didaticamente dividido em três camadas: lipídica, aquosa e mucosa, sendo as duas últimas entendidas como uma única camada por muitos autores por sua intensa

integração, denominada mucoaquosa (WILLCOX et al., 2017; BAUDOUIN et al., 2019; HENDRIX; THOMASY; GUM, 2021; GOLDEN et al., 2025). A camada mais externa, a lipídica, fica em contato direto com o ar e evita a evaporação excessiva, reduz a tensão superficial e proporciona uma maior uniformidade do FL (MILLER, 1969; CWIKLIK, 2016; GOLDEN et al., 2025). Já a camada mucoaquosa, responsável pela lubrificação, nutrição e proteção da SO, é produzida pelas glândulas lacrimais principais, glândula da terceira pálpebra e pelas glândulas conjuntivais, em especial as células calciformes, que secretam mucinas (HENDRIX; THOMASY; GUM, 2021; MANGWANI-MORDANI et al., 2024). A instabilidade do FLPC, caracterizada pela perda da homeostase, pode levar à síndrome do olho seco – um termo amplo que engloba diversas disfunções da SO, gerando uma cascata de alterações e ocasionando o ciclo inflamatório vicioso da síndrome (RHEE; MAH, 2017; ALMUTLEB et al., 2023; MANGWANI-MORDANI et al., 2024).

Dentre os testes utilizados para avaliar a SO e o FLPC, são de maior importância o Teste da Lágrima de Schirmer (TLS) para avaliação quantitativa da lágrima. A avaliação qualitativa dispões de diversos mecanismos de avaliação, como o Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal ou “*Tear Break Up Time*” (TBUT), corantes de rosa bengala e lissamina verde, meibometria, meibografia, interferometria, citologia e biópsia de células calciformes da conjuntiva, e Teste de Cristalização do Filme Lacrimal (TCFL) (MANGWANI-MORDANI et al., 2024).

O TCFL é um teste rápido, de baixo custo e de alta sensibilidade, especificidade e repetibilidade em humanos, sendo seu uso predominante para diagnóstico de olho seco ocasionado pela Síndrome de Sjögren e avaliação do filme lacrimal (FL) em pacientes que fazem o uso de lentes de contato (FELBERG et al., 2008; MASMALI et al., 2015b). O teste já foi descrito em cães (ORÍÁ et al., 2018), gatos (VELOSO et al., 2020), equinos (SILVA et al., 2016), coelhos (LANTYER-ARAUJO et al., 2020), macacos-prego (RAPOSO et al., 2018), além de outras espécies como de pássaros e répteis (ORÍÁ et al., 2020). A adição de eletrólitos no FL de ovinos já foi descrita, sendo observada uma melhora nos padrões de cristalização, especialmente após a adição de soluções de cloreto de cálcio, cloreto de magnésio hexahidratado e de di-hidrogenofosfato de sódio, além da observação de pouca melhora nos padrões após a adição de solução de cloreto de sódio. (FAGEHI et al., 2021), entretanto a graduação nas escalas Rolando (1984) e Masmali (2014) associadas ao STEPanizer® e correlação com a análise histológica da conjuntiva é descrita de forma pioneira para a espécie neste estudo

TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL (TCFL)

Observado em 1946 pelo médico grego Georges Papanicolaou, o padrão de cristalização arboriforme foi inicialmente descrito no muco cervical humano, quando depositado sobre uma lâmina microscópica e deixado para secar em temperatura ambiente, sendo tais padrões de cristais posteriormente observados em vários outros fluidos corporais, como a lágrima (PAPANICOLAOU, 1946; GOLDING; BRENNAN, 1989). Assim, o Teste de Cristalização do Filme Lacrimal (TCFL) é uma técnica de baixo custo, com alta sensibilidade e especificidade e rapidamente executada por profissionais treinados (MARAGOU et al., 1996; PEARCE; TOMLINSON, 2000; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014; MASMALI et al., 2015b), sendo utilizada na medicina humana para diagnóstico de desordens do FL, como a síndrome do olho seco, e proposta como fator preditivo para a tolerância e sucesso do uso de lentes de contato (RAVAZZONI et al., 1998; EVANS; NORTH; PURSLOW, 2009).

Os métodos de coleta de lágrima para a realização do TCFL variam entre si, desde a aspiração com pipetas, fitas de TLS, espátulas até tubos capilares, sendo este preferível por sua melhor repetibilidade e menor variação na quantidade de lágrima coletada (NORN, 1988; GOLDING; BRENNAN, 1989; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014).

O TCFL é avaliado de acordo com a densidade da cristalização gerada. De acordo com a composição do FL e condições ambientais como temperatura e umidade, a cristalização pode se apresentar de diversas formas e em quantidades variadas (GOLDING; BRENNAN, 1989; HORWATH et al., 2001; MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014; TANG et al., 2020). A classificação é feita por meio de escalas, desenvolvidas por Rolando e Masmali, que graduam a densidade e as características das arborizações, de forma a diminuir o grau de subjetividade da classificação (ROLANDO, 1984; MASMALI et al., 2015a).

A escala proposta por Rolando (1984), para avaliação do padrão de cristalização da lágrima em seres humanos é classificada em tipos que variam de I a IV, sendo os tipos I e II indicativos de olhos dentro do padrão de normalidade, enquanto III e IV indicam desordens do FLPC (ROLANDO, 1984). Entretanto, a escala apresenta limitações como sobreposição de diferentes tipos, como entre o I e II (MASMALI et al., 2015a), aumentando o grau de subjetividade e dificultando a avaliação.

A escala Masmali, desenvolvida inicialmente para humanos, foi idealizada com sete graus de padrões de cristalização, com boa aceitabilidade entre os avaliadores do estudo. Entretanto, a análise estatística permitiu que os sete graus fossem combinados gerando uma escala em 5 graus, possibilitando fácil distinção entre todos os graus, maior reprodutibilidade e menor variação entre avaliadores comparativamente à escala de Rolando (MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014).

Os graus da proposta escala Masmali são classificados e definidos respectivamente como: grau 0, cristais com arborização densa e com intensa ramificação, que ocupam todo o campo; grau 1, cristais densos e ramificados, com poucos espaços livres; grau 2, padrão de cristalização intermediária, com ramificações e maior espaço entre os cristais; grau 3, cristais esparsos e com poucas ou nenhuma ramificação; grau 4, com presença de grumos e muco e a ausência de cristais (MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014).

CONJUNTIVA

A conjuntiva ocular engloba a membrana mucosa das pálpebras, da porção exposta da esclera, denominada conjuntiva bulbar, e da porção anterior e posterior da membrana nictitante ou da terceira pálpebra (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021b). Possui epitélio escamoso não-queratinizado que varia de simples a estratificado, este com maior intensidade conforme se aproxima das margens palpebrais, e com lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo (PUGH et al., 2020; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021b; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023; BANNIER-HÉLAOUËT et al., 2024). O encontro das porções bulbar e palpebral é denominado fórnice conjuntival, variando histologicamente entre estratificado cuboide a pseudoestratificado colunar (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021b).

As células caliciformes da conjuntiva (CCs), de morfologia arredondada e intercaladas com o epitélio conjuntival e se estendendo durante toda a sua espessura (GIPSON, 2016), são especializadas e responsáveis pela secreção das mucinas do FL, que ficam em grânulos no interior das CCs. Estas mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular e altamente hidrofílicas, com função de lubrificação, redução da fricção durante o ato de piscar, além de atuarem na defesa imune local, mantendo a saúde da SO (SEBBAG et al., 2016; HORI, 2018; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023; LIU et al., 2024). Apesar disso, a compreensão de

toda a dinâmica das mucinas no FL ainda não é totalmente compreendida pela comunidade científica.

A morfologia das CCs depende do seu estágio de secreção, sendo que células com grande quantidade de grânulos de mucina e núcleo pequeno são classificadas como maduras, e as com núcleo maior são imaturas (LIU et al., 2024). As CCs podem estar dispostas individualmente ou em “*clusters*” (KNOP et al., 2012), e tendem a se concentrar em regiões como o fórnice conjuntival onde há acúmulo de debris (LIU et al., 2024). A densidade destas células varia nas diferentes porções da conjuntiva de forma espécie-específica (GIPSON, 2016), conforme descrito no homem (KESSING, 1968) e cães (MOORE et al., 1987), ambos apresentando maior densidade de CCs na conjuntiva nasal, além de gatos (SEBBAG et al., 2016) e equinos (SILVA et al., 2016), também descritos. Entretanto, ainda não foi relatada em ovinos.

STEPANIZER®

O software STEPanizer® é uma ferramenta que permite a aplicação de princípios estereológicos em imagens microscópicas e macroscópicas, agregando rigor quantitativo (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). A estereologia se baseia na análise quantitativa tridimensional (3D) de imagens bidimensionais (2D), com o auxílio de metodologia matemática e propriedades geométricas, reduzindo a subjetividade e imparcialidade inerentes da avaliação visual, auxiliando nas estimativas de volumes, superfícies, entre outros, com boa reprodutibilidade e confiabilidade, além de permitir mensurações mais padronizadas e comparáveis entre grupos experimentais (ELIAS; HENNIG; SCHWARTZ, 1971; TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011; WEST, 2012; MORAES et al., 2016).

CAPÍTULO II

2.1.1. RESUMO

TESTE DE CRISTALIZAÇÃO DO FILME LACRIMAL EM OVINOS: ANÁLISE EM ESCALAS, MÉTODO STEPANIZER® E CORRELAÇÃO COM ACHADOS HISTOLÓGICOS DA CONJUNTIVA

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) é essencial para a homeostase ocular e a sua avaliação em animais de produção, como os ovinos, ainda é pouco explorada. O teste de cristalização do filme lacrimal (TCFL), ou *tear ferning test*, é um método simples, não invasivo, que reflete as propriedades físico-químicas da lágrima. Este estudo teve como objetivo aplicar o TCFL em ovinos hígidos, utilizando as escalas de Rolando (1984) e Masmali (2014), análise estereológica com o software STEPanizer® e investigar sua associação com parâmetros histológicos da conjuntiva palpebral. Foram avaliados e incluídos 134 olhos de 67 ovinos adultos submetidos à coleta de lágrima para TCFL e, posteriormente, análise da conjuntiva palpebral inferior nasal. A lágrima foi coletada do fórnice palpebral inferior e avaliada conforme as escalas mencionadas. A análise estereológica quantificou pontos cristalinos usando imagens padronizadas e o software STEPanizer®. Coletou-se um fragmento da conjuntiva palpebral para avaliação do grau de infiltrado inflamatório e a contagem de células calciformes (CCs). Os dados foram analisados por estatística descritiva, testes de correlação de Spearman e regressão linear simples. Os resultados revelaram forte correlação positiva entre as escalas de Rolando e Masmali (OD: $r = 0,922$; OE: $r = 0,886$; $p < 0,0001$), indicando consistência entre os métodos de avaliação do TCFL. Também foi observada correlação negativa significativa entre o número de pontos cristalinos no STEPanizer® e o grau de cristalização nas duas escalas, com modelos de regressão bem ajustados. No entanto, não houve correlação significativa entre os padrões de cristalização e os achados histológicos. A correlação de Spearman foi fraca e negativa entre os graus de cristalização e o número de CCs (Rolando: $r = -0,176$; Masmali: $r = -0,059$), assim como entre o TCFL e o infiltrado inflamatório (Rolando: $r = -0,024$; Masmali: $r = -0,058$). O infiltrado inflamatório predominante foi do tipo linfocítico leve (83,96% das amostras). O presente estudo apresenta uma abordagem inédita para a caracterização do FLPC em ovinos, demonstrando a viabilidade do uso do TCFL em associação à análise estereológica digital e oferecendo subsídios para futuras pesquisas com foco em bem-estar animal e oftalmologia veterinária.

Palavras-chave: lágrima, ovinos, teste de cristalização, células calciformes, infiltrado inflamatório, filme lacrimal, stepanizer.

2.1.2. ABSTRACT

TEAR FERNING TEST IN SHEEP: SCALE-BASED ANALYSIS, STEPANIZER® METHOD, AND CORRELATION WITH CONJUNCTIVAL HISTOLOGICAL FINDINGS

The precorneal tear film (PTF) plays a fundamental role in ocular surface homeostasis, yet its evaluation in production animals, such as sheep, remains poorly explored. The tear ferning test (TFT) is a simple, non-invasive method that reflects the physicochemical properties of the tear film. This study aimed to apply the TFT in clinically healthy sheep and investigate its association with histological parameters of the conjunctiva using Rolando's (1984) and Masmali's (2014) grading scales, stereological analysis via STEPanizer® software, and histological characterization with hematoxylin–eosin (HE) and periodic acid–Schiff (PAS) staining. One hundred thirty-four eyes from 67 adult sheep were evaluated and included. Tear samples were collected and classified by two evaluators using the Rolando and Masmali scales. Stereological analysis was performed on standardized images to quantify crystalline points using STEPanizer®. Histological analysis included grading of inflammatory cell infiltration and counting of goblet cells (GCs). Data were analyzed using descriptive statistics, Spearman's correlation, and simple linear regression. A strong positive correlation was found between the Rolando and Masmali scales (OD: $r = 0.922$; OS: $r = 0.886$; $p < 0.0001$), indicating consistency between grading methods. A significant negative correlation was observed between the number of crystalline points and the tear ferning grades, with well-fitted regression models. However, no significant correlations were found between ferning patterns and histological parameters. Spearman's correlation revealed weak negative associations between tear ferning grades and GC count (Rolando: $r = -0.176$; Masmali: $r = -0.059$), as well as with inflammatory infiltrate (Rolando: $r = -0.024$; Masmali: $r = -0.058$). The predominant inflammatory pattern was mild lymphocytic infiltration, present in 83.96% of samples. The lack of correlation suggests that, in sheep, tear ferning patterns may not directly reflect histological alterations in the conjunctiva detectable by routine HE and PAS staining, potentially being more influenced by physicochemical properties of the tear film and environmental factors. This study presents a novel approach to PTF characterization in sheep, demonstrating the feasibility of combining TFT with digital stereological analysis, and offers a foundation for future research in veterinary ophthalmology and animal welfare.

Keywords: tear film, sheep, tear ferning test, goblet cells, conjunctival inflammation, stepanizer, ocular surface.

2.2. INTRODUÇÃO

O TCFL e suas escalas de classificação são amplamente validados em humanos, e vêm sendo explorados nas mais diversas espécies animais (MASMALI et al., 2015a). Entretanto, sua aplicação em ruminantes, especialmente quando combinada com a classificação com as escalas Rolando (1984) e Masmali (2014) em associação com a análise estereológica e histológica permanece inexplorada, sendo esta lacuna na literatura científica ainda mais intensa quando tratamos de pequenos ruminantes.

A cristalização arboriforme, também classificada como cristalização dendrítica, se assemelha à folha da samambaia (*Pteridium aquilinum*) ou “fern”, do inglês, mas seu padrão varia de acordo com a composição da lágrima (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014). Para análise do padrão de cristalização, uma gota de lágrima deve ser depositada sobre uma lâmina microscópica. O espalhamento e a cristalização dependem da composição físico-química do FL: a mucina contribui para a estabilidade e organização dos cristais, enquanto alterações na velocidade da evaporação são influenciadas pelos lipídios, podendo afetar a organização do padrão de cristalização (BUCKLEY; WALKER, 1951; GOLDING; BRENNAN, 1989). E com a evaporação rápida, a cristalização arboriforme tende a se formar (GOLDING; BRENNAN, 1989). Lágrimas híidas tendem a apresentar um padrão denso de cristais, enquanto lágrimas com algum grau de disfunção do FL apresentam menor densidade (MASMALI; PURSLOW; MURPHY, 2014). Portanto, um FL com maiores concentrações de muco tende a gerar mais cristais.

Nesse contexto, as CCs desempenham um papel crucial, sendo responsáveis pela secreção de mucinas formadoras de gel, que compõem a camada mucosa do FL, sendo fundamental para a adequada adesão da fase aquosa da lágrima e estabilidade do FLPC (GIPSON, 2004). Uma menor densidade de CCs comprovadamente compromete a estabilidade do FL, reduz sua estabilidade e favorece a evaporação da lágrima, levando a quadros inflamatórios subclínicos que agravam a saúde ocular da SO, resultando em padrões de cristalização menos densos e organizados (BARABINO; CHEN; DANA, 2004; CHOI et al., 2009; GIPSON, 2016; RHEE; MAH, 2017; ALMUTLEB et al., 2023).

Diante da escassez de dados acerca da qualidade do FL em ovinos e da relevância deste parâmetro para o bem-estar animal, objetiva-se analisar e classificar o TCFL de ovinos, associado à análise estereológica e histológica das CCs.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os fatores de exclusão para o experimento foram patologias oftálmicas, patologias clínicas sistêmicas e alterações de umidade e temperatura que afetaram as amostras durante a coleta. Dessa forma, um total de 134 olhos (67 animais) foram incluídos nas análises. Os animais eram mestiços das raças Morada Nova, Santa Inês, Dorper e White Dorper, provenientes da Fazenda Água Limpa, da Universidade de Brasília, Distrito Federal, residindo em currais cobertos, no Centro de Manejo de Ovinos, diante de condições idênticas de manejo e alimentação, sob temperatura e umidades padrão da região Centro-Oeste do Brasil.

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (SEI nº 23106.068874/2024-67).

Teste de Cristalização do Filme Lacrimal (TCFL)

A metodologia para coleta do filme lacrimal e a análise do padrão de cristalização foram realizadas conforme descrito por SILVA et al., 2016 e realizada por um único examinador no mesmo ambiente. A coleta se deu no curral onde os animais residem, e a contenção do animal foi realizada com o auxílio de um técnico treinado em bretes. A lágrima foi coletada no menisco lacrimal palpebral inferior com o auxílio de um tubo capilar, em ambos os olhos. Ato contínuo, foi depositada em uma lâmina de vidro marcada previamente com um círculo de 3 milímetros para delimitar a localização e a quantidade a ser despejada na lâmina, acondicionada em uma sala com temperatura e umidade controladas até a secagem. Durante todo o procedimento de coleta foram registradas temperatura e umidade do ar por meio de termo-higrômetro digital (Incoterm Indústria de Termômetros Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil).

Posteriormente, as lâminas foram analisadas por meio de microscopia de luz com câmera acoplada, para produção de imagens para análise. As imagens foram analisadas pelo programa STEPanizer®, (SILVA et al., 2016). Posteriormente, foram classificadas conforme as escalas de Rolando e Masmali por 3 avaliadores treinados, de forma individual, (SILVA et al., 2016). Todas as imagens foram analisadas na magnificação de 200x.

O software STEPanizer® é uma ferramenta que permite a aplicação de princípios estereológicos em imagens microscópicas e macroscópicas, agregando rigor quantitativo (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). A estereologia se baseia na análise quantitativa tridimensional (3D) de imagens bidimensionais (2D), com o auxílio de

metodologia matemática e propriedades geométricas, reduzindo a subjetividade (ELIAS; HENNIG; SCHWARTZ, 1971; TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011; WEST, 2012; MORAES et al., 2016). Dentro do software, a área sob análise é chamada de área de contagem e é delimitada pelas linhas contínuas, também denominadas linhas de inclusão, e pelas linhas pontilhadas, ou de proibição (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). As regiões que se encontram fora da área de contagem devem ser ignoradas na análise estereológica. O tipo de peça de contagem utilizado na análise foi o “point tile” (Figura 1), caracterizado por uma cruz dentro de um círculo incompleto, que possui a função de permitir a identificação da estrutura abaixo da peça (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). O software dispõe 36 pontos equidistantes sobre a imagem da cristalização. Nas regiões onde os pontos coincidiam com um cristal, especificamente a região do círculo em volta da cruz, o ponto era contabilizado positivamente, caso contrário, não era contabilizado.

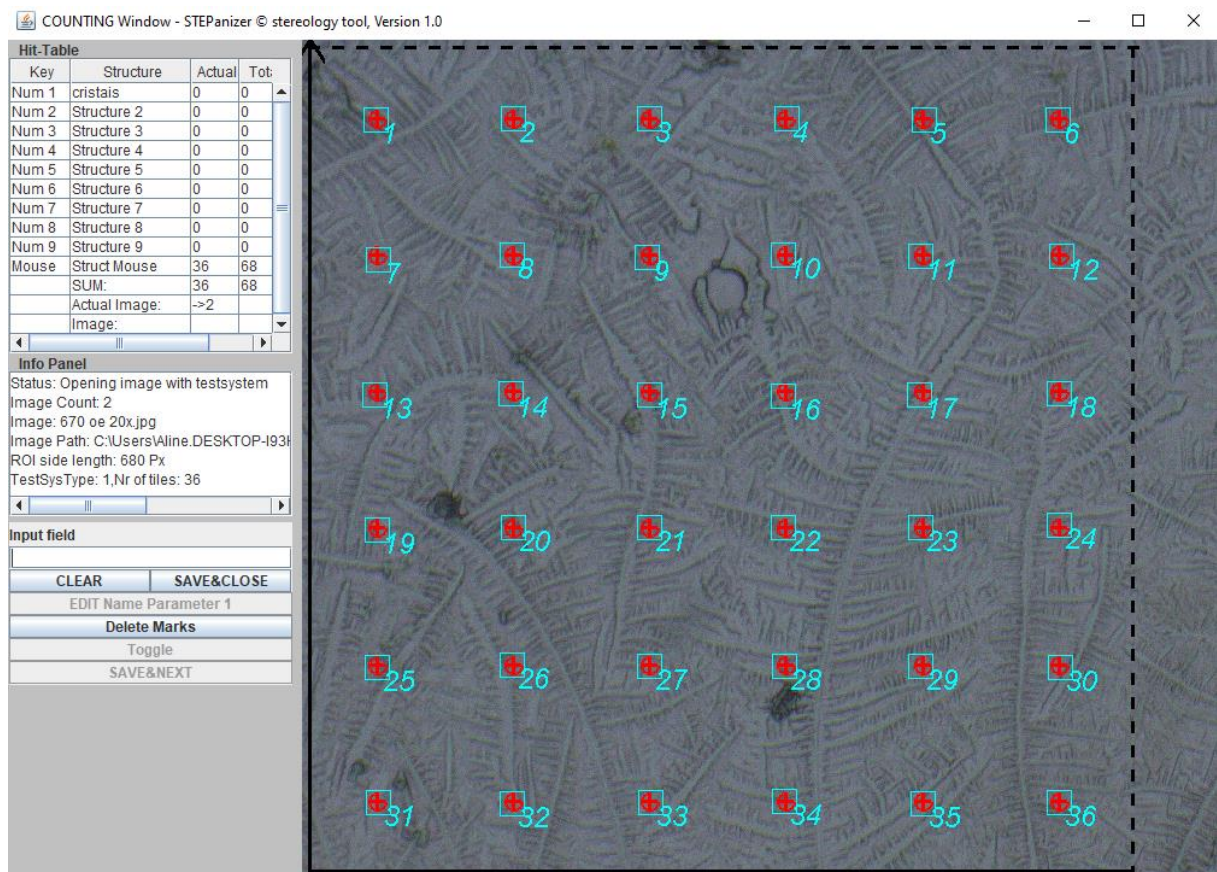


Figura 1. Janela de contagem (“Counting”) do software STEPanizer®. Na imagem analisada, todas as peças equidistantes de contagem coincidiram com estruturas de cristais, sendo então contabilizadas e resultando em um valor de densidade de 36/36.

Análise das células caliciformes da conjuntiva palpebral

A metodologia utilizada para a biópsia da conjuntiva do fórnice conjuntival inferior nasal também foi realizada conforme descrito por SILVA et al., 2016. As coletas foram realizadas pelo mesmo examinador em três dias diferentes dentro de um mês, com condições de temperatura e umidade semelhantes e sempre pela manhã, com registro de temperatura e umidade. Antes da coleta, foi realizada a antissepsia da conjuntiva ocular com solução de iodo-povidona a 1%, durante 5 segundos. Então, foi instilada uma gota de colírio anestésico (Cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%, Allergan, SP, Brasil), e após 5 minutos um fragmento de conjuntiva foi coletado com auxílio de pinça e tesoura. As amostras, com tamanho médio de 2 mm, foram acondicionadas em frascos identificados com solução de formalina tamponada 10% e processadas pelo Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário (LDPV) da Universidade de Brasília. As lâminas de tecido foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) e *Periodic Acid Schiff* (PAS) e posteriormente analisadas por microscopia. Ainda conforme SILVA et al., 2016, a avaliação do corte histológico foi realizada com o aumento de 200 vezes, seguido da contagem das células calciformes em cinco campos diferentes e consecutivos em região de epitélio conjuntival com magnificação de 400 vezes. Posteriormente, o fluido inflamatório foi analisado e classificado como discreto (1), moderado (2) e acentuado (3), em cada uma das amostras, além da identificação do tipo celular predominante (SILVA et al., 2016). Ambas as análises foram realizadas por dois examinadores diferentes, com resultados obtidos a partir da média de cada examinador (SILVA et al., 2016).

Análise Estatística

Os dados estatísticos foram analisados por meio software Graphpad Prism (GraphPad Software, versão 10 para Macbook, 2023). A análise de frequência foi utilizada para descrever a distribuição dos graus de TCFL nas escalas Rolando (1984) e Masmali (2014), em ambos os olhos. Foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk em todas as variáveis. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa no número de pontos do STEPanizer® entre olho direito (OD) e olho esquerdo (OE). A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação do STEPanizer® com os graus das escalas e para correlacionar as escalas entre si, e a regressão linear foi usada para modelar a relação do número de pontos do STEPanizer® e o grau de cristalização de ambas as escalas. Todas as variáveis avaliadas consideraram $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 134 olhos de 67 animais foram analisados, totalizando 88% fêmeas e 12% machos, com média de idade de 2 anos e 10 meses (\pm 1 ano e 11 meses). Os animais eram mestiços de Morada Nova, Dorper e Santa Inês, sendo estas as raças mais comuns no Brasil (MCMANUS et al., 2014).

A escolha de associar a escala Rolando com a escala Masmali deve-se pelo fato que a última se mostrou mais confiável e com maior reprodutibilidade entre diversos avaliadores, enquanto aquela já é uma escala bem estabelecida e utilizada amplamente na avaliação de TCFL de humanos (MASMALI; MURPHY; PURSLOW, 2014). Além disso, o uso do STEPanizer® é validado como uma ferramenta valiosa para reduzir a subjetividade de avaliações quantitativas do TCFL (SILVA et al., 2016).

As condições de temperatura e umidade durante as coletas e secagem das lâminas foram de 49,5% de umidade relativa do ar e 21,5°C, estando estes valores dentro do intervalo descrito como não deteriorantes para o padrão de cristalização (HORWATH et al., 2001). Ambientes mais quentes podem interferir no padrão de cristalização do TCFL, por conta da evaporação acelerada da porção aquosa, em associação com o aumento da concentração de sais, enquanto a umidade alta pode aumentar o tempo de formação dos cristais ou até mesmo impedi-la (HORWATH et al., 2001; SILVA et al., 2016). Dessa forma, a umidade relativa do ar não deve ser superior a 50% e a temperatura deve variar entre 20°C e 26°C (HORWATH et al., 2001).

Na escala Rolando, os tipos mais frequentemente observados foram I em OD e III em OE. Já na escala Masmali (2014), houve predominância do grau 3 em ambos os olhos (**Tabela 1**). Atestou-se correlação forte e positiva entre as escalas Rolando (1984) e Masmali (2014) para OD ($r = 0,922$; $p < 0,0001$) e OE ($r = 0,886$; $p < 0,0001$) (**Tabela 1**), que reforça a confiabilidade das classificações obtidas e valida o uso simultâneo das escalas, considerando que, na correlação de Spearman, coeficientes entre 0,71 e 0,9 são correlações fortes e $> 0,9$ muito fortes (MUKAKA, 2012; MIOT, 2018). Por fim, a morfologia dos cristais observados em ovinos (**Figuras 4 e 5**) se assemelha ao que foi relatado em cães (ORÍÁ et al., 2018) e gatos (VELOSO et al., 2020).

Tabela 1. Comparação da frequência dos graus de TCFL por olho de acordo com a Escala Rolando (1984) e Masmali (2014) e correlação (r) entre as escalas

| Classificação | Rolando (1984) | Masmali (2014) | Correlação entre escalas (r) |
|---------------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|
| Olho direito (OD) | I 33,33% | 0 9,43% | 0,922 (p<0,0001) |
| | II 20,63% | 1 23,40% | |
| | III 31,75% | 2 30,19% | |
| | IV 10,94% | 3 32,56% | |
| | | 4 4,25% | |
| Olho esquerdo (OE) | I 29,63% | 0 13,43% | 0,886 (p<0,0001) |
| | II 22,22% | 1 16,42% | |
| | III 35,56% | 2 19,40% | |
| | IV 12,96% | 3 44,78% | |
| | | 4 5,97% | |

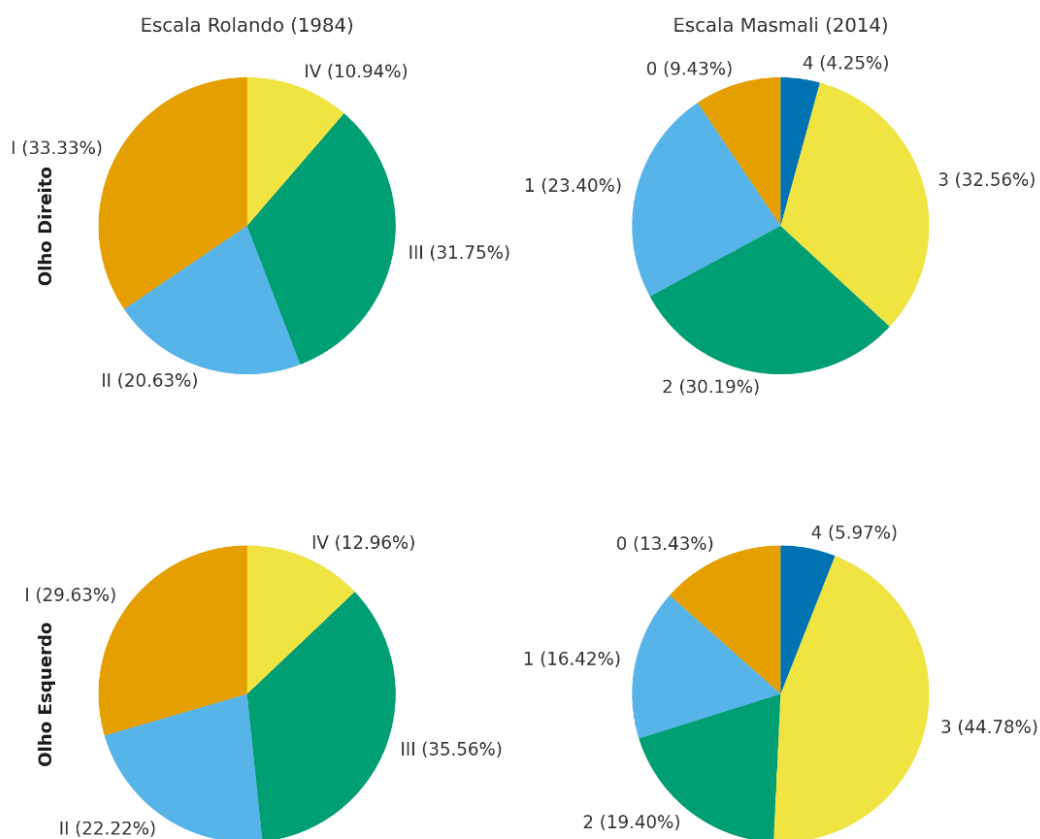


Figura 2. Distribuição das classificações nas escalas Rolando e Masmali, de acordo com olho direito e olho esquerdo.

A análise do TCFL em diferentes espécies domésticas e em humanos já evidenciou variações interespecíficas. Na escala Masmali, humanos sem olho seco se encontram com maior frequência no grau 1 (média de $1,5 \pm 0,57$), enquanto indivíduos com olho seco foram classificados com maior frequência no grau 2 (média de $2,5 \pm 0,52$) (MASMALI et al., 2015a). Em cães, o Tipo I da escala Rolando (1984) e o grau 1 da escala Masmali (2014) foram os mais prevalentes após avaliação do padrão de cristalização de 90 cães e 180 olhos (ORÍÁ et al., 2018), sendo os Tipos III e IV mais prevalentes em cães com ceratoconjuntivite seca (WILLIAMS; HEWITT, 2017). Em gatos, 50% dos 120 olhos analisados apresentaram o Tipo I, seguido de 46,6% com o Tipo II e 3,4% com o Tipo III, em contraste com a escala Masmali, em que 15% dos olhos foram classificados com grau 0, 56,5% com o grau 1, e 28,4% com o grau 2 (VELOSO et al., 2020). Em equinos, a classificação de um total de 60 olhos encontrou 30% classificados como Tipo I, 51,7% como Tipo II, 18,3% como Tipo III e nenhuma amostra com o Tipo IV (SILVA et al., 2016), diferindo dos padrões observados em ovinos. Em ovinos, a presença de padrões tipo III pode sugerir uma condição subclínica de instabilidade do filme lacrimal, mesmo na ausência de sinais oftálmicos evidentes. Portanto, sua qualidade inferior de TCFL, em comparação a cães, gatos e equinos, pode estar relacionada a fatores biológicos e ambientais.

Tabela 2. Correlação das escalas Rolando (1984) e Masmali (2014) com a mediana de pontos do STEPanizer®

| Escala | Olho | Correlação de Spearman (r) | Regressão linear (TFT = a + b × PONTOS) | R² | p-valor |
|---------------|-------------|-----------------------------------|--|----------------------|----------------|
| Rolando | OD | -0,862 | TFT ROL OD = 4,350 – 0,09334 × PONTOS | 0,76 | p<0,0001 |
| | OE | -0,826 | TFT ROL OE = 4,183 – 0,08317 × PONTOS | 0,6634 | p<0,0001 |
| Masmali | OD | -0,890 | TFT MAS OD = 4,522 – 0,1124 × PONTOS | 0,83 | p<0,0001 |
| | OE | -0,889 | TFT MAS OE = 4,337 – 0,1055 × PONTOS | 0,77 | p<0,0001 |
| Escalas | OD | +0,922 | – | – | p<0,0001 |
| | OE | +0,886 | – | – | p<0,0001 |

A análise do STEPanizer® relevou a mediana de pontos de 22.30 (IC 20,00-24,60) para OD e 20,87 (IC 18,47-23,26) para OE, indicando um comportamento simétrico do FL, algo esperado considerando que todos os animais incluídos no estudo foram classificados como hígidos. Não houve diferença significativa entre olhos para o número de pontos de STEPanizer® ($p = 0,2495$). Ademais, foi observada correlação para OD e OE, na escala Rolando (1984), entre o número de pontos do STEPanizer® e os graus de TCFL ($r = -0,862$ para OD e $r = -0,826$ para OE; $p < 0,0001$). Já na escala Masmali (2014), houve correlação entre o número de pontos e OD ($r = -0,89$; $p < 0,0001$) e OE ($r = -0,889$; $p < 0,0001$), sendo tais correlações consideradas fortes e negativas: quando o número de pontos contados no software era alto, a classificação nas escalas deve ser mais próxima dos graus considerados saudáveis e, portanto, mais baixos, como Rolando Tipo I e Masmali Grau 0.

O modelo de explicação fornecido pela regressão linear, que utilizada para compreender a relação entre a contagem do STEPanizer® e as escalas visuais, forneceu a equação TFT ROL OD = $4,350 - 0,09334 \times \text{PONTOS}$ (**Tabela 2**) para OD e TFT ROL OE = $4,183 - 0,08317 \times \text{PONTOS}$ para OE, na escala Rolando. Para Masmali, a regressão linear forneceu as equações TFT MAS OD = $4,522 - 0,1124 \times \text{PONTOS}$ ($R^2 = 0,83$; $p < 0,0001$) e TFT MAS OE = $4,337 - 0,1055 \times \text{PONTOS}$ ($R^2 = 0,77$; $p < 0,0001$) (**Figura 3**). Os altos valores de R^2 indicam que o modelo explica bem a variação observada nos graus com base no número de pontos do software. Por fim, não foi observada relação estatisticamente significativa entre a idade e as escalas do TCFL e análise estereológica do STEPanizer® (**Figura 4**). também explicou bem a variação observada.

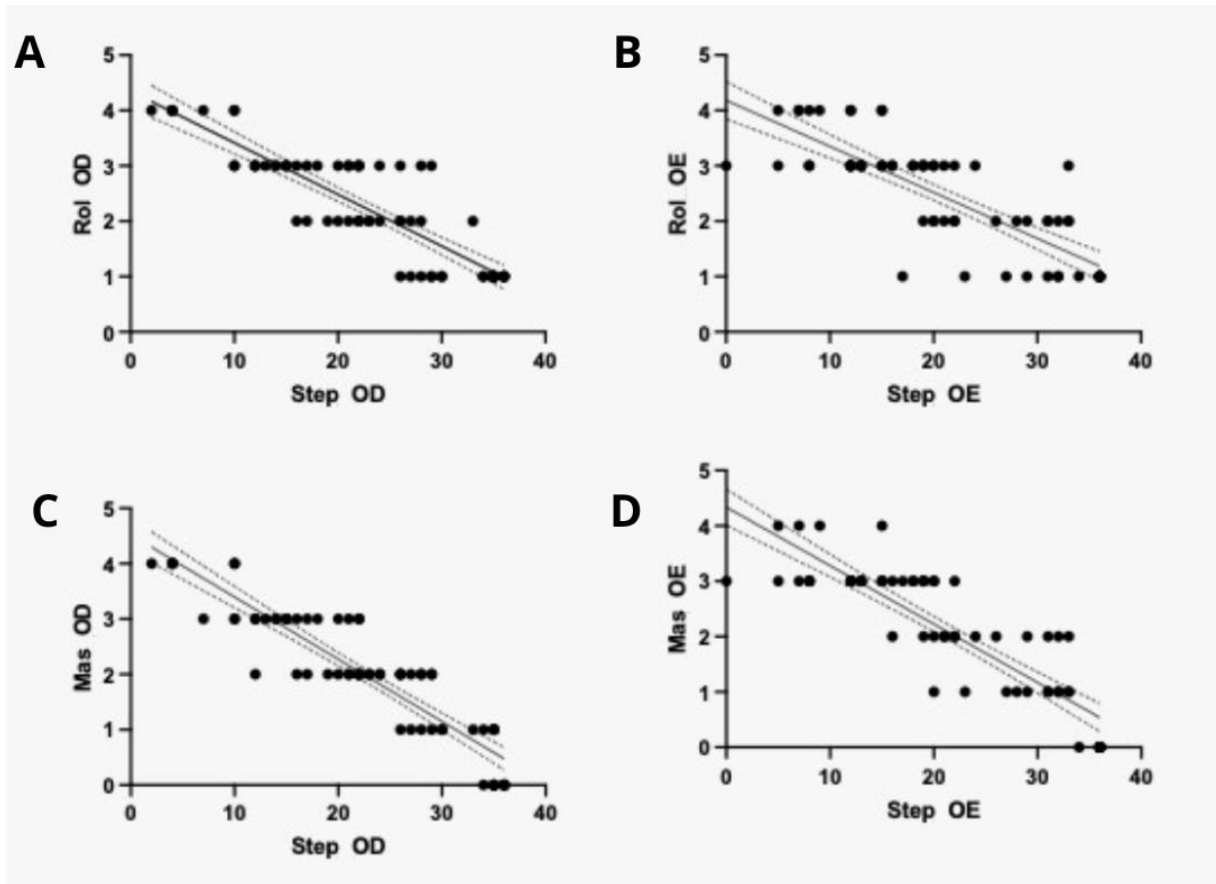


Figura 3. Regressão linear da associação entre o número de pontos do STEPanizer com Escala Rolando (1984) em olho direito (A) e esquerdo (B), e a Escala Masmali (2014) em olho direito (C) e olho esquerdo (D).

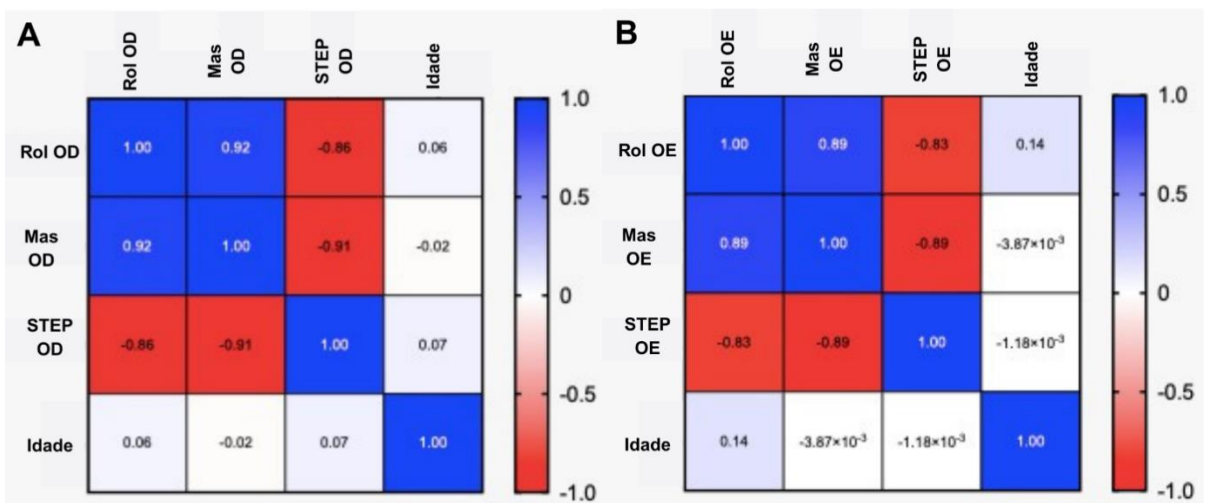


Figura 4. Heatmap das correlações entre as escalas Rolando (1984), Masmali (2014), o número de pontos do STEPanizer® e a associação com a idade, em olho direito OD (A) e olho esquerdo – OE (B).

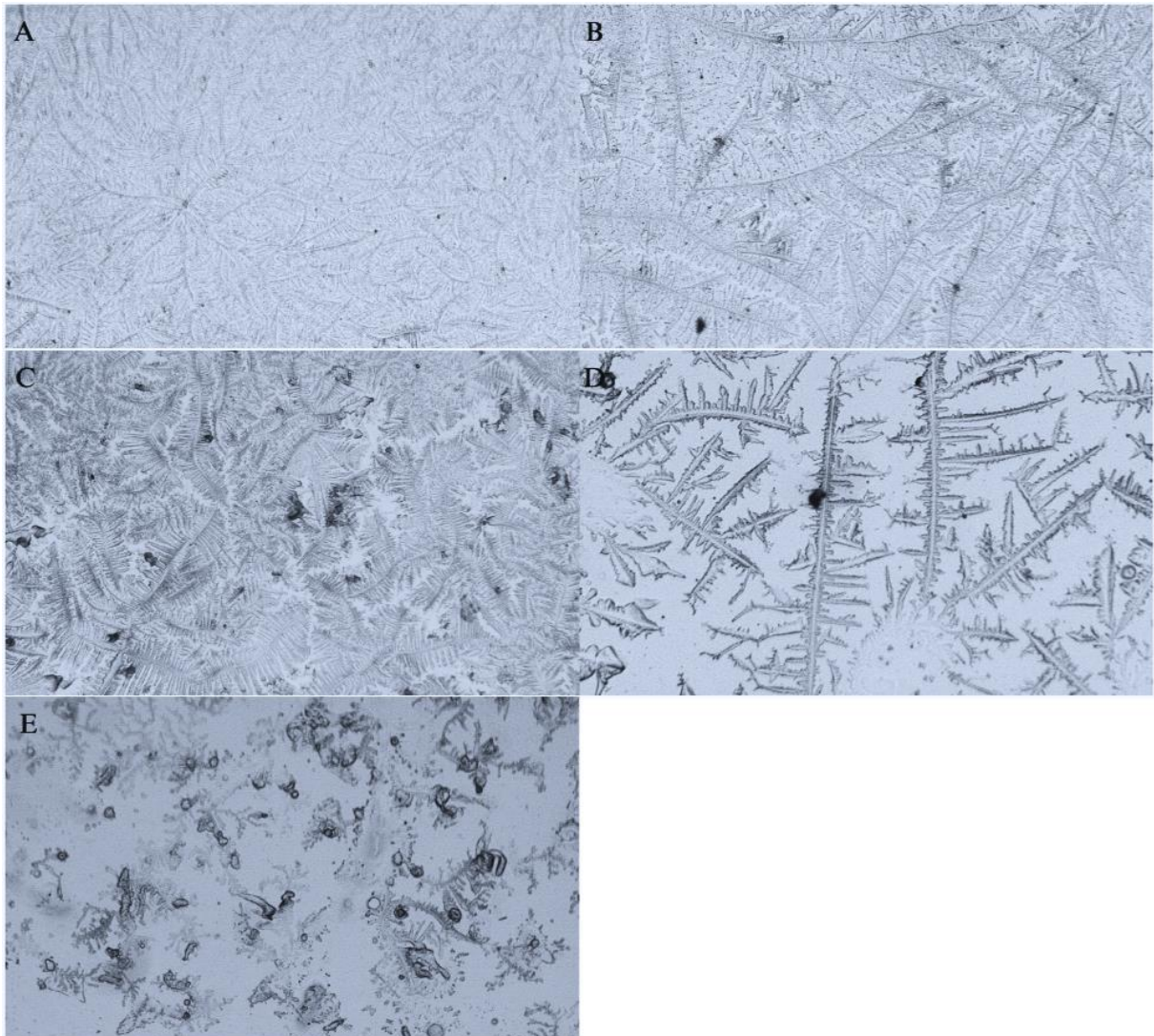


Figura 5. TCFL de ovinos classificados de acordo com as escalas Rolando (1984) e Masmali, (2014), respectivamente: (A) tipo I e grau 0; (B) Tipo I e grau 1; (C) Tipo II e grau 2; (D) Tipo III e grau 3 (E) Tipo IV e grau 4. Magnificação de 100x.

A influência ambiental é um fator bastante relevante para o TCFL, especialmente umidade relativa do ar e temperatura (HORWATH et al., 2001). A partir das características climáticas da região do Centro-Oeste brasileiro, caracterizado pelo clima que varia entre seco, úmido e altas temperaturas por diversos meses do ano, é esperado que haja instabilidade do FL pela evaporação excessiva, prejudicando as defesas imunológicas da SO e tornando a córnea e conjuntiva locais ideais para a proliferação bacteriana (SCHLEGEL; BREHM; AMSELGRUBER, 2003; BERG et al., 2020; ALMUTLEB et al., 2023; KABATA; TERAUCHI; NAKANO, 2024). É possível que a associação da influência do clima no FLPC com a constante exposição à poeira originada das camas dos currais, atuando por fricção contínua e crônica na SO, e o hábito de pastagem contribuam negativamente para a estabilidade

do FL e favorecendo perfil de cristalização menos definido e denso. Além disso, em comparação com os resultados obtidos em equinos que também foram expostos ao clima do Centro-Oeste brasileiro, é possível supor que as condições de manejo e infraestrutura dos currais de ovinos podem ter representado um desafio ambiental para a dinâmica do FL dos animais analisados. Assim, a sensibilidade do TCFL às variações ambientais reforça sua aplicabilidade como ferramenta diagnóstica indireta do conforto ocular em contextos climáticos adversos.

Além do ambiente, é plausível considerar que diferenças biológicas e metabólicas do FL dos ovinos, como níveis de lipídios, eletrólitos e mucinas, possam ter contribuído para as diferenças observadas entre as espécies. Análises comparativas da composição proteica do filme lacrimal do homem, bovinos, ovinos e camelos foram realizadas por SHAMSI et al., 2011, com achados que diferem entre as espécies analisadas: a proteína 1 da camada externa da membrana vitelínica (VMO-1) homóloga foi identificada no FL de ovinos e camelos, mas não em humanos e bovinos. Entretanto, componentes como lipocalina, lisoenzima, lactoferrina, imunoglobulinas e albumina sérica foram comuns nas amostras de todos os indivíduos. Os autores especulam que a diferença na composição proteica pode se dar por diferenças fisiológicas e estruturais da SO, que se desenvolveram evolutivamente pelos diferentes estímulos ambientais em camelos e ovinos, principalmente para a adaptação a climas áridos (SHAMSI et al., 2011). Mais recentemente, ZAHAVI et al. (2025) analisaram a composição elementar da lágrima de ovinos por meio da técnica de emissão de raios X induzida por partículas (PIXE), demonstrando predominância de cloro e sódio, seguidos por potássio, enxofre, fósforo, magnésio e cálcio (ZAHAVI et al., 2025). Além disso, foi observada baixa variabilidade individual e interdiária, reforçando a estabilidade do FL em condições controladas (ZAHAVI et al., 2025). Desse modo, há complementariedade com os achados do presente estudo, indicando que as variações morfológicas dos cristais no TCFL podem estar associadas a alterações na composição elementar do FL, influenciadas por fatores ambientais e/ou fisiológicos (ZAHAVI et al., 2025).

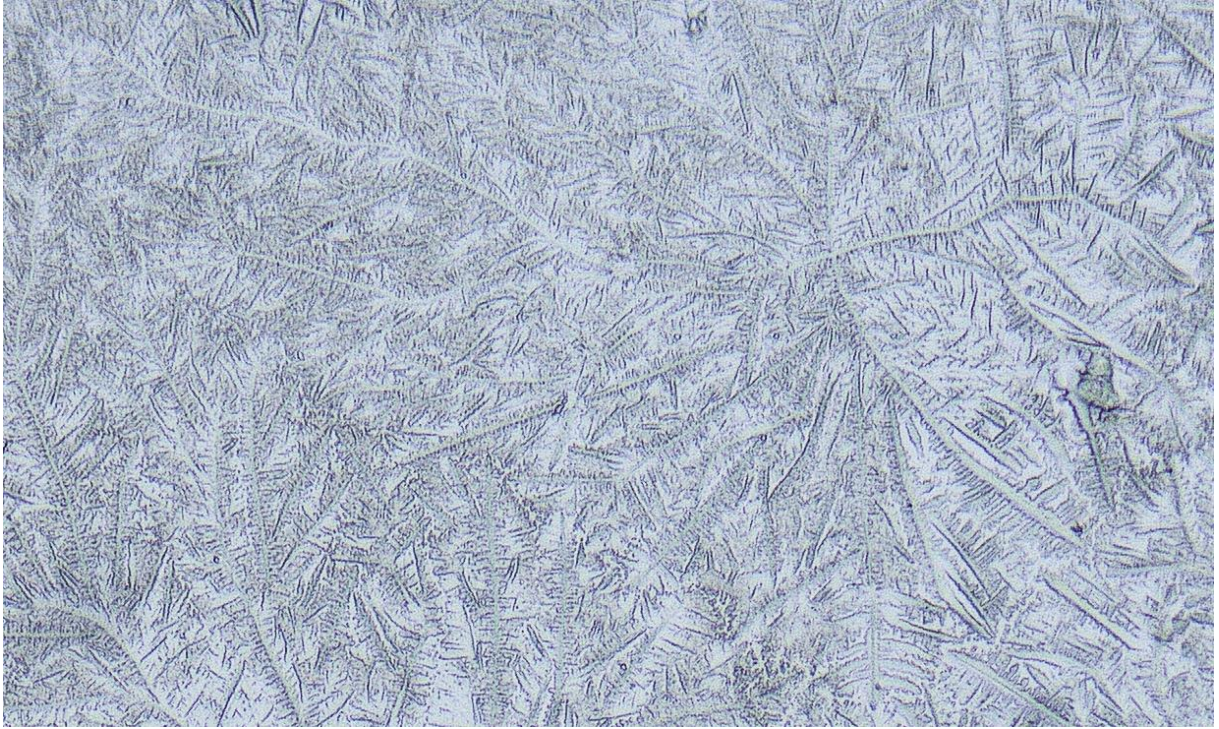


Figura 6. TCFL de ovino classificado como tipo I e grau 0, de acordo com as escalas Rolando (1984) e Masmali, (2014), respectivamente. Magnificação 100x.

A idade é amplamente documentada como um fator que influencia a qualidade do FL em humanos (SHARMA; HINDMAN, 2014; MICERA et al., 2018) e modelos animais (MARTINEZ-DE-LA-CASA et al., 2005; CHANG et al., 2021; GONG et al., 2022), sendo a idade avançada um fator predisponente a alterações como redução da produção lacrimal e diminuição das CCs. Ainda que a variável idade não tenha se correlacionado estatisticamente aos padrões de cristalização neste estudo (**Figura 4**), a ocorrência de padrões insatisfatórios em animais mais velhos pode sugerir uma tendência de instabilidade lacrimal por declínio fisiológico associado ao envelhecimento. Tal hipótese deve ser melhor investigada em estudos com distribuição etária mais ampla.

Não foi observada correlação significativa entre o TCFL e os achados histológicos. A correlação de Spearman (**Tabela 3**) demonstrou associação fraca e negativa entre os graus de cristalização de acordo com a escala Rolando (1984) e o número de CCs ($r = -0,176$), bem como com o infiltrado inflamatório ($r = -0,024$), que foi classificado em discreto, moderado e acentuado (**Figura 7**). Resultados semelhantes foram observados com a escala Masmali (2014), com correlações fracas e negativas tanto com CCs ($r = -0,059$) quanto com o infiltrado inflamatório ($r = -0,058$). Também não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de CCs e o infiltrado inflamatório ($r = 0,182$). Além disso, foi

observada predominância de infiltrado inflamatório linfocítico (**Figura 8**), totalizando 83,96% das amostras analisadas, sendo o linfoplasmocítico o segundo mais predominante. Dessa forma, entende-se que, no modelo estudado, não há associação entre o TCFL e as alterações histológicas da conjuntiva palpebral detectáveis pelas colorações de rotina HE e PAS.

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

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

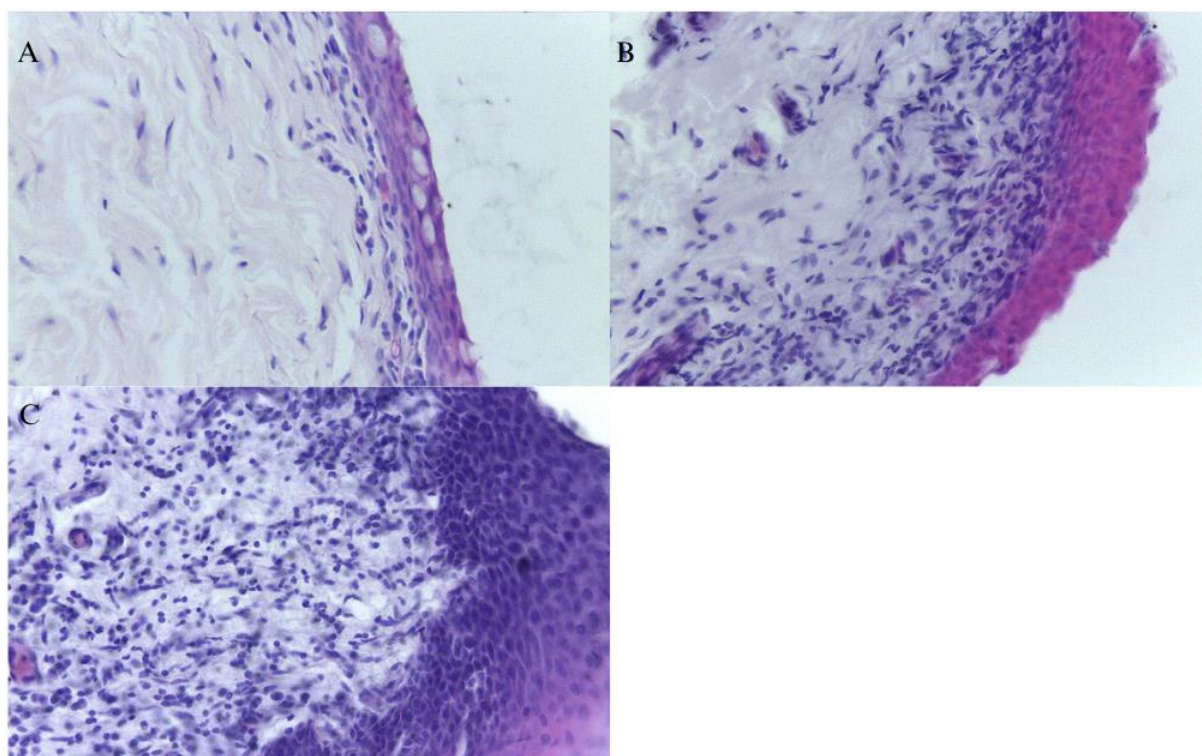


Figura 7. Cortes histológicos conjuntivais classificados de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório: (A) discreto, (B) moderado, (C) acentuado. Coloração em HE. Magnificação de 400x.

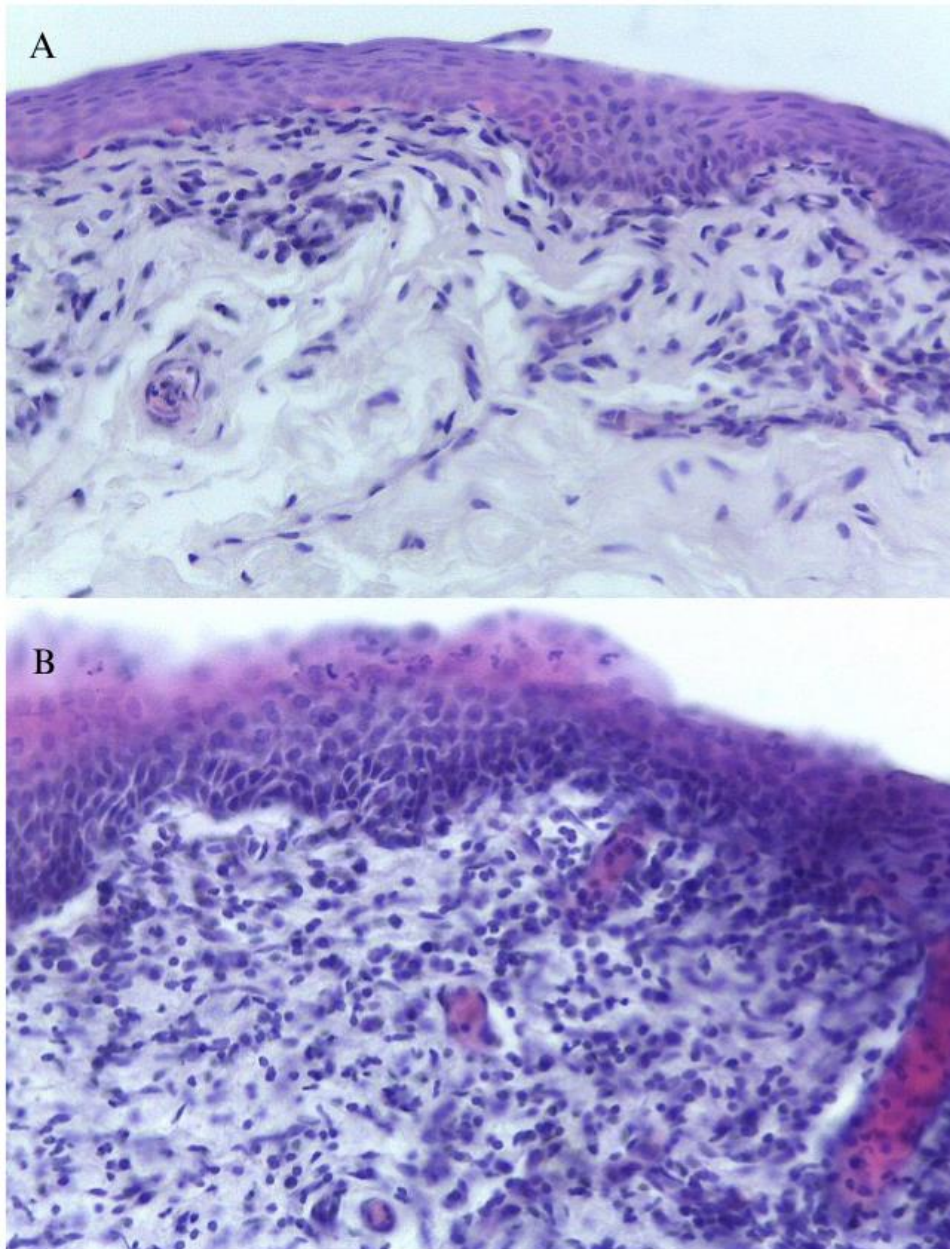


Figura 8. Cortes histológicas da conjuntiva, com infiltrado inflamatório moderado (A) e acentuado (B), respectivamente, e predominantemente linfocíticos. Coloração em HE e magnificação de 400x.

A ausência de correlação significativa entre o TCFL e os achados histológicos da conjuntiva pode ser explicada, em parte, pela intensidade das alterações presentes nos animais avaliados. Em humanos, a população de CCs é capaz de tolerar níveis moderados de inflamação em SO sem perda funcional ou estrutural significativas (MOORE et al., 2011). Entretanto, a partir de um determinado limiar inflamatório há a redução das CCs em associação com hiperosmolaridade lacrimal e comprometimento da homeostase da SO (MOORE et al., 2011). Dessa forma, sugere-se que a estabilidade do FL pode ser mantida mesmo diante de

processos inflamatórios de baixo grau a intermediários (MOORE et al., 2011; KOSINAHAGYÓ et al., 2012).

Do ponto de vista fisiopatológico, é possível que a inflamação conjuntival observada nos ovinos estudados, caracterizada majoritariamente por infiltrado linfocítico discreto, não tenha sido suficientemente intensa ou difusa para alterar a morfologia conjuntival e a composição do FL a ponto de gerar alterações detectáveis pelo TCFL (**Figura 9**). Ademais, é importante destacar que as colorações de rotina utilizadas, HE e PAS, não detectam alterações moleculares sutis ou alterações na qualidade da secreção mucoide das CCs. Uma hipótese possível é a de que a composição bioquímica do FL, especialmente na porção das mucinas, proteínas e sais, tenha sido suficiente para a preservação da morfologia dos cristais, mesmo com leve infiltração inflamatória na conjuntiva. Além disso, a contagem de CCs pode ter sido subestimada pelo fato de que a coloração PAS marca preferencialmente o conteúdo mucoso da célula (**Figura 10**), fazendo com que células que já descarregaram seu conteúdo possam não ter sido contabilizadas (JULIO et al., 2012; SILVA et al., 2016).

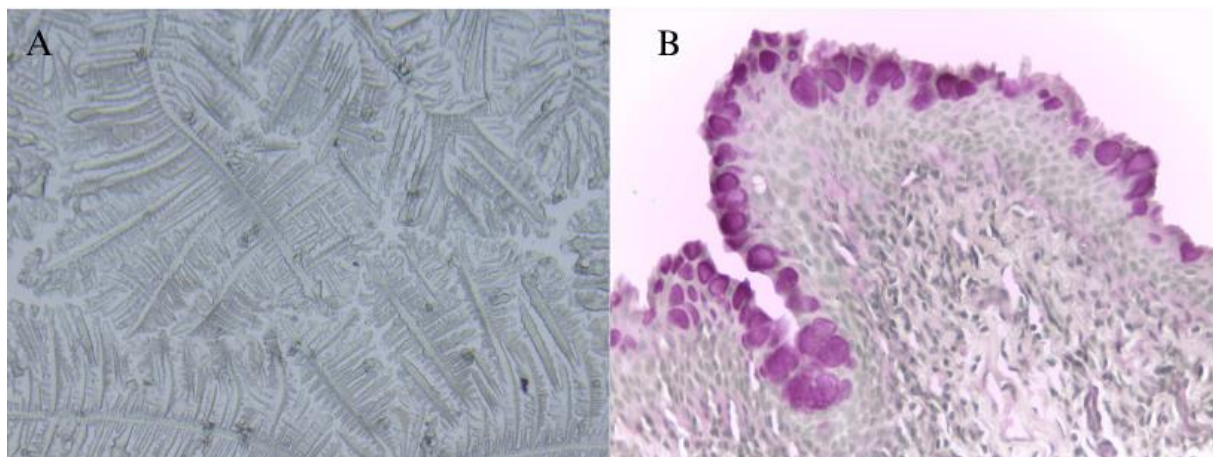


Figura 9. Lâminas de um mesmo animal, sendo (A) TCFL, classificado como tipo II na Escala Rolando e grau 1 na escala Masmali, em magnificação de 100x; (B) Corte histológico de conjuntiva palpebral em coloração PAS, com cerca de 53 CCs no referido campo, em magnificação de 400x.

Tais resultados concordam com os obtidos por Silva et al. (2015) em equinos, em que não houve correlação significativa entre TCFL, número de CCs e infiltrado celular, além do TLS. Esses achados também são corroborados por Oriá et al. (2018), que após analisar olhos de 180 cães hígdos, não encontrou correlação significativa entre o TLS e os padrões TCFL de acordo com ambas escalas, Rolando (1984) e Masmali (2014). Além disso, os autores destacam que o TCFL pode ser sensível ao conteúdo físico-químico do FL e a variáveis

ambientais sem necessariamente refletir alterações anatômicas da SO (ORÍÁ et al., 2018). Dessa forma, o presente estudo reforça a hipótese de que o TCFL reflete especialmente aspectos dinâmicos de composição do FL, e não alterações histológicas conjuntivais visíveis por colorações de rotina.

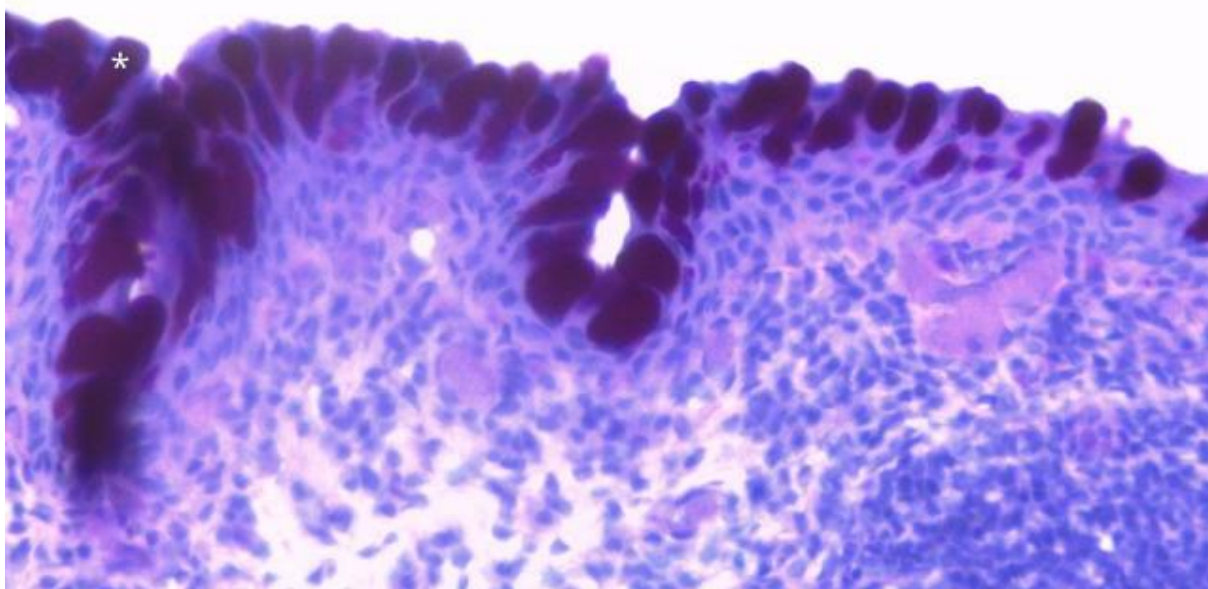


Figura 10. Corte histológico de conjuntiva palpebral, em coloração PAS, com (*) indicando CCC. Magnificação de 400x.

Por outro lado, os estudos realizados em humanos contrastam com esses resultados. Em humanos, a deficiência do FL foi relacionada com o aumento da expressão de interferon- γ , redução na densidade de CCs na conjuntiva e gravidade de afecções conjuntivais (PFLUGFELDER et al., 2015). Ademais, a hiperosmolaridade do FL quando combinada com alterações da SO ou inflamação demonstraram alterações na densidade das CCs. Portanto, conclui-se que inflamação crônica da conjuntiva se relaciona à redução das CCs em humanos (NORN, 1988; PFLUGFELDER et al., 2015; REN et al., 2024). Levando em consideração a função das mucinas na SO, fica evidente que diminuição das CCs na conjuntiva predispõe a instabilidade do FLPC, contribuindo com a síndrome do olho seco (LIU et al., 2024). Ademais, a diminuição das CCs já foi associada ao aumento do número de células inflamatórias da conjuntiva, de forma que o equilíbrio na produção de citocinas regula o processo inflamatório da síndrome do olho seco e atua na diferenciação e homeostase das CCs da conjuntiva, constituindo um ciclo dinâmico e complexo (DE PAIVA et al., 2011; PFLUGFELDER; CORRALES; DE PAIVA, 2013; GIPSON, 2016).

Como limitações, destaca-se a avaliação pontual (e não longitudinal) de cada animal, a ausência de testes complementares como o TLS e o tempo de ruptura do filme lacrimal, além da análise ter sido realizada em apenas um período do ano, sem distinção entre olhos clinicamente secos ou não secos. A análise histológica, por sua vez, não incluiu marcadores imunohistoquímicos nem avaliação molecular das mucinas.

2.5. CONCLUSÕES

O presente estudo associou, de forma inédita, as escalas de Rolando e Masmali com a quantificação estereológica via STEPanizer®, fornecendo dados consistentes e reprodutíveis sobre a dinâmica do filme lacrimal em ovinos. Essa abordagem amplia o escopo de avaliação do teste de cristalização e estabelece um modelo metodológico replicável para futuras investigações.

Os resultados reforçam o potencial do teste de cristalização do filme lacrimal como ferramenta prática na pesquisa em oftalmologia veterinária e bem-estar animal, especialmente em condições tropicais. Recomenda-se que estudos futuros explorem diferentes períodos sazonais, associem métodos bioquímicos e moleculares e estabeleçam valores de referência específicos para ovinos em distintas condições de manejo e faixas etárias.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, I. D. *Diseases of Sheep*. [s.l.] John Wiley & Sons, 2007.

ALMUTLEB, E. S. et al. Effect of Monovalent Electrolyte Solutions on the Human Tear Ferning Pattern. *PLOS ONE*, v. 18, n. 2, p. e0280853, 3 fev. 2023.

BANNIER-HÉLAOUËT, M. et al. Human Conjunctiva Organoids to Study Ocular Surface Homeostasis and Disease. *Cell Stem Cell*, v. 31, n. 2, p. 227- 243.e12, 1 fev. 2024.

BARABINO, S.; CHEN, W.; DANA, M. R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Experimental Eye Research*, v. 79, n. 5, p. 613–621, 1 nov. 2004.

BAUDOUIIN, C. et al. Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 71, p. 68–87, 1 jul. 2019.

BERG, E. J. et al. Climatic and Environmental Correlates of Dry Eye Disease Severity: A Report From the Dry Eye Assessment and Management (DREAM) Study. *Translational Vision Science & Technology*, v. 9, n. 5, p. 25, 29 abr. 2020.

BRASIL, M. da I. N., Secretaria de Desenvolvimento Regional. *Bases para o Plano Nacional de Desenvolvimento da Rota do Cordeiro*. [s.l: s.n.]

BUCKLEY, H. E.; WALKER, A. C. Crystal Growth. *American Journal of Physics*, v. 19, n. 7, p. 430, 1 out. 1951.

CHANG, Y.-A. et al. Animal Models of Dry Eye: Their Strengths and Limitations for Studying Human Dry Eye Disease. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 84, n. 5, p. 459, maio 2021.

CHAVES, N. S. T.; LIMA, A. M. V.; AMARAL, A. V. C. SURTO DE CERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA EM OVINOS CAUSADA POR *Moraxella* spp. NO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL. *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science*, v. 9, n. 1, p. 256–261, 4 abr. 2008.

CHOI, S. M. et al. Effects of DA-6034 on Aqueous Tear Fluid Secretion and Conjunctival Goblet Cell Proliferation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 25, n. 3, p. 209–214, jun. 2009.

CWIKLIK, L. Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Biosimulations of lipid membranes coupled to experiments. v. 1858, n. 10, p. 2421–2430, 1 out. 2016.

DE PAIVA, C. S. et al. Homeostatic control of conjunctival mucosal goblet cells by NKT-derived IL-13. *Mucosal Immunology*, v. 4, n. 4, p. 397–408, 1 jul. 2011.

ELIAS, H.; HENNIG, A.; SCHWARTZ, D. E. Stereology: applications to biomedicalresearch. *Physiological Reviews*, v. 51, n. 1, p. 158–200, jan. 1971.

EVANS, K. S. E.; NORTH, R. V.; PURSLOW, C. Tear Ferning in Contact Lens Wearers. *Ophthalmic and Physiological Optics*, v. 29, n. 2, p. 199–204, 2009.

FAGEHI, R. et al. Improvement in Tear Ferning Patterns of Sheep Tears After Addition of Various Electrolyte Solutions. *Frontiers in Medicine*, v. 8, p. 721969, 2021.

FAO, F. A. A. O. O. T. U. N. *FAOSTAT*. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 10 abr. 2025.

FAW CONCIL. *Farm animal welfare in Great Britain: Past, present and future* Farm Animal Welfare Council Dublin, , 2009. . Disponível em: <<http://www.ongehoord.info/wp-content/uploads/2017/12/11-1.pdf>>. Acesso em: 25 dez. 2024.

FELBERG, S. et al. Reprodutibilidade na classificação do teste de cristalização do filme lacrimal em pacientes com síndrome de Sjögren. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 71, p. 228–233, abr. 2008.

GASQUES, J. G. et al. Total factor productivity in Brazilian agriculture. Em: *Productivity growth in agriculture: an international perspective*. CABI Books. [s.l: s.n.]p. 145–161.

GIPSON, I. K. Distribution of mucins at the ocular surface. *Experimental Eye Research*, Special issue in honour of David Maurice. v. 78, n. 3, p. 379–388, 1 mar. 2004.

GIPSON, I. K. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 54, p. 49–63, 1 set. 2016.

GOLDEN, M. I. et al. Dry Eye Syndrome. Em: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

GOLDING, T. R.; BRENNAN, N. A. The basis of tear ferning. *Clinical and Experimental Optometry*, v. 72, n. 4, p. 102–112, 1 jul. 1989.

GONG, L. et al. A New Non-Human Primate Model of Desiccating Stress-Induced Dry Eye Disease. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 7957, 13 maio 2022.

GULAYDIN, A. et al. Investigation of the presence of Chlamydia spp., Mycoplasma spp. and Moraxella ovis in infectious keratoconjunctivitis cases in sheep and goats in Siirt province and evaluation of clinical findings. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 27, n. 2, p. 183–191, 2024.

HENDRIX, D. V. H.; THOMASY, S. M.; GUM, G. G. Physiology of the Eye. Em: *Veterinary Ophthalmology*. [s.l: s.n.]

HORI, Y. Secreted Mucins on the Ocular Surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 59, n. 14, p. DES151–DES156, 27 nov. 2018.

HORWATH, J. et al. Ocular Ferning Test – Effect of Temperature and Humidity on Tear Ferning Patterns. *Ophthalmologica*, v. 215, n. 2, p. 102–107, 28 fev. 2001.

HUBER, K. Review: Welfare in Farm Animals from an Animal-Centred Point of View. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, v. 18, n. 10, p. 101311, out. 2024.

- IBGE. *Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros) no Brasil*. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>>. Acesso em: 1 nov. 2025.
- JANK, M. S.; ZERBINI, A. N.; CLEAVER, I. Competitividade internacional do agronegócio brasileiro, visão estratégica e políticas públicas. *Agro é paz: análises e propostas para o Brasil alimentar o mundo*. Piracicaba: ESALQ, p. 179–223, 2018.
- JULIO, G. et al. Tear Osmolarity and Ocular Changes in Pterygium. *Cornea*, v. 31, n. 12, p. 1417–1421, dez. 2012.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.
- KABATA, Y.; TERAUCHI, R.; NAKANO, T. Seasonal Variations and Environmental Influences on Dry Eye Operations in Japan. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 30962, 28 dez. 2024.
- KESSING, S. V. Mucus gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. *Acta Ophthalmol*, v. 95, p. 1–133, 1968.
- KNOP, N. et al. The Lid Wiper Contains Goblet Cells and Goblet Cell Crypts for Ocular Surface Lubrication During the Blink. *Cornea*, v. 31, n. 6, p. 668, jun. 2012.
- KOSINA-HAGYÓ, K. et al. Tear Film Function in Patients with Seasonal Allergic Conjunctivitis Outside the Pollen Season. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 157, n. 1, p. 81–88, 2012.
- LANTYER-ARAÚJO, N. L. et al. Rabbit as an Animal Model for Ocular Surface Disease, Tear Osmolarity, Electrolyte, and Tear Ferning Profiles. *Optometry and Vision Science*, v. 97, n. 10, p. 847, out. 2020.
- LIU, Y. et al. Imaging Assessment of Conjunctival Goblet Cells in Dry Eye Disease. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 52, n. 5, p. 576–588, 2024.
- MAGALHÃES, K. A. et al. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. Embrapa - Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. 2020. Disponível em: <<https://agris.fao.org/search/en/providers/122419/records/6474709279cbb2c2c1b133ed>>. Acesso em: 11 nov. 2024.
- MANGWANI-MORDANI, S. et al. Examining Tear Film Dynamics Using the Novel Tear Film Imager. *Cornea*, v. 43, n. 12, p. 1547–1554, 1 dez. 2024.
- MARAGOU, M. et al. Tear and Saliva Ferning Tests in Sjögren’s Syndrome (SS). *Clinical Rheumatology*, v. 15, n. 2, p. 125–132, 1 mar. 1996.
- MARTINEZ-DE-LA-CASA, J. M. et al. Reproducibility and Clinical Evaluation of Rebound Tonometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 46, n. 12, p. 4578–4580, 1 dez. 2005.
- MASMALI, A. M. et al. Application of a new grading scale for tear ferning in non-dry eye and dry eye subjects. *Contact Lens and Anterior Eye*, v. 38, n. 1, p. 39–43, 1 fev. 2015a.

- MASMALI, A. M. et al. Repeatability and Diurnal Variation of Tear Ferning Test. *Eye & Contact Lens*, v. 41, n. 5, p. 262, set. 2015b.
- MASMALI, A. M.; MURPHY, P. J.; PURSLOW, C. Development of a New Grading Scale for Tear Ferning. *Contact Lens and Anterior Eye*, v. 37, n. 3, p. 178–184, 1 jun. 2014.
- MASMALI, A. M.; PURSLOW, C.; MURPHY, P. J. The tear ferning test: a simple clinical technique to evaluate the ocular tear film. *Clinical and Experimental Optometry*, v. 97, n. 5, p. 399–406, 1 set. 2014.
- MCCAUSLAND, C. The Five Freedoms of Animal Welfare Are Rights. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, v. 27, n. 4, p. 649–662, 1 ago. 2014.
- MCMANUS, C. et al. Distribuição geográfica de raças de ovinos no Brasil e sua relação com fatores ambientais e climáticos, como a classificação de risco para a conservação. *ARCO, Bagé*, 2014. Disponível em:
<<https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/ovinocultura/livros/DISTRIBUICAO%20GEOGRAFICA%20DE%20RACAS%20DE%20OVINOS%20NO%20BRASIL.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 2025.
- MEEKINS, J. M.; RANKIN, A. J.; SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. Em: *Veterinary Ophthalmology*. [s.l: s.n.]p. 41–123.
- MEEKINS, J. M.; RANKIN, A. J.; SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. Em: *Veterinary Ophthalmology*. 6. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2021b. p. 41–123.
- MICERA, A. et al. Age-Related Changes to Human Tear Composition. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 59, n. 5, p. 2024–2031, 17 abr. 2018.
- MILLER, D. Measurement of the Surface Tension of Tears. *Archives of Ophthalmology*, v. 82, n. 3, p. 368–371, 1 set. 1969.
- MIOT, H. A. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vasculiar Brasileiro*, v. 17, p. 275–279, 2018.
- MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil. <http://www.ipea.gov.br>, jun. 2021. Disponível em:
<<https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/10621>>. Acesso em: 9 abr. 2025.
- MOORE, J. E. et al. Effect of Tear Hyperosmolarity and Signs of Clinical Ocular Surface Pathology upon Conjunctival Goblet Cell Function in the Human Ocular Surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 9, p. 6174–6180, 3 ago. 2011.
- MORAES, A. C. D. et al. A combination of stereological methods, biochemistry and electron microscopy for the investigation of drug treatment effects in experimental animals. *Journal of Microscopy*, v. 261, n. 3, p. 267–276, 2016.
- MUKAKA, M. M. A Guide to Appropriate Use of Correlation Coefficient in Medical Research. *Malawi Medical Journal*, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

- NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; LORIA, G. R. Ovine mycoplasmal infections. *Small Ruminant Research*, Special Issue: Current Issues in Sheep Health and Welfare. v. 76, n. 1, p. 92–98, 1 abr. 2008.
- NORN, M. Quantitative Tear Ferning Methodologic and Experimental Investigations. *Acta Ophthalmologica*, v. 66, n. 2, p. 201–205, 1988.
- ORIÁ, A. P. et al. Tear Ferning Test in Healthy Dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v. 21, n. 4, p. 391–398, 2018.
- ORIÁ, A. P. et al. Comparison of Electrolyte Composition and Crystallization Patterns in Bird and Reptile Tears. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, 13 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2020.00574/full>>. Acesso em: 11 abr. 2025.
- PAPANICOLAOU, G. N. A General Survey of the Vaginal Smear and its Use in Research and Diagnosis*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 51, n. 3, p. 316–328, 1 mar. 1946.
- PEARCE, E. I.; TOMLINSON, A. Spatial Location Studies on the Chemical Composition of Human Tear Ferns. *Ophthalmic and Physiological Optics*, v. 20, n. 4, p. 306–313, 2000.
- PFLUGFELDER, S. C. et al. Aqueous Tear Deficiency Increases Conjunctival Interferon- γ (IFN- γ) Expression and Goblet Cell Loss. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 56, n. 12, p. 7545–7550, nov. 2015.
- PFLUGFELDER, S. C.; CORRALES, R. M.; DE PAIVA, C. S. T helper cytokines in dry eye disease. *Experimental Eye Research*, Tears: A Unique Mucosal Surface Secretion. v. 117, p. 118–125, 1 dez. 2013.
- PUGH, D. G. et al. *Sheep, Goat, and Cervid Medicine*. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2020.
- RAPOSO, A. C. et al. Evaluation of Lacrimal Production, Osmolarity, Crystallization, Proteomic Profile, and Biochemistry of Capuchin Monkeys' Tear Film. *Journal of Medical Primatology*, v. 47, n. 6, p. 371–378, dez. 2018.
- RAVAZZONI, L. et al. Forecasting of Hydrophilic Contact Lens Tolerance by Means of Tear Ferning Test. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 236, n. 5, p. 354–358, 1 abr. 1998.
- REN, Y. et al. Evaluation of Ocular Surface Inflammation and Systemic Conditions in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study. *BMC ophthalmology*, v. 24, n. 1, p. 492, 12 nov. 2024.
- RHEE, M. K.; MAH, F. S. Inflammation in Dry Eye Disease: How Do We Break the Cycle? *Ophthalmology*, Dry Eye Supplement. v. 124, n. 11, Supplement, p. S14–S19, 1 nov. 2017.
- ROLANDO, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret Int J Ophthalmol*, v. 2, n. 4, p. 32–41, 1984.
- SAĞLAM, A. G. et al. *Moraxella Ovis* and *Mycoplasma Conjunctivae* Isolation from an Ovine Infectious Keratoconjunctivitis Outbreak and Fortified Treatment Approaches.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ, v. 24, n. 4, 2018. Disponível em: <<https://vetdergikafkas.org/abstract.php?lang=en&id=2381>>. Acesso em: 11 abr. 2025.

SCHLEGEL, T.; BREHM, H.; AMSELGRUBER, W. M. IgA and Secretory Component (SC) in the Third Eyelid of Domestic Animals: A Comparative Study. *Veterinary Ophthalmology*, v. 6, n. 2, p. 157–161, jun. 2003.

SEBBAG, L. et al. Goblet Cell Density and Distribution in Cats with Clinically and Histologically Normal Conjunctiva. *Veterinary Ophthalmology*, v. 19, n. S1, p. 38–43, 2016.

SHAMSI, F. A. et al. Analysis and Comparison of Proteomic Profiles of Tear Fluid from Human, Cow, Sheep, and Camel Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 12, p. 9156–9165, 25 nov. 2011.

SHARMA, A.; HINDMAN, H. B. Aging: A Predisposition to Dry Eyes. *Journal of Ophthalmology*, v. 2014, p. 781683, 2014.

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

SOUSA FILHO, H. M. de; BONFIM, R. M. Oportunidades e desafios para a inserção de pequenos produtores em mercados modernos. Em: *A pequena produção rural e as tendências do desenvolvimento agrário brasileiro: ganhar tempo é possível?* Brasília: CGEE, 2013. p. 71–100.

TANG, Y.-J. et al. Establishment of a Tear Ferning Test Protocol in the Mouse Model. *Translational Vision Science & Technology*, v. 9, n. 13, p. 1, 1 dez. 2020.

TSCHANZ, S. a.; BURRI, P. h.; WEIBEL, E. r. A Simple Tool for Stereological Assessment of Digital Images: The STEPanizer. *Journal of Microscopy*, v. 243, n. 1, p. 47–59, 2011.

VELOSO, J. F. et al. The use of tear ferning test in cats for evaluation of ocular surface. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 62, n. 1, p. 23, 26 maio 2020.

WEST, M. J. Introduction to Stereology. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2012, n. 8, p. pdb.top070623, 8 jan. 2012.

WILLCOX, M. D. P. et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *The Ocular Surface*, TFOS International Dry Eye Workshop (DEWS II). v. 15, n. 3, p. 366–403, 1 jul. 2017.

WILLIAMS, D.; HEWITT, H. Tear Ferning in Normal Dogs and Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca. *Open Veterinary Journal*, v. 7, n. 3, p. 268–272, 17 set. 2017.

WILLIAMS, D. L. Welfare Issues in Farm Animal Ophthalmology. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v. 26, n. 3, p. 427–435, nov. 2010.

WILLIAMS, H. J. et al. Ovine Infectious Keratoconjunctivitis in Sheep: The Farmer's Perspective. *Veterinary Record Open*, v. 6, n. 1, p. e000321, 2019.

ZAHAVI, A. et al. Elemental Composition Analysis of Sheep Tears Using Particle-Induced X-Ray Emission. *Veterinary Ophthalmology*, v. n/a, n. n/a, 2025. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.70096>>. Acesso em: 6 out. 2025.

