

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ROGÉRIO RIBAS LANGE

ANATOMIA, MORFOLOGIA E FISIOLOGIA OCULAR DE ALGUMAS ESPÉCIES
DE INTERESSE NA MEDICINA DE ANIMAIS SELVAGENS E DE LABORATÓRIO
COM ÊNFASE EM PRIMATAS NEOTROPICAIS

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ROGÉRIO RIBAS LANGE

ANATOMIA, MORFOLOGIA E FISILOGIA OCULAR DE ALGUMAS ESPÉCIES
DE INTERESSE NA MEDICINA DE ANIMAIS SELVAGENS E DE LABORATÓRIO
COM ÊNFASE EM PRIMATAS NEOTROPICAIS

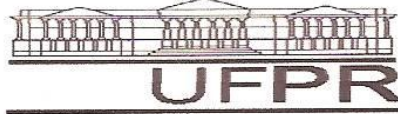
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências
Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor
em Ciências Veterinárias.

Orientador: Professor Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA

2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

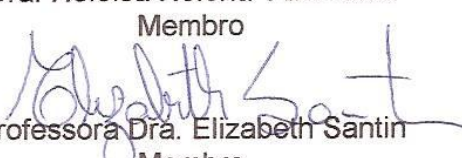
A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada **“ANATOMIA, MORFOLOGIA E FISILOGIA OCULAR DE ALGUMAS ESPÉCIES DE INTERESSE NA MEDICINA DE ANIMAIS SELVAGENS E DE LABORATÓRIO COM ÊNFASE EM PRIMATAS NEOTROPICAIS”** apresentada pelo Doutorando **ROGÉRIO RIBAS LANGE** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.


Curitiba, 27 de agosto de 2012


Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Professor Dr. José Ricardo Pachaly
Membro


Dra. Heloisa Helena Abil Russ
Membro


Professora Dra. Elizabeth Santin
Membro


Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Membro

Dedicatória

Ao meu mano Roberto Ribas Lange, que deixou rastros selvagens, tantas lembranças e saudades, emprestando seu nome ao Parque Nacional Saint-Hilaire/Lange, ao Parque Estadual Roberto Ribas Lange, ao Zoológico da ITAIPU BINACIONAL Roberto Ribas Lange.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de pós-graduação: Leandro Lima, Daniele Aparecida Ayres Garcia, Andressa Cristina de Souza, Amália Turner Guannico, Jorge Pereira e Letícia Olbertz, uma grande e produtiva equipe entusiasta da oftalmologia comparada, que tem trabalhado sinergicamente.

Aos residentes do Hospital Veterinário da UFPR: Alícia Giolo Hipólito, Camila Luba, Rodolfo Bertoldi, Paulo Afonso Ramos Ribeiro Filho, Aline Konell, André Somma, Ramiro Tyszka pelos cuidados aos animais internados no biotério do Hospital Veterinário e pelo auxílio na tomada de medidas.

À graduanda: Andreise Cosata Przydzimirski, sempre disposta a ajudar em todos os procedimentos.

À equipe do Zoológico de Curitiba, Biólogas Tereza Cristina Castellano Margarido e Gilda Tebet e ao técnico Pedro Sanches, pelo auxílio na manutenção das cevas de captura e pelo apoio nas capturas de saguis.

Aos colegas professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, pelo apoio e auxílio, Simone Domit Guérius, Tilde Rodrigues Froes, Peterson Triches Dornbusch, Ivan Roque de Barros Filho, Renato Silva de Sousa e Rosangela Locatelli Dittrich.

Aos Médicos Veterinários do Centro Nacional de Primatas: Paulo Castro e José Muniz, pelo apoio fundamental na pesquisa.

A Gillian Shaw, pela revisão científica e do inglês nos artigos.

À Guarda Municipal de Curitiba pelo apoio nas capturas de saguis no Parque Barigui.

À Grazielle Soresini do Centro de Triagem de Animais Selvagens – CETAS – PUCPR-IBAMA.

Ao Professor José Ricardo Pachaly pelo incentivo e ajuda continuada.

À Universidade Federal do Paraná por mais esta oportunidade.

À minha querida filha Marcela Valles Lange pela ajuda na tradução dos textos para o inglês.

Agradeço especialmente o grande orientador e amigo Fabiano Montiani-Ferreira, que a cada dia de convívio mais admiro como cientista e respeito como pessoa, me guiou pelos caminhos da oftalmologia comparada mostrando um grande e admirável mundo novo.

RESUMO

A presente tese de doutorado está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo é uma introdução onde são justificados cada um dos capítulos seguintes, se aborda a oftalmologia de animais selvagens e a oftalmologia comparada, e discute-se o uso de animais em experimentação. As espécies estudadas na presente tese são identificadas, caracterizadas e apresentadas.

O segundo capítulo trata de um artigo publicado no periódico *Veterinary Ophthalmology* onde são comparados três diferentes métodos de mensuração da fração aquosa do filme lacrimal. O animal modelo utilizado nesta pesquisa foi o sagui-de-tufo-preto. Dois dos métodos utilizados no experimento são tradicionais e o terceiro é uma nova proposta, útil na mensuração lacrimal de animais com olhos de pequenas dimensões onde os métodos convencionais impõem modificações que resultam na impossibilidade de comparação dos resultados obtidos. O método proposto facilita a sua aplicação em qualquer localidade, pois utiliza material padronizado e disponível no comércio internacional (pontas de papel endodôntico padronizadas). O método proposto é inovador e apresenta potencial de aplicabilidade em diversas espécies de interesse em oftalmologia veterinária e em espécies como o camundongo, que dispõe de linhagens utilizadas como modelo experimental para olhos secos nas quais até o momento não era possível mensurar a fração aquosa do filme lacrimal de maneira eficiente e que permitisse a análise comparativa entre indivíduos e outras espécies.

O terceiro capítulo trata de artigo submetido ao periódico *Veterinary Ophthalmology*. No artigo são estabelecidos valores de referência do comprimento horizontal da fenda palpebral em cinco espécies animais de pequeno porte sendo duas aves, dois roedores e um réptil. É utilizado o método das pontas de papel endodôntico padronizado para a mensuração da fração aquosa do filme lacrimal e são estabelecidos os valores de referência para as cinco espécies.

O quarto capítulo descreve o aparato ocular de três espécies de primatas neotropicais, o sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), o mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) e o macaco-da-noite (*Aotus azarae infulatus*). Aborda os valores de referência das medidas oftálmicas anatômicas e fisiológicas, gerando informações úteis para o oftalmologista de animais selvagens. É proposto um índice inovador, composto pela razão entre o diâmetro da córnea e o comprimento axial do bulbo ocular que está relacionado com o hábito de vida da espécie quanto às atividades diurnas ou noturnas.

Palavras-chave: Oftalmologia. Animais selvagens. Primatas. Teste lacrimal da ponta de papel. Ultrassonografia. Atividade diurna e noturna.

ABSTRACT

This doctoral thesis is divided into four chapters. The first chapter is an introduction which brings a justification for each of the following chapters covering compared ophthalmology investigations using wild and laboratory animals. Each of the several species studied in this thesis are identified, characterized and presented in this chapter before each experiment.

The second chapter refers to an article already published in the Veterinary Ophthalmology journal. In this investigation three different techniques of measuring the aqueous fraction of the tear film are compared. The animal model used in this study was the black-tufted marmoset. Two of the methods used in the experiment are traditional and the third one is a new original proposal, a technique useful to measure tear production in animals with small eyes. The proposed method can be applied and is available in any global location, because it uses materials available in international trade (standardized endodontic paper points). The proposed method is innovative and has potential applicability in several species of interest in veterinary ophthalmology and also in laboratory species such as mice. Mice have been used as experimental models for dry eye. Until then, using the old techniques, it was not possible to efficiently measure the aqueous fraction of the lacrimal film and make comparisons among individuals and other species.

The third chapter refers to a paper that has been submitted for publication in the Veterinary Ophthalmology journal. The investigation establishes reference values of the horizontal length of the palpebral fissure in five species of small wild and laboratory animals, being two birds, two rodents and one reptile. The standardized endodontic paper point method was used to measure the aqueous fraction of the tear film and later reference values for the five species were established.

The fourth chapter describes selected biometric parameters of the eye of three different species of neotropical primates, the black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*), the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) and the owl monkey (*Aotus azarae infulatus*). The normal ranges of anatomical and physiological ophthalmic parameters of such species are discussed, producing useful panel of information for the wildlife ophthalmologist. A novel ocular morphology index is proposed consisting of the ratio of corneal diameter and axial ocular length is established for these species, connecting activity pattern (diurnal x nocturnal) with particular eye shapes and dimensions.

Keywords: Ophthalmology. Nonhuman Primates. Standardized endodontic absorbent paper point tear test. Ultrasonography. Diurnal and nocturnal animals.

LISTA DE FIGURAS

1. (CAPÍTULO 2): FIGURA 1 – DISPOSITIVOS UTILIZADOS NA MENSURAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DO FILME LACRIMAL EM SAGUIS (*Callithrix penicillata*). A – PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO. B – FIO DE BARBANTE DO TESTE LACRIMAL DO FENOL VERMELHO. C – FITA DO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO.....22
2. (CAPÍTULO 2): FIGURA 2 – TESTES OFTÁLMICOS REALIZADOS EM SAGUIS-DO-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) PARA MENSURAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DO FILME LACRIMAL. A: TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO. B: TESTE LACRIMAL DO FENOL VERMELHO. C: TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO.....24
3. (CAPÍTULO 2): FIGURA 3 – FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DA FORMA UTILIZADA PARA MENSURAR A ABSORÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA NO TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO. A PORÇÃO UMEDECIDA DA PONTA DE PAPEL SE TORNA FLEXÍVEL COM A UMIDADE DA LÁGRIMA, E QUANDO COMPRIMIDA SE DOBRA NO PONTO EXTREMO DE UMEDECIMENTO, PROPICIANDO A LEITURA DA PORÇÃO UMEDECIDA EM UMA RÉGUA COM ESCALA MILIMÉTRICA.....25
4. (CAPÍTULO 3): FIGURA 1 – IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS ESPÉCIES AVALIADAS NO EXPERIMENTO, (A) CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*) ♂; (B) CURIÓ – (*Sporophila angolensis*) ♂ (FOTO CEDIDA POR ZIG KOCH); (C) TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA (*Trachemys scripta elegans*); (D) RATO (*Rattus norvegicus*); (E) CAMUNDONGO (*Mus musculus*)39
5. (CAPÍTULO 3): FIGURA 2 - (A) ASPECTO DA EMBALAGEM COMERCIAL DOS CONES OU PONTAS DE PAPEL MARCA ROEKO COLOR DA SÉRIE 15 A 40, SENDO QUE FORAM RETIRADOS OS CONES DAS DEMAIS NUMERAÇÕES E ADICIONADOS EM TODOS OS COMPARTIMENTOS, AS PONTAS DE PAPEL NÚMERO 30; TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL (TLPP) REALIZADO EM AMBOS OS OLHOS SIMULTANEAMENTE: (B) TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA (*Trachemys scripta elegans*), (C) CAMUNDONGO (*Mus musculus*) (D) CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*) – INDIVÍDUO IMATURO.....41
6. (CAPÍTULO 4): FIGURA 1 – ASPECTO DA MENSURAÇÃO DA FASE AQUOSA DO FILME LACRIMAL POR MEIO DO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I EM MICO-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*) (A); MACACO-DA-NOITE (*Aotus a. infulatus*), NO MOMENTO DA MENSURAÇÃO DA ESPESSURA CENTRAL DA CÔRNEA UTILIZANDO UM APARELHO PORTÁTIL DE PAQUIMETRIA ULTRASSÔNICA (B); SAGUI-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) SENDO SUBMETIDO À MENSURAÇÃO DA PRESSÃO INTRAOCULAR POR MEIO DE UM TONÔMETRO DE REBOTE (C); SAGUI-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) DURANTE A AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DA CÔRNEA COM O USO DE ESTESIÔMETRO DE COCHET-BONNET (D); MACACO-DA-NOITE (*Aotus a. infulatus*), NO MOMENTO DA AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO BULBO OCULAR, COM UM TRANSDUTOR LINEAR (E); ASPECTO ULTRASSONOGRÁFICO DA IMAGEM OBTIDA EM PLANO DORSAL POR MEIO DA ULTRASSONOGRÁFICA DO BULBO OCULAR DO MACACO-DA-NOITE (*Aotus a. infulatus*).....56
7. (CAPÍTULO 4): FIGURA 2 – GRÁFICO DO TIPO “BOX PLOTS” DEMONSTRANDO OS QUARTIS DOS ÍNDICES OBTIDOS DIVIDINDO O DIÂMETRO DA CÔRNEA PELO COMPRIMENTO AXIAL DO BULBO OCULAR EM MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*), ANIMAL DE HÁBITO DIURNO E EM MICOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*), DE HÁBITO NOTURNO.....59

LISTA DE TABELAS

1. (CAPÍTULO 2): TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS EM TRÊS TESTES DISTINTOS UTILIZADOS PARA A MENSURAÇÃO DA PORÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA DE SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix Penicillata*).....27
2. (CAPÍTULO 3): TABELA 1 – RESULTADOS MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO, OBTIDOS NA MENSURAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA PELO TESTE LACRIMAL DAS PONTAS DE PAPEL (TLPP), VALORES DE 95% DE INTERVALO DE CONFIANÇA, COMPRIMENTO HORIZONTAL DA FENDA PALPEBRAL (CHFP); PESO CORPORAL; UMIDADE RELATIVA DO AR E TEMPERATURA AMBIENTE OBTIDOS EM CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*), CURIÓ (*Sporophila angolensis*), TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA (*Trachemys scripta elegans*), RATO (*Rattus norvegicus*) E CAMUNDONGO (*Mus musculus*).....42
3. (CAPÍTULO 4): TABELA 1 – RESULTADOS OBTIDOS NA TOMADA DE MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), EM MICOS-DE-CHEIRO (*SAIMIRI SCIUREUS*), MICOS-DA-NOITE (*Aotus a. infulatus*) E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) POR MEIO DE UM PAQUÍMETRO DIGITAL. (DCN) DISTÂNCIA ENTRE OS CANTOS NASAIS; (DCT) DISTÂNCIA ENTRE OS CANTOS TEMPORAIS; (DIP) DISTÂNCIA INTER-PUPILAR; (CHFP) COMPRIMENTO HORIZONTAL DA FENDA PALPEBRAL; E (DC) DIÂMETRO DA CÓRNEA DE LIMBO A LIMBO.....57
4. (CAPÍTULO 4): TABELA 2 – MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), EM MICO-DE-CHEIRO (*SAIMIRI SCIUREUS*), MICOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*), E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*), AFERIDAS POR MEIO DE ULTRASSONOGRRAFIA MODO B. COMPRIMENTO AXIAL DA CÂMARA ANTERIOR (CA), ESPESSURA MEDIAL DA LENTE (EL), COMPRIMENTO AXIAL DA CÂMARA VÍTREA (CV), DIÂMETRO AXIAL DO BULBO OCULAR (DABO).....57
5. (CAPÍTULO 4): TABELA 3 – MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), OBTIDAS EM MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*), (N=24); MICOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*) (N=24), E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) DA SENSIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DA CÓRNEA MENSURADA POR MEIO DO ESTESIÔMETRO DE COCHET-BONNET (EST), ESPESSURA CENTRAL DA CÓRNEA (ECC) MENSURADA UTILIZANDO UM APARELHO PORTÁTIL DE PAQUIMETRIA ULTRASSÔNICA, FRAÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA AVALIADA PELO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I (TL SI) E TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO (TL SIM), PRESSÃO INTRAOCULAR (PIO) MEDIDA PELO TONÔMETRO DE REBOTE TONOVET.....57
6. (CAPÍTULO 4): TABELA 4 – MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), DE MICO-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*) (N=24), MICOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*) (N=24), E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) IDENTIFICANDO O PESO CORPORAL, A IDADE, A TEMPERATURA RETAL, A TEMPERATURA AMBIENTE E A UMIDADE RELATIVA DO AR.....58
7. (CAPÍTULO 4): TABELA 5 – OS VALORES OBTIDOS NA MENSURAÇÃO DOS DIÂMETROS DAS CÓRNEAS DE LIMBO A LIMBO, FORAM DIVIDIDOS PELO DIÂMETRO AXIAL DO BULBO OCULAR, OBTENDO-SE O ÍNDICE: DIÂMETRO DA CÓRNEA/DIÂMETRO AXIAL DO BULBO OCULAR (DC÷DABO), A MÉDIA DESTES VALORES E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO SÃO AQUI APRESENTADOS. DC: DIÂMETRO DA CÓRNEA, MENSURADO COM PAQUÍMETRO DIGITAL E DABO: DIÂMETRO AXIAL DO OLHO, MENSURADO POR ULTRASSONOGRRAFIA MODO B.....59

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA – American Dental Association.
- ANSI – American National Standards Institute.
- ARVO - Association for Research in Vision and Ophthalmology.
- AVID – American Veterinary Identification Devices.
- CA – Comprimento axial da câmara anterior.
- CENP – Centro Nacional de Primatas.
- CETAS – Centro de Triagem de Animais Selvagens.
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais.
- CHFP – Comprimento horizontal da fenda palpebral.
- CV – Comprimento axial da câmara vítrea.
- DABO – Diâmetro axial do bulbo ocular.
- DC – Diâmetro da córnea.
- DCN – Distância entre os cantos nasais.
- DCT – Distância entre os cantos temporais.
- DIP – Distância inter-pupilar.
- ECC – Espessura central da córnea.
- EL – Espessura medial da lente.
- EST – Estesiometria.
- FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente.
- IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
- ICMBIO – Instituto Chico Mendes da Biodiversidade.
- LCD - liquid crystal display.
- PIO – Pressão intraocular.
- PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- TLFV – Teste lacrimal do fenol vermelho.
- TLPP – Teste lacrimal da ponta de papel.
- TLS – Teste lacrimal de Schirmer.
- TLSI – Teste lacrimal de Schirmer I.
- TLSIm – Teste lacrimal de Schirmer I modificado.
- UFPR – Universidade Federal do Paraná.
- UnB – Universidade de Brasília.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 REFERÊNCIAS	18
2 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO LACRIMAL EM SAGUI-DE-TUFO-PRETO (<i>Callithrix penicillata</i>) UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES MÉTODOS: TESTE LACRIMAL DE <i>SCHIRMER</i> I MODIFICADO, TESTE LACRIMAL DO FENOL VERMELHO E TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO	20
2.1 RESUMO	20
2.2 ABSTRACT	20
2.3 INTRODUÇÃO	21
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.5 RESULTADOS	27
2.6 DISCUSSÃO	29
2.7 REFERÊNCIAS	33
3 VALORES DE REFERÊNCIA DA FRAÇÃO AQUOSA DO FILME LACRIMAL, MENSURADOS PELO TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL (TLPP), EM ANIMAIS SELVAGENS E DE LABORATÓRIO	37
3.1 RESUMO	37
3.2 ABSTRACT	37
3.3 INTRODUÇÃO	38
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.5 RESULTADOS	43
3.6 DISCUSSÃO	44
3.7 REFERÊNCIAS	45
4 BIOMETRIA OCULAR DE TRÊS PRIMATAS NEOTROPICAIS: SAGUI-DE- TUFO-PRETO (<i>Callithrix penicillata</i>), MICO-DE-CHEIRO (<i>Saimiri sciureus</i>) E MACACO-DA-NOITE (<i>Aotus azarae infulatus</i>)	48
4.1 RESUMO	48
4.2 ABSTRACT	48
4.3 INTRODUÇÃO	49
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.5 RESULTADOS	58
4.6 DISCUSSÃO	60
4.7 REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

O grande mundo dos vertebrados é composto por aproximadamente 47.668 espécies distribuídas entre os grupos não filogenéticos chamados comumente de peixes (24.587 spp.), anfíbios (4.310 spp.), répteis (5.971 spp.), aves (8.750 spp.) e mamíferos (4.050 spp.) (POUGH, HEISER e MCFARLAND, 1999). Se imaginarmos que esta é apenas uma parte da diversidade de oportunidades que a oftalmologia comparada tem como desafio de estudo, podemos ter ideia da magnitude do esforço. Naturalmente, neste breve raciocínio estamos excluindo o enorme mundo dos invertebrados que também é objeto de interesse da oftalmologia comparada.

De modo geral a literatura científica é escassa no que tange a animais selvagens e suas características médicas. Esta carência de dados e informações básicas é responsável pela dificuldade nos avanços clínicos e cirúrgicos por não haver informações suficientes para o estabelecimento de padrões analíticos e de valores de referência.

A oftalmologia tornou-se uma especialidade médica bastante relevante no manejo sanitário de animais selvagens e exóticos. Nos últimos tempos, os bulbos oculares de algumas espécies de animais exóticos e de laboratório se mostraram interessantes modelos experimentais para a compreensão do funcionamento da visão e também para o estudo de doenças genéricas que possam acometer o olho humano. Por conta da expansão do mercado lícito de fauna exótica, da melhoria dos cuidados médicos destinados a espécies ameaçadas de extinção, nos zoológicos e da popularização de animais selvagens como animais de estimação, tornou-se uma real necessidade na atual prática veterinária, profissionais capazes e hábeis em examinar, diagnosticar e tratar especificamente os olhos dos animais exóticos e selvagens (MONTIANI-FERREIRA, 2007).

Com exceção das aves e dos répteis cujos olhos apresentam certas particularidades anatômicas e fisiológicas, as doenças oftálmicas nos mamíferos exóticos são muito similares àquelas observadas em seus parentes domésticos. Contudo, mesmo ao se considerarem estas duas classes ímpares (aves e répteis), o bulbo do olho de todos os animais selvagens, de maneira geral, ainda apresenta muito mais semelhanças do que diferenças. Assim sendo, os olhos de quaisquer vertebrados apresentam as mesmas estruturas fundamentais, que consistem de três

camadas concêntricas (túnica fibrosa: córnea e esclera, túnica média ou úvea e a túnica neural ou retina) e o cristalino (MONTIANI-FERREIRA, 2007).

Para a prática da oftalmologia de animais selvagens, além de um conhecimento específico adequado quanto à anatomia, biologia, fisiologia, comportamento e nutrição, o domínio do manejo, da contenção e da anestesia das espécies de interesse é fundamental.

A carência de literatura no que tange a valores de referência dos parâmetros básicos de diferentes espécies de animais selvagens, dos exames oftálmicos padrões tais como: a fração aquosa do filme lacrimal, as medidas oculares aferidas com paquímetro convencional, com ultrassonografia nos modos A e B, a espessura da córnea, a pressão intraocular, a sensibilidade da superfície da córnea, correspondem a uma lacuna que prejudica severamente a qualidade dos procedimentos clínicos e cirúrgicos da oftalmologia dos animais selvagens.

A pesquisa oftalmológica em animais selvagens também tem uma vertente cientificamente interessante no sentido de produzir conhecimento que pode ser útil para o entendimento dos processos evolutivos. O conhecimento detalhado do aparelho visual, incluída sua anatomia, fisiologia e histologia, consistem numa grande ferramenta, que pode ser utilizada para o esclarecimento dos intrincados processos evolutivos das espécies animais.

O aprofundamento do conhecimento oftalmológico de animais selvagens também poderá render a identificação de modelos experimentais para o estudo de doenças oculares de seres humanos.

Alguns parâmetros básicos como a mensuração da fração aquosa do filme lacrimal são de difícil avaliação, especialmente em animais de pequeno porte (particularmente nos pequenos mamíferos e aves passeriformes), devido a reduzidas dimensões do comprimento horizontal da fenda palpebral quando é menor ou igual à largura da fita padrão do teste lacrimal de Schirmer, que mede cinco milímetros. Para contornar esta dificuldade, as técnicas tradicionais como o teste lacrimal de Schirmer têm sido modificadas de diversas formas, disto resulta a produção de resultados não comparáveis, decorrentes de protocolos não padronizados.

Portanto o estabelecimento dos valores de referência dos bulbos oculares e dos parâmetros fisiológicos é fundamental para o embasamento da oftalmologia destas espécies não convencionais.

Os roedores são amplamente utilizados como animais de experimentação científica, entretanto, os seres humanos e os roedores compartilharam ancestrais comuns há longínquos 75 milhões de anos, ao passo que nos separamos dos demais Primatas há apenas 40 milhões de anos. Somos, portanto muito mais próximos dos demais primatas do que dos roedores. Esta proximidade e semelhança são importantes e até fundamentais em pesquisas onde se exige uma estreita relação genética (SASAKI *et al.*, 2009). Os primatas, portanto são modelos experimentais interessantes para a pesquisa médica.

O Brasil detém a posição de campeão mundial de diversidade em primatas, totalizando 107 espécies (CHIARELLO, 2008). Apesar disto, investimentos limitados têm sido feitos na pesquisa deste grupo animal de grande importância, seja pela riqueza de espécies, seja pela proximidade filogenética com o homem e pelo consequente compartilhamento de doenças.

Existem apenas três centros de primatologia no Brasil: o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, ligado a FEEMA, o Centro Nacional de Primatas (CENP) ligado ao Instituto Evaldo Chagas em Ananindeua, Pará e o Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (UnB). O CENP é o único dos três, dotado de estrutura para pesquisa científica voltada especificamente para biomedicina, sendo que os primatas são utilizados como modelos experimentais para pesquisas médicas de interesse humano. O Centro de Primatologia do Rio de Janeiro é voltado à conservação de espécies ameaçadas, historicamente tem passado por graves dificuldades financeiras. Apresenta um quadro funcional insuficiente e carência de recursos, sobrevive unicamente em função dos esforços, entusiasmo e dedicação do grande primatólogo, Dr. Alcides Picinatti. O Centro da UnB é institucional, ligado ao IBAMA tendo poucos recursos e estrutura mínima.

Uma característica marcante da família Callitrichidae é a presença de ornamentos de cabeça como tufos, cristas, juba e bigodes, que aparecem em várias espécies; possuem garras nos membros torácicos e pélvicos, que as auxiliam ao escalar os troncos das árvores, bem como o forrageamento de insetos e pequenos vertebrados. Essa família é conhecida por possuir as menores espécies de primatas com pesos que variam de 100g (*Cebuella pigmea*) a cerca de 600g (gênero *Leontopithecus*). Possuem cauda longa, por vezes maior que o comprimento do corpo e não preênsil. O gênero *Callithrix* se distingue dos *Saguinus* e *Leontopithecus* por possuir mandíbula e dentes diferenciados e especializados que

perfuram troncos de árvores em busca de exsudatos, látex ou goma das árvores. Porém a fórmula dentária dos três gêneros é a mesma: I 2/2, C1/1, P3/3, M2/2 = 32 (VERONA e PISSINATTI, 2006).

O sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) é um pequeno primata do Novo Mundo que, devido a suas características de pequeno tamanho, e disponibilidade biológica única (MANSFIELD, 2003), tem atraído considerável atenção como um animal com potencial utilidade na pesquisa biomédica especialmente nas áreas como neurociência, pesquisas com células tronco, toxicologia, imunidade e doenças autoimunes, além da biologia reprodutiva. Os saguis têm uma gestação relativamente curta (± 144 dias), atingem a maturidade sexual aos 12-18 meses, e as fêmeas têm 40-80 partos durante a sua vida. Assim, a aplicação de técnicas transgênicas para saguis podem ser viáveis, o que facilitará o estudo de doenças humanas. Contrastando com isto, os primatas do Velho Mundo, mais comumente utilizados, tais como o macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) e o macaco-cynomolgus (*Macaca fascicularis*), cujas fêmeas atingem a maturidade sexual apenas com cerca de três anos e têm menor descendência (± 10 filhotes) ao longo da vida. Desta maneira, apesar dos saguis serem filogeneticamente mais distantes dos seres humanos do que os primatas do Velho Mundo, o seu potencial como modelos transgênicos para doenças humanas tem um significado muito valioso (SASAKI et al., 2009).

O mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) é também um primata de porte pequeno e hábitos sociais que se presta ao uso como animal de experimentação sendo a maior população mantida no Centro Nacional de Primatas (Dr. José Muniz – inf. pessoal).

O macaco-da-noite (*Aotus azarae infulatus*) foi utilizado na pesquisa apresentada nesta tese. O gênero *Aotus* é amplamente utilizado como animal modelo para pesquisa médica, em infectologia e neurologia. Especialmente em oftalmologia ele tem um particular interesse por apresentar hábito noturno, sendo o único gênero de primata neotropical noturno (LEDUC, et al., 1983).

A visão nos primatas difere dos demais mamíferos por apresentarem olhos grandes em relação ao tamanho do corpo. Os antropóides apresentam córneas pequenas proporcionalmente ao tamanho dos olhos. Isto se explica pelo fato de que os primatas ancestrais eram originalmente noturnos e de forma adaptativa desenvolveram grande acuidade visual e amplificaram o tamanho do bulbo ocular. Com a mudança de hábitos a que foram impostos por motivos adaptativos tornando-

se diurnos, reduziram o tamanho da córnea, aumentando a distância nodal posterior e melhorando a resolução visual (CALLUM e KIRK, 2007).

Segundo KOBAYASHI e KOSHIMA (1997), O olho humano apresenta características únicas. O contraste de cores entre a pupila (negra) e a íris (clara) circundada pela esclera branca devido à transparência da conjuntiva, somado a uma grande largura da fenda horizontal palpebral resulta em fácil identificação do direcionamento do olhar. Os autores propuseram a teoria do olho cooperativo. A hipótese justifica a importância social na identificação de perigos potenciais, dispensando a vocalização ou meneios de cabeça e valorizando a mímica visual. Por sua vez os olhos de todos os demais primatas, do Novo ou Velho Mundo apresentam a coloração da esclera ou da conjuntiva escura, reduzindo o contraste de tons entre as pupilas, a íris e o entorno, dificultando desta maneira a avaliação do direcionamento do olhar.

SILVEIRA *et al.*, (2004), propuseram a classificação dos primatas quanto a características visuais em três grupos, sendo o primeiro composto pelos animais que apresentam uma pequena razão entre bastonetes e cones, são diurnos e possuem olhos pequenos, o segundo grupo composto por animais que apresentam olhos médios a grandes, são diurnos e tem uma grande razão entre bastonetes e cones e o terceiro grupo é composto por animais noturnos com olhos grande e uma grande razão entre bastonetes e cones.

A fauna de primatas do Novo Mundo apresenta muitas curiosidades quanto a aspectos do aparelho visual. Os bugios (*Alouatta* spp.) são um caso especial. Para discutirmos estas particularidades, vamos rever o caso dos primatas do Velho Mundo, onde os seres humanos se incluem. Segundo JACOBS e NATHANS (2009), o gene responsável pela produção da Opsina S, que propicia a visão de comprimentos de onda curtos (azul) localiza-se no cromossomo sete que não é sexual, os genes das Opsinas M e L – responsáveis pelos comprimentos de onda longos (verde e vermelho), se encontram em ambos os cromossomos X, isto determina que tanto os machos como as fêmeas no caso dos primatas do Velho Mundo apresentem visão tricromata. No caso dos primatas do Novo Mundo, o gene responsável pela visão do comprimento de onda azul encontra-se também no cromossoma sete, não sexual. Entretanto, em cada um dos cromossomos sexuais X apenas um dos genes (M ou L) responsáveis pelas opsinas: verde ou vermelha estará presente, determinando que somente as fêmeas possam ser dicromatas

quando em ambos os cromossomos X se encontrar a mesma opsina; ou tricromatas quando em cada um dos cromossomos X encontre-se uma opsina diferente. No caso dos machos sempre serão apenas dicromatas, pois como possuem apenas um cromossomo X, isto propicia a oportunidade de apenas uma opsina que somada a opsina do cromossomo sete redundante na opção única de dicromia. Entretanto, no caso dos bugios, em ambos os cromossomos X encontram-se as opsinas M e L, responsáveis pelos comprimentos de onda verde e vermelho, o que determina que os dois sexos sejam tricromatas, de maneira assemelhada ao que ocorre com os primatas do Velho Mundo (JACOBS *et al.*, 1996). O mico-da-noite (*Aotus spp.*) que é o único primata sul americano noturno, apresenta uma característica ainda mais curiosa, ambos não apresentam o gene para opsina S no cromossomo sete e em ambos os cromossomos X está presente um único gene para a mesma opsina. Desta forma em ambos os sexos a espécie apresenta visão monocromática. Estas características particulares dotam de grande interesse científico o estudo do bulbo ocular destas espécies, particularmente a espécie noturna.

Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), ave da ordem passeriforme, muito conhecida distribuída por todo o Brasil extra-amazônico, comumente utilizada como animal de estimação (SICK, 1986). Apresenta dimorfismo sexual sendo que os machos apresentam cor amarela vivo e píleo alaranjado, o dorso com estrias negras; as fêmeas apresentam cores menos intensas. Reproduzem bem em cativeiro e existem diversas linhagens selecionadas que apresentam cores e variações diferentes da forma selvagem.

Curió (*Sporophila angolensis*), ave passeriforme canora, muito apreciada para torneios de canto, tradicional no Brasil e extremamente valorizada. É atualmente o pássaro mais cobiçado do país. Sofre grande pressão de caça e embora comum foi extremamente caçado (SICK, 2008). Está incluída em diversas listas estaduais brasileiras de espécies ameaçadas de extinção. Quanto à lista nacional, é um caso único, esteve relacionado nela e foi retirado devido ao sucesso obtido pelos criadores amadoristas e pela sequente valorização dos animais selecionados produzidos em cativeiro e a desvalorização dos animais de vida livre para este uso (LANGE, 1978).

Quanto aos camundongos (*Mus musculus*) linhagem *Swiss Webster* e ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem *Wistar*, são espécies domésticas, amplamente

utilizadas na experimentação animal, existem muitas linhagens de modelos experimentais para diversas doenças de seres humanos.

A tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) é nativa dos Estados Unidos da América, e a tartaruga mais comum em cativeiro (KIRCHGESSNER e MITCHELL, 2009) foi o único representante dos répteis avaliados nos estudos que seguem. Pertence à ordem Testudina, é exótica, criada comercialmente nos Estados Unidos da América e vendida internacionalmente como animal de estimação. Chega ilegalmente ao Brasil, curiosamente trata-se de tráfico que transita em direção incomum, pois o maior volume do tráfico de animais sai da América do Sul para a América do Norte e Europa.

1.1 REFERÊNCIAS

CALLUM, F.R.; KIRK, E.C. Evolution of eye size and shape in primates, **Journal of Human Evolution**, v. 52, p. 294-313, 2007.

CHIARELLO, A.G.; AGUIAR, L.M.S.; CERQUEIRA, R. *et al.* Mamíferos ameaçados de extinção do Brasil. *In*: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente – Fundação Biodiversitas, 2008.

JACOBS GH, NELTZ M, DEEGAN JF, NALZ J. Trichromatic colour vision in New World monkeys. **Nature** v. 382, p 156-158. 1996.

JACOBS, GH., E NATHANS, J. The evolution of primate color vision **Scientific American**. 2009. 300 (4), 56-63.

Kirchgessner A. Mitchell MA. Chapter 9 – Chelonians in: **Manual of Exotic Pet Practice**. Ed. MARK A. MICHELL e THOMAS N. TRULLY, JR. Saunders Elsevier. 2009.

KOBAYASHI H, KOSHIMA S. Scientific correspondence **Nature** v. 387. 1997.

LANGE, ROBERTO RIBAS. Criação de Animais em Cativeiro. **Monografia**. Prêmio de Ecologia Cidade de Curitiba. Fundação Cultural de Curitiba. 1978.

LEDUC JW, LEMON SM, KEENAN CM, GRAHAM RR, MARCHWICKI RH, AND BINN LN. Experimental infection of the New World owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus. **Journal List. Infect. Immun.** v. 40(2); May 1983.

MANSFIELD, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. **Comparative Medicine.** 53, 383–392. 2003.

MONTIANI-FERREIRA F, Oftalmologia – Capítulo 65 In: **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.** Eds. Zalmir S. Cubas, Jean C. R. Silva e J. L. Catão-Dias. Roca. 2007: 1092-1104.

POUGH FH, HEISER JB, MCFARLAND WN. Capítulo 1: Diversidade, evolução e classificação dos vertebrados. In: **A vida dos vertebrados.** 2^o Edição. Atheneu Editora São Paulo, 798p. 1999.

PRIMACK, R. B. E E. RODRIGUES, **Biologia da conservação.** Londrina: Editora Rodrigues. 328p. 2001.

SASAKI E, SASAKI E, SUEMIZU H, SHIMADA A, HANAZAWA K, OIWA R, KAMIOKA M, TOMIOKA I, SOTOMARU Y, HIRAKAWA R, ETO T, SHIOZAWA S, MAEDA T, ITO M, RYOJI ITO, KITO C, YAGIHASHI C, KAWAI K, MIYOSHI H, TANIOKA Y, TAMAOKI N, HABU S, OKANO H & NOMURA T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. **Nature.** V. 459. 2009

SICK H. **Ornitologia brasileira.** Editora Universidade de Brasília, 827p. 1984.

SILVEIRA LCL, SAITO CA, LEE BB, KREMERS MSF, KILAVIK BE, YAMADA ES, PERRY VH. Chapter 2: Morphology and physiology of primate M and P cells. **Progress in Brain Research.** V. 144 ISSN 0079-6123. 2004.

VERONA, CARLOS EDUARDO DA SILVA E PISSINATTI, ALCIDES, Primates – Primatas do Novo, 277-358p., Mundo, In: **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária,** Cubas, Zalmir Silvino; Jean L. Silva e José Luiz Catão-Dias Ed. Roca. 1334p. 2006.

2 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO LACRIMAL EM SAGUI-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES MÉTODOS: TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO, TESTE LACRIMAL DO FENOL VERMELHO E TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO

Measurement of tear production in black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) using three different methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and standardized endodontic absorbent paper points

2.1 RESUMO

Objetivo: Mensurar a produção lacrimal de saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), adultos hígidos.

Método: Um total de 19 animais foi avaliado quanto à produção lacrimal pelos métodos de Schirmer I modificado, do fenol vermelho e da ponta de papel absorvente endodôntico padronizada e os resultados obtidos foram comparados quanto à eficiência e praticidade.

Resultados: Schirmer I modificado, média $-0,46 \pm 3,41$ mm/min.; fenol vermelho, média $13,27 \pm 5,41$ mm/15 seg.; ponta de papel endodôntico padronizada nº 30, média $9,32 \pm 3,09$ mm/min.; abertura horizontal da rima ou margem palpebral, média $7,83 \pm 0,72$ mm. É proposta uma alternativa prática de mensuração da fração aquosa do filme lacrimal em saguis por meio do uso de pontas de papel absorvente endodôntico padronizada.

Palavras chave: Primata, saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), teste lacrimal de Schirmer, teste lacrimal do fenol vermelho, ponta de papel absorvente endodôntico padronizada.

2.2 ABSTRACT

Objective: To report normal tear production of healthy adult black-tufted marmosets and propose a novel alternative for the measurement of the aqueous portion of tear production in animals with small eyes.

Animal studied: Black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*).

Procedures: Tear production of 19 animals was evaluated by the following methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and the novel use of standardized endodontic absorbent paper points. These methods and results were compared. Additionally, blink frequency and palpebral fissure length were measured.

Results: Modified Schirmer's test I, mean = -0.46 ± 3.41 mm/min; Phenol red thread, mean = 13.27 ± 5.41 mm/15 s.; Standardized endodontic paper points, size 30, mean = 9.32 ± 3.09 mm/min; Mean palpebral fissure length = 7.83 ± 0.72 mm. Blink frequency, mean = $20.27 \pm 5.92/5$ min.

Conclusions: Normal parameters for blink frequency, palpebral fissure length and tear production measurement are presented. The palpebral fissure of black-tufted marmoset is very small and tear production is one of the lowest reported for all animal species. A

novel and practical alternative for tear production measurement using standardized endodontic absorbent paper points is presented and is indicated for animals with small eyes.

Key-words: Black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*). Endodontic absorbent paper points. Phenol red tear test. Primate. Schirmer's tear test.

2.3 INTRODUÇÃO

De maneira geral, os olhos dos primatas não humanos são muito semelhantes aos dos seres humanos. Primatas têm sido utilizados ao longo dos anos como modelos experimentais para estudos oftalmológicos (BENIRSCHKE e RICHART, 1960; JAAX *et al.*, 1984; GIRARD *et al.*, 2011). Historicamente, os estudos comparativos em oftalmologia experimental utilizaram inicialmente primatas do Velho Mundo, no entanto, seu alto custo, e baixa fecundidade associada a seu grande tamanho e dificuldades de manuseio têm limitado o seu uso. A escolha, atualmente recai sobre os pequenos primatas do Novo Mundo, especialmente os gêneros *Callithrix* e *Saguinus*, devido ao seu pequeno tamanho, baixo custo, facilidade de manuseio e prolificidade sendo capazes de produzir até quatro filhotes por ano (HAMPTON-JUNIOR *et al.*, 1966; EPPLE, 1970). No entanto, os primatas do Velho Mundo, em especial do gênero *Macaca*, ainda são amplamente utilizados em pesquisas oftálmicas comparativas (GIRARD *et al.*, 2011). Saguis do gênero *Callithrix* não estão em risco de extinção, reproduzem bem em cativeiro e são uma alternativa menos dispendiosa como modelos animais para doenças oculares humanas. Embora haja uma grande diferença de tamanho, saguis e seres humanos são filogeneticamente próximos (EPPLE, 1970). O Brasil detém a maior diversidade mundial em primatas, com um total de 133 espécies (CHIARELLO *et al.*, 2008). O sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), e o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) ocorrem originalmente na Região Nordeste do Brasil, do nordeste ao norte do Rio São Francisco e leste do Rio Parnaíba (AURICCHIO e GRANSTASU, 1995). Entretanto, ambas as espécies foram artificialmente introduzidos em diversas regiões do Brasil e atualmente podem ser encontradas em quase todo país. Esta fauna invasora representa perigo, pois competem por alimento com a fauna indígena e é considerada uma ameaça ao equilíbrio ecológico (RYLANDS e BERNARDES, 1991; PRYMACK e RODRIGUES, 2001).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando o estabelecimento dos valores fisiológicos de referência em primatas tais como o macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) (CLEARY e RYAN, 1979), o macaco-prego (*Cebus apella*) (MONTIANI-FERREIRA *et al.*, 2008), e o mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (MAITCHOUK e BEUERMAN, 2000). No entanto, estudos para o estabelecimento de valores de referência da produção lacrimal são escassos para a maioria dos pequenos primatas; isto pode ser justificado devido às pequenas dimensões dos seus olhos e a consequente dificuldade para efetuar as mensurações (BARABINO *et al.*, 2004). A produção lacrimal pode ser medida de várias formas, o teste lacrimal de Schirmer I (TL SI) é o mais comumente usado em seres humanos (STRUBBE e GELLAT, 1999). Animais domésticos tais como cães e gatos (SERRUYA *et al.*, 2009), cavalos (MARTS, *et al.*, 1977), porquinhos-da-índia (TROST *et al.*, 2001), furões (MONTIANI-FERREIRA, MATTOS *et al.*, 2006), chinchilas (LIMA *et al.*, 2010). Animais selvagens como capivaras e macaco-prego (MONTIANI-FERREIRA, MATTOS e RUSS, 2006; MONTIANI-FERREIRA *et al.*, 2008) entre outros. Outro método utilizado é o teste lacrimal do vermelho de fenol (TLVF). Os valores de referência para este teste foram descritos em seres humanos (HIDA *et al.*, 2005), cães (BROWN *et al.*, 1996), porquinhos-da-índia (TROST *et al.*, 2001), e especialmente em pequenos animais que apresentam reduzido comprimento da fenda palpebral horizontal como os psitacíformes (SAKAMOTO *et al.*, 1993).

Para melhorar a eficiência e a precisão dos diagnósticos oftálmicos em espécies de animais não domésticos, é essencial compreender a sua fisiologia normal e as características oculares. Não há nenhuma informação sobre a produção lacrimal em saguis (*Callithrix* sp.) e a literatura que aborda parâmetros oftálmicos em primatas do Novo Mundo é limitada. No entanto, a medição, da fração aquosa do filme lacrimal em todos os tipos de pacientes é um importante parâmetro clínico para diagnosticar as doenças em diferentes condições, tais como lacrimação excessiva ou a ceratoconjuntivite seca (BARABINO *et al.*, 2004). Assim, este estudo visa estabelecer valores de referência para a produção lacrimal em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), utilizando dois métodos bem conhecidos, o teste lacrimal do vermelho de fenol (TLVF), o teste lacrimal de Schirmer I modificado (TL SI_m) e propõe um método inovador para medir a produção lacrimal em animais com olhos muito pequenos, como os saguis. Além disso, estabelece valores de referência para o comprimento horizontal da fenda palpebral e a frequência de piscadas, pois estes parâmetros afetam diretamente a produção e a manutenção do filme lacrimal.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBIO e pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Os saguis-de-tufo-preto (*C. penicillata*), utilizados no experimento, totalizaram 19 animais, eram adultos jovens sexualmente maduros, (12 fêmeas e sete machos) foram capturados no Parque Barigui, em Curitiba, Paraná, Brasil (25°25'40" Sul; 49°16'23" Oeste), por meio de armadilhas, captura manual e redes. Os saguis Parque Barigui são animais invasores e a sua remoção é parte de um programa de restauração da vida selvagem desenvolvido pela Universidade Federal do Paraná em parceria com a Prefeitura Municipal de Curitiba. Todos os procedimentos que envolveram a utilização dos animais vivos foram conduzidos de acordo com as normas para uso de animais em pesquisas oftalmológicas da *ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*. Todos os saguis foram identificados com um transponder (AnimalTag; Korth, RFID, São Paulo, Brasil) implantado e que podia ser reconhecido pelo scanner apropriado.

Antes do experimento foi realizado exame físico para exclusão de animais que apresentassem sinais de doença ocular e/ou sistêmica e avaliação hematológica, bioquímica sérica, coproparasitológica, radiográfica e ultrassonográfica (ocular e abdominal), com o objetivo de amostrar somente animais hígidos. A realização dos testes oftálmicos foi executada por diferentes avaliadores, porém, para evitar uma discrepância inter-observadores, sempre o mesmo avaliador realizou um determinado teste, e fez a avaliação de todos os animais, na mesma ocasião.

A sequência de procedimentos realizados no estudo foi como se segue: (1) a medição do comprimento horizontal da fenda palpebral, utilizando um paquímetro, (2) mensuração da frequência de piscadas, (3) TLSIm; (4) TLFV, e (5) teste lacrimal da ponta de papel (TLPP).

Para a realização dos exames oftálmicos os saguis foram contidos manualmente de modo gentil. A contenção do animal foi praticada com a mão esquerda protegida por uma luva de couro, enquanto a mão direita do examinador estava livre para realizar os testes. O animal ficava com os membros torácicos pressionados contra o corpo, enquanto os membros pélvicos permaneciam livres. O examinador, mantinha em repouso a mão enluvada que segurava o sagui, apoiada em uma superfície da

mesa, e assim a mantinha por cerca de 2 min antes de começar a executar os testes. Esse tempo de espera foi importante para reduzir a interferência provocada pelo estresse sendo que os animais ficavam visivelmente mais calmos. Apenas um teste foi realizado a cada dia para reduzir o estresse e evitar potenciais interferências entre ensaios.

Os animais foram alojados no biotério do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Após o experimento, todos os indivíduos foram esterilizados cirurgicamente e transferidos para o Zoo de Curitiba onde permaneceram mantidos como animais do acervo expositivo.

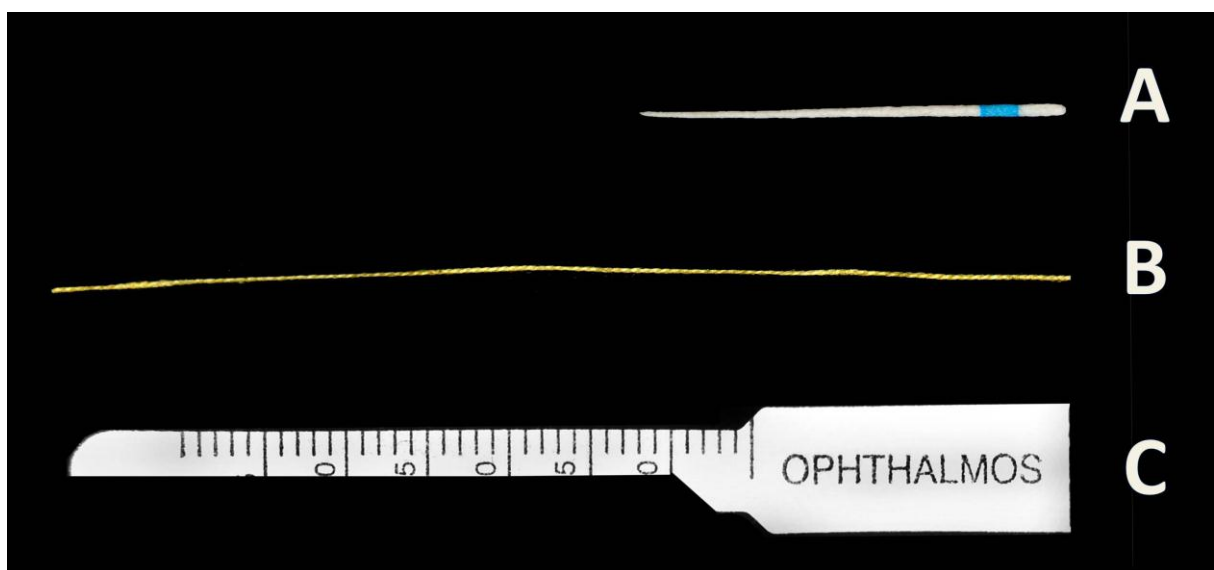


FIGURA 1 – DISPOSITIVOS UTILIZADOS NA MENSURAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DO FILME LACRIMAL EM SAGUIS (*Callithrix penicillata*). A – PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO. B – FIO DE BARBANTE DO TESTE LACRIMAL DO FENOL VERMELHO. C – FITA DO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO

Teste lacrimal de *Schirmer* I modificado

Foi utilizado o teste lacrimal de *Schirmer* (Ophthalmos, São Paulo, Brasil). Devido ao pequeno comprimento horizontal da fenda palpebral dos saguis, as tiras de papel absorvente foram cortadas longitudinalmente à metade (reduzindo a largura de 5 para 2,5 mm) (FIGURA 1), criando uma versão modificada do TLSI (TLSIm) como anteriormente descrito (SILVA e GALERA, 2004) para uso em cães neonatos de raças pequenas. Quando a marca de umidade na fita atingiu apenas a porção arredondada anterior ao entalhe inferior à marca zero, considerou-se resultado negativo (TROST *et al.*, 2001). Para a utilização do Teste de *Schirmer* I modificado, o sagui foi contido manualmente por um auxiliar enquanto o operador com uma pinça romba tencionava a

pálpebra inferior e inseria a fita de *Schirmer* modificada no fórnice conjuntival (FIGURA 2A).

Teste lacrimal do fenol vermelho

Os fios do TLFV (Zone-Quick®; Menicon Inc., Clovis, CA, EUA) são impregnados com vermelho de fenol, um indicador de pH, que muda de amarelo para vermelho quando absorve a lágrima que é ligeiramente alcalina. O procedimento foi realizado de forma semelhante ao TLSIm, com os saguis manualmente contidos, enquanto o operador gentilmente utilizava uma pinça de Adson-Brown para puxar para baixo a pálpebra inferior e inserir o fio do TLFV no fórnice conjuntival com outra pequena pinça (FIGURA 2B). O fio foi removido após 15 segundos. Devido ao limite de profundidade do fórnice conjuntival ser reduzido nestes animais, não foi possível instalar a porção dobrada de 3 mm. O fio padrão foi cortado ao meio, permitindo o uso de um único fio para ambos os olhos de um mesmo animal, inserindo-se a ponta do fio sem a dobra no fórnice conjuntival. Todo o comprimento da porção vermelha do fio, incluindo a porção proximal foi medido e registrado em milímetros.

Teste lacrimal com ponta de papel absorvente endodôntico padronizado

Pontas de papel absorvente endodôntico padronizado (Roeko Color tamanho 30; Langenau, Alemanha) foram utilizadas neste estudo. Estas pontas de papel são amplamente utilizadas em odontologia para procedimentos endodônticos, devido à sua alta capacidade de absorção. Apenas um avaliador foi necessário para medir a produção lacrimal com as pontas de papel. O sagui foi contido manualmente com uma mão e a ponta de papel foi inserida no fórnice conjuntival com a outra mão. A ponta de papel foi mantida no fórnice conjuntival por um período de um minuto (FIGURA 2C), após o que foi removida e a parte umedecida foi medida com o auxílio de uma régua graduada (FIGURA 3).

Comprimento horizontal da fenda palpebral

O comprimento horizontal da fenda palpebral foi medido utilizando um paquímetro de aço inoxidável com um display LCD e uma precisão de $\pm 0,02$ mm (Neiko Ferramentas; Klamath Falls, OR, EUA). Os animais foram manualmente contidos para medir a largura da fenda palpebral de ambos os olhos.

Frequência de piscar dos olhos

A frequência de piscar dos olhos foi medida com os animais contidos manualmente de modo gentil, reduzindo o estresse. A mensuração foi efetuada por um período de 5 min, sendo avaliado o número total de piscadas no período. A contagem foi realizada com o auxílio de um contador mecânico.

Análise estatística

Análises estatísticas descritivas e teste de normalidade de Shapiro-Wilk foram efetuados para a interpretação dos dados. O teste t não pareado foi utilizado para comparar dados obtidos nos olhos direitos e esquerdos e em machos e fêmeas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Foi utilizado o programa de análises estatísticas, descritiva e inferencial JMP (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA).



FIGURA 2 – TESTES OFTÁLMICOS REALIZADOS EM SAGUIS-DO-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) PARA MENSURAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DO FILME LACRIMAL. A: TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO. B: TESTE LACRIMAL DO FENOL VERMELHO. C: TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO

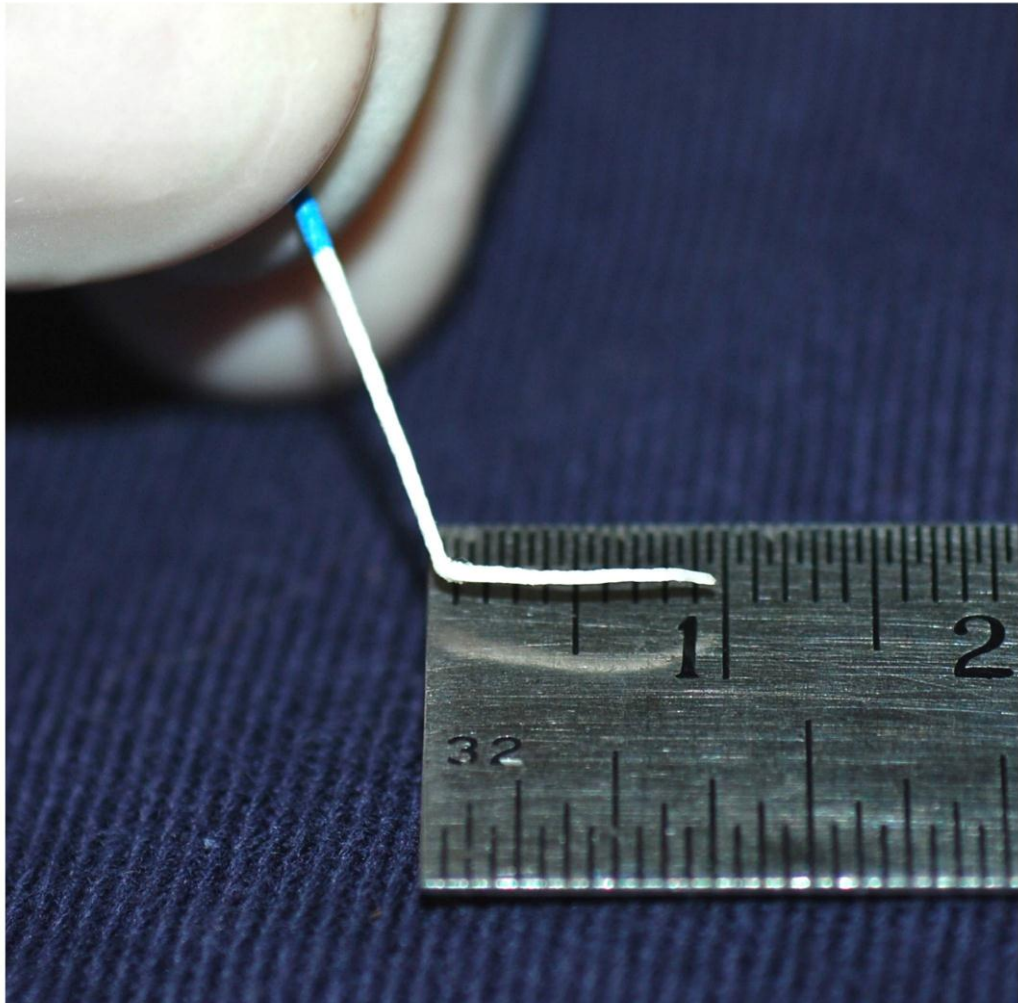


FIGURA 3 – FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DA FORMA UTILIZADA PARA MENSURAR A ABSORÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA NO TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL ABSORVENTE ENDODÔNTICO PADRONIZADO. A PORÇÃO UMEDECIDA DA PONTA DE PAPEL SE TORNA FLEXÍVEL COM A UMIDADE DA LÁGRIMA, E QUANDO COMPRIMIDA SE DOBRA NO PONTO EXTREMO DE UMEDECIMENTO, PROPICIANDO A LEITURA DA PORÇÃO UMEDECIDA EM UMA RÉGUA COM ESCALA MILIMÉTRICA

2.5 RESULTADOS

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk demonstrou que os erros dos dados foram distribuídos de modo normal. A estatística descritiva referente aos dados de comprimento horizontal da fenda palpebral, frequência de piscadas e dos testes de produção lacrimal (TSLIm, TLFV e TLPP) estão resumidos na TABELA 1.

Teste lacrimal de Schirmer I modificado

O teste lacrimal de *Schirmer I* modificado apresentou uma amplitude de 12 mm. Os valores variaram entre -5 a 7 mm/min (média $-0,46 \pm 3,41$ mm/min). O coeficiente de variação foi de -7,35.

A média dos olhos direitos foi de $-0,29 \pm 3,53$ mm/min. para os olhos esquerdos foi $-0,63 \pm 3,33$ mm/min. De acordo com o gênero, os resultados médios para o teste foram $-0,35 \pm 3,56$ mm/min. para fêmeas e $-0,75 \pm 3,08$ mm/min. para machos. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas com relação aos valores médios do teste ($P=0,66$) ou entre direito e esquerdo ($P = 0,66$).

Teste lacrimal de fenol vermelho

O teste lacrimal do fenol vermelho apresentou uma amplitude de 20 mm. Os valores variaram de quatro a 24 mm/15 segundos (média $13,27 \pm 5,41$ mm/15 segundos). O coeficiente de variação foi 0,41.

O valor médio do olho direito foi $13,40 \pm 4,95$ mm/15 segundos e do esquerdo foi $13,12 \pm 5,94$ mm/15 segundos. De acordo com o gênero, os valores médios foram $13,30 \pm 5,96$ mm /15 segundos para fêmeas e $13,21 \pm 4,35$ mm/15 s para machos. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas ($P = 0,96$) ou entre os olhos direitos e os esquerdos ($P = 0,88$).

Teste lacrimal da ponta de papel absorvente endodôntico padronizado

O teste lacrimal da ponta de papel apresentou uma amplitude de 19 mm. Os valores variaram de três a 22 mm / min (médio $9,32 \pm 3,09$ mm / min). O coeficiente de variação foi de 0,33 mm / min. O valor médio dos olhos direitos foi de $10 \pm 3,72$ mm / min e dos esquerdos foi $9,67 \pm 3,58$ mm / min. De acordo com o gênero, a valores médios foram de $9,64 \pm 2,98$ mm / min para o feminino e $10,21 \pm 4,73$ milímetros / minutos para os machos. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas ($P = 0,63$) ou entre olhos direitos e esquerdos ($P = 0,77$).

Comprimento horizontal da fenda palpebral

O comprimento horizontal da fenda palpebral apresentou uma amplitude de 2,98 mm, isto é, variou 6,66-9,64 mm, com média de $7,83 \pm 0,72$ mm.

O valor médio nos olhos direitos foi $7,88 \pm 0,71$ mm e nos olhos esquerdos foi $7,77 \pm 0,74$ mm. De acordo com o sexo, os valores médios foram $7,74 \pm 0,73$ mm, para

fêmeas e $7,79 \pm 0,72$ mm para machos. Não houve diferenças significativas entre machos e fêmeas ($P = 0,43$) ou entre olhos direitos e olhos esquerdos ($P = 0,56$).

Frequência de piscadas

A frequência de piscadas apresentou uma amplitude 17. Os valores variaram de 13 a 30 com uma média de $20,27 \pm 5,92$ /5 min.

De acordo com o gênero, os valores médios foram $21,2 \pm 6,54$ /5 min. para fêmeas e $19,5 \pm 5,86$ /5 min. para machos. Não houve diferenças significativas entre os machos e as fêmeas ($P = 0,66$).

TABELA 1 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRÊS TESTES DISTINTOS UTILIZADOS PARA A MENSURAÇÃO DA PORÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA DE SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*)

Parâmetros	Média	Mediana	DesvPad*	CV**
Teste lacrimal de Schirmer I modificado (mm/min.)	-0,46	-1	3,41	-7,35
Teste lacrimal do Fenol Vermelho (mm/15 seg.)	13,27	13	5,41	0,41
Teste lacrimal da ponta de papel (mm/min.)	9,32	9	3,09	0,33
Comprimento horizontal da fenda pálpebra	7,83	7,77	0,72	0,09
Frequência de piscadas em 5 minutos	20,27	22	5,92	0,29

*DesvPad = Desvio padrão

**CV = coeficiente de variação

2.6 DISCUSSÃO

Não há disponibilidade valores de referência publicados que estabeleçam os valores da fase aquosa da lagrima em saguis. No entanto, a literatura descreve os valores para outros primatas tais como macaco-rhesus (*M. mulatta*), média 15,1 mm / min. (6-24 mm /min.) (CLEARY e RYAN, 1979), para macaco-prego (*C. apella*) $14,9 \pm 5,1$ mm /min. (MONTIANI-FERREIRA *et al.*, 2008), para mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) $16,9 \pm 1,2$ mm / 5 min. (MAITCHOUK e BEUERMAN, 2000), e para seres humanos $10,30 \pm 11,55$ mm / 5 min. (STRUBBE e GELLAT, 1999). Resultados descritos na literatura para estes primatas mostraram valores mais elevados que os encontrados em saguis neste estudo. Os primatas relatados, no entanto, são maiores do que saguis e tem uma fenda palpebral muito mais ampla (> 5 mm), o que permite que o TLSI padrão a seja executado. Nos saguis o exame para ser executado necessita de modificações e foi efetuado com tiras cortadas.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para mensurar a produção lacrimal em espécies com olhos pequenos (HOLDT *et al.*, 2006). FUJIHARA *et al.* (2001) utilizaram tiras do TLSIm de um milímetro de largura por um minuto em ratos, enquanto HOFFMAN *et al.* (1984) utilizaram tiras de 0,5 milímetros de largura por dois minutos. Os resultados obtidos por estes autores são baixos (cerca de 2 mm). No entanto, estes valores não são comparáveis com os obtidos para a espécie estudada em nossa investigação, porque os métodos diferem de forma significativa. O porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), embora filogeneticamente distante do sagui, apresentou valores muito baixos ($0,36 \pm 1,09$ mm/min.) (TROST *et al.*, 2001). No entanto, este valor foi obtido usando tiras padrão de cinco milímetros de largura do teste de Schirmer. O porquinho-da-índia apresenta algumas particularidades específicas, tais como uma baixa frequência média de piscada (3,24/10 min.), em comparação com outros animais. No entanto, a sua produção de lágrima foi maior que a encontrada nos saguis, embora nestes a frequência média de piscar os olhos seja consideravelmente maior (40,54/10 min.). Vale ressaltar que foi impossível medir a frequência de piscadas com os animais livres na gaiola. Saguis são naturalmente agitados e movem-se constantemente e até mesmo tentam se esconder, particularmente ao serem observados por alguém de fora da gaiola. Esta dificuldade foi superada por meio da avaliação da frequência de piscadas contendo gentilmente os animais. Com o andamento do experimento, os animais tornaram-se cada vez mais adaptados aos procedimentos de imobilização física, pois foi sempre realizada em um ambiente tranquilo, com a mesma pessoa realizando a restrição física, os testes clínicos, e as observações sobre cada animal. O procedimento tornou-se uma "rotina" e os animais tornaram-se mais calmos, tolerando a maioria dos procedimentos, com uma única exceção, o TLSIm (discutido mais abaixo). Assim, os animais estavam aparentemente muito calmos e relaxados nos procedimentos de contenção para a contagem de piscadas. Acreditamos que a aquisição dos dados foi minimamente perturbada pela contenção física.

A profundidade do fórnice não foi mensurada nos saguis estudados ou nos porquinhos-da-índia (TROST *et al.*, 2001). No entanto, a nossa impressão subjetiva é de que o fórnice conjuntival dos saguis é menor do que o dos porquinhos-da-índia. É possível imaginar que fórnices mais profundos acumulem mais lágrima do que superficiais, de modo que isso pode explicar parcialmente os valores mais baixos encontrados nos saguis. Além disso, a influência da profundidade do fórnice

conjuntival no TLSI ainda não foi investigada. Assim, estudos adicionais poderiam ser realizados para responder a esta questão no futuro. Identificamos que mesmo com o comprimento horizontal da fenda palpebral de 7,83 milímetros, observado nos saguis-de-tufo-preto, o TLSI padrão, usando o modelo comercial de tiras com 5 milímetros de largura, não é possível realizar porque a pálpebra é constituída por tecido de pouca elasticidade, exigindo a redução da fita para a metade da largura. Mesmo com a modificação reduzindo a largura da tira do TLSIm, a inserção da tira fórnice conjuntival foi ainda difícil.

Também se questiona a precisão do teste pela falta de padronização, pois a tira do TLSIm é produzida artesanalmente não sendo portanto possível a padronização. Outro fator de dificuldade foi a necessidade de realizar o teste com duas pessoas, uma pessoa para conter o animal e outra para realizar o teste, pois há necessidade puxar a pálpebra para facilitar a inserção da tira dentro fórnice conjuntival.

No TLSIm, consideramos importante medir precisamente e avaliar os valores de produção lacrimal inferiores a linha graduada zero, levando-se em conta os valores negativos, pois caso os mesmos tivessem sido considerados zero, o valor médio obtido para o TLSIm teria sido registrado com valor superior ao encontrado, fato já evidenciado por TROST *et al.*, (2001). É importante também salientar que, devido ao pequeno tamanho dos olhos dos saguis, durante o procedimento da inserção da tira modificada no fórnice conjuntival não foi possível evitar tocar a superfície da córnea, o que pode ter causado irritação e possivelmente algum artefato ampliando a produção lacrimal.

O TLVF é usado em situações em que a produção lacrimal é reduzida ou em animais com baixa produção basal de lágrima, tais como o porquinho-da-índia (TROST *et al.*, 2001), é adequado por ser relativamente fácil e conveniente e ter um tempo de avaliação mais curto. Apesar da conveniência relatada para realizar o teste em outros animais, em nosso estudo foram evidenciadas algumas dificuldades. Houve necessidade de duas pessoas para conter adequadamente o sagui e introduzir a ponta do fio no fórnice conjuntival, e também de utilizar-se uma pinça para tencionar a pálpebra inferior enquanto como outra pinça se insere o fio. Devido ao pequeno tamanho das pálpebras destes animais, e a flexibilidade relativa do fio, a execução do procedimento foi um desafio.

As pontas de papel absorventes endodônticas padronizadas (American National Standards Institute e American Dental Association ANSI/ADA Especificação n. 73) são

confeccionadas com papel de Manila (*Musa textillis*) ou bananeira. Estas pontas de papel são disponíveis comercialmente e são regularmente utilizadas em odontologia, principalmente para procedimentos endodônticos, por causa das suas propriedades altamente absorventes para promover a secagem após irrigação do canal pulpar, o transporte de medicamentos como antissépticos e desinfetantes (WIGGS e LOBPRISE, 1997), e até mesmo na coleta de amostras para cultura microbiológica (HARTROTH *et al.*, 1999), são disponibilizados pelos fabricantes em embalagens estéreis. As pontas de papel têm uma forma cônica e várias marcas são disponíveis no comércio. O comprimento padrão das pontas de papel é de 28 mm. As pontas de papel endodônticas são disponíveis em dimensões de 0,15 até 0,80 mm de diâmetro, em intervalos que variam em 0,05 mm. As pontas de papel absorvente padronizado Roeko Color número 30 apresentam a extremidade medindo 0,3 mm de diâmetro e foram escolhidas devido a apresentar o melhor desempenho observado em um estudo anterior entre doze marcas similares quanto a capacidade de absorção (PUMAROLA-SUNÉ *et al.*, 1998). A avaliação da produção lacrimal utilizando as pontas de papel foi uma alternativa prática, mesmo sem o auxílio de uma segunda pessoa para manipular as pálpebras. A ponta de papel apresenta certa rigidez, quando comparada com a fita do TLSI, isto permitiu que uma única pessoa fosse capaz de conter o paciente com facilidade, e instalar a ponta de papel no fórnice conjuntival sem tocar outras estruturas e ainda efetuar a leitura do resultado do teste. A espessura da ponta de papel é compatível com o comprimento horizontal da fenda palpebral nesta espécie e provavelmente em muitas outras espécies de pequenos animais selvagens ou exóticos. Embora a ponta do papel não seja graduada, foi fácil mensurar, pois a porção umedecida se torna flexível e se dobra no ponto extremo quando pressionada contra uma superfície dura (FIGURA 3), tal como uma régua, permitindo a leitura em milímetros. Além disso, dados obtidos com TLPP apresentaram menor variação (desvio padrão e coeficiente de variação) (TABELA 1), quanto comparados com o TLSIm e o TLFV.

Este estudo fornece valores de referência para a produção lacrimal em saguis obtidos a partir dos testes convencionais lacrimais TLSIm e TLFV. Além disso, fornece informação anatômica e fisiológica sobre a frequência de piscadas e comprimento horizontal da fenda palpebral. Acreditamos que a informação é valiosa para pesquisadores e clínicos, especialmente para diagnosticar subtis alterações patológicas do filme lacrimal na espécie. O TLPP é potencialmente aplicável em

pequenos mamíferos, particularmente nos selvagens e nos animais de estimação não convencionais com olhos pequenos, como rato, camundongo, hamster, gerbilo, ouriço, *sugar glider* ou petauro-do-açúcar, porquinhos-da-índia e também para pequenas aves, anfíbios e répteis. Pelo menos em saguis, o TLPP certamente provou ser mais prático do que os outros testes convencionais. Possivelmente no futuro, quando quando as pontas de papel sejam produzidas comercialmente para esta finalidade, a adição do vermelho de fenol poderia tornar este teste ainda mais prático e amigável. Entretanto, para consolidar o uso veterinário em geral, maiores estudos do TLPP serão necessários para o estabelecimento de valores de referência em outras espécies.

2.7 REFERÊNCIAS

AURICCHIO P, GRANSTASU R. **Primatas do Brasil**, 1st edn. (ed. Terra Brasilis) Terra Brasilis, São Paulo, SP, Brazil, 1995: 352.

BARABINO S, CHEN W, DANA MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. **Experimental Eye Research** 2004; 79: 613–621.

BENIRSCHKE K, RICHART R. Spontaneous acute toxoplasmosis in a marmoset monkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 1960; 9: 269–273.

BROWN MH, GALLAND JC, DAVIDSON HJ *et al.* The phenol red thread tear test in dogs. **Veterinary Comparative Ophthalmology** 1996; 6: 274–277.

CHIARELLO AG, AGUIAR LMS, CERQUEIRA R, *et al.* Mamíferos ameaçados de extinção do Brasil. In: **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. (eds Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP) Ministério do Meio Ambiente – Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2008; 681–874.

CLEARY PE, RYAN SJ. Histology of wound, vitreous, and retina in: experimental posterior penetrating eye injury in the rhesus monkey. **American Journal of Ophthalmology** 1979; 88: 221–231.

EPPLÉ G. Maintenance breeding and development of marmoset monkeys in captivity. **Folia Primatologica** 1970; 12: 56–76.

FUJIHARA T, MURAKAMI T, FUJITA H *et al.* Improvement of corneal barrier function by the P2Y2 agonist INS365 in a rat dry eye model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 2001; 42: 96–100.

GIRARD MJ, SUH JK, BOTTLANG M *et al.* Biomechanical changes in the sclera of monkey eyes exposed to chronic IOP elevations. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 2011; 52: 5656–5669.

HAMPTON-JUNIOR JK, HAMPTON SH, LANDWEHR BT. Observations on a successful breeding colony of the marmoset (*Oedipomidas oedipus*). **Folia Primatologica** 1966; 4: 265–287.

HARTROTH B, SEYFAHRT I, CONRADS G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. **Oral Microbiology Immunology** 1999; 14: 326–330.

HIDA RY, NISHIWAKI-DANTAS MC, TSUBOTA K. Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia** 2005; 68: 433–437.

HOFFMAN RW, ALSPAUGH MA, WAGGIE KS *et al.* Sjögren's syndrome in MRL/n mice. **Arthritis and Rheumatism** 1984; 27: 157–165.

HOLDT E, ROSENTHAL K, SHOFER FS. The phenol red thread tear test in large Psittaciformes. **Veterinary Ophthalmology** 2006; 9: 109–113.

JAAX GP, GRAHAM RR, ROZMIAREK H. The Schirmer tear test in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Laboratory Animal Science** 1984; 34: 293–294.

LIMA L, MONTIANI-FERREIRA F, TRAMONTIN MH, SANTOS LL, MACHADO M, LANGE RR, RUSS HHA. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. **Veterinary Ophthalmology** 2010; 13: 14–25.

MAITCHOUK DY, BEUERMAN RW, OHTA T. *et al.* Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. **Archives of Ophthalmology** 2000; 118: 246–252.

MARTS BS, BRYAN GM, PRIETO DJ. Schirmer tear test measurements and lysozyme concentration of equine tears. **Journal of Equine Medical Surgery** 1977; 1: 427.

MONTIANI-FERREIRA F, MATTOS BC, RUSS HH. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). **Veterinary Ophthalmology** 2006; 9: 209–213.

MONTIANI-FERREIRA F, SHAW G, MATTOS BC, RUSS HHA, VILANI RGDC. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Veterinary Ophthalmology** 2008; 11: 197–201.

MONTIANI-FERREIRA F, TRUPPEL J, TRAMONTIN MH *et al.* The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. **Veterinary Ophthalmology** 2008; 11: 386–394.

PRIMACK RB, RODRIGUES E. Ameaça á diversidade biológica. In: **Biologia da conservação** 1st edn. (eds Primack RB, Rodrigues E) Vida, Londrina, PR, Brasil, 2001; 69–133.

PUMAROLA-SUNÉ J, SOLA-VICENS L, SENTIS-VILALTA J ET AL. Absorbancy properties of different brands of standardized endodontic paper points. **Journal of Endodontics** 1998; 24: 12.

RYLANDS AB, BERNARDES ATA. **Primatologia no Brasil**, 3rd edn. (ed. Fundação Biodiversitas) Fundação Biodiversitas, Juiz de Fora, MG, Brazil, 1991; 352.

SAKAMOTO R, BENNETT ES, HENGY VA. The phenol red thread tear test: a cross-cultural study. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 1993; 34: 3510–3514.

SERRUYA LG, NOGUEIRA DC, HIDA RY. Comparação entre os testes de Schirmer em olhos abertos e fechados em indivíduos normais. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia** 2009; 72: 65–67.

SILVA EG, GALERA PD. Evaluation of tear formation during neonatal period in small breed dogs, using the Schirmer tear test: STT & STT2. Annual Meeting of the *American College of Veterinarian Ophthalmologists*, Washington, DC. **Veterinary Ophthalmology** 2004; 7: 437–453.

STRUBBE DT, GELATT KK. Chapter 11 ophthalmologic examination and diagnostic procedures, 427–466. In: **Veterinary Ophthalmology**, 3rd edn. (ed. Gelatt KK) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999; 1544.

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** 2001; 10: 143–146.

WIGGS RB, LOBPRISE HB. Basic endodontic therapy. In: **Veterinary Dentistry: Principles and Practice**. (Eds Wiggs RB, Lobprise HB) Lippincott-Raven, Philadelphia, NY, 1997; 280–324.

3 VALORES DE REFERÊNCIA DA FRAÇÃO AQUOSA DO FILME LACRIMAL, MENSURADOS PELO TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL (TLPP), EM ANIMAIS SELVAGENS E DE LABORATÓRIO

Reference values for the production of the aqueous fraction of the tear film measured by the standardized endodontic absorbent paper point test in different exotic and laboratory animal species

3.1 RESUMO

Foi mensurada a porção aquosa do filme lacrimal e o comprimento horizontal da fenda palpebral (CHFP) nos animais selvagens canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), curio (*Sporophila angolensis*), tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*), e nos animais de laboratório rato Wistar (*Rattus norvegicus*) e camundongo Swiss Webster (*Mus musculus*). Estas espécies possuem olhos pequenos tornando difícil o uso do teste lacrimal de Schirmer. Foi efetuada a mensuração da fração aquosa do filme lacrimal usando pontas de papel absorvente endodôntico padronizado (TLPP). Os animais foram submetidos à contenção manual. Os seguintes resultados foram obtidos: canários-da-terra (n=42), CHFP (4,46 ± 0,09 mm) e TLPP (5,10 ± 0,26 mm), curiós (n=38), CHFP (4,77 ± 0,05 mm) e TLPP (4,11 ± 0,34 mm), tartarugas-de-orelha-vermelha (n=56), CHFP (8,59 ± 0,08 mm) e TLPP (8,79 ± 0,38 mm), ratos (n=60), CHFP (6,45 ± 0,09 mm) e TLPP (6,18 ± 2,06 mm), camundongos (n=22), CHFP (3,59 ± 0,27 mm) e TLPP (4,39 ± 1,45 mm).

Palavras-chave: *Sicalis flaveola*. *Sporophila angolensis*. *Trachemys scripta elegans*. *Rattus norvegicus*. *Mus musculus*. Teste lacrimal da ponta de papel.

3.2 ABSTRACT

The aqueous fraction of the tear and the horizontal palpebral fissure length (HPFL) were measured in exotic and laboratory animals, specifically saffron finches (*Sicalis flaveola*), chestnut-bellied seed-finches (*Sporophila angolensis*), red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*), rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). These species possess small eyes making it difficult to perform the typical Schirmer tear test. Measurement of the aqueous fraction of the tear was performed using the standardized endodontic absorbent paper point tear test (PPTT), accomplished with manual restraint by a single operator. The following results were obtained: Saffron finches (n = 42) HPFL (4.46 ± 0.09 mm) and PPTT (5.10 ± 0.26 mm); Chestnut-bellied seed-finches (n = 38) HPFL (4.77 ± 0.05 mm) and PPTT (4.11 ± 0.34 mm); Red-eared sliders (n = 56) HPFL (8.59 ± 0.08 mm) and PPTT (8.79 ± 0.38 mm); Rats (n = 60) HPFL (6.45 ± 0.09 mm) and PTT (6.18 ± 2.06 mm); Mice (n = 22) HPFL (3.59 ± 0.27 mm) and PPTT (4.39 ± 1.45 mm).

Keywords: *Sicalis flaveola*. *Sporophila angolensis*. *Trachemys scripta elegans*. *Rattus norvegicus*. *Mus musculus*. Standardized endodontic absorbent paper points tear test.

3.3 INTRODUÇÃO

A fração aquosa da lágrima é um importante parâmetro fisiológico que compreende o exame oftálmico das espécies animais. São escassas as fontes bibliográficas de valores de referência dos parâmetros fisiológicos oculares em animais selvagens apesar da grande diversidade de espécies. Portanto é importante o estabelecimento de valores de referência para os testes rotineiramente utilizados em animais domésticos (MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2007). Em muitas espécies o reduzido tamanho do bulbo ocular não permite o uso das técnicas convencionais de mensuração da fração aquosa da lágrima, existem técnicas alternativas, porém não há valores de referência padronizados. Isto é verdadeiro até mesmo para espécies bem conhecidas como os roedores de laboratório tal qual o camundongo (BARABINO *et al.*, 2004). O teste lacrimal de Schirmer (TLS), originalmente desenvolvido para uso em seres humanos (SCHIRMER, 1903; STRUBBE e GELATT, 1999), é também o método mais utilizado para mensuração da fração aquosa lacrimal em animais (MARTS *et al.*, 1977; KASWAN, 1989; TROST *et al.*, 2001). O TLS utiliza uma fita padronizada de papel absorvente com a largura de 0,5 cm. Em seres humanos a leitura do TLS originalmente foi originalmente padronizada em cinco minutos. Visando a redução do desconforto e ganhar tempo, NELSON (1982), propôs reduzir o tempo de avaliação de cinco minutos para um minuto. Em animais, o tempo também foi reduzido para um minuto, visando facilitar o manejo e diminuir o estresse (STRUBBE e GELATT, 1999). O TLS não é aplicável em animais muito pequenos nos quais o comprimento horizontal da fenda palpebral (CHFP), apresenta dimensões próximas ou inferiores à largura padronizada da fita (0,5 cm). Visando contornar estas dificuldades, técnicas alternativas têm sido propostas por diversos autores, entre estas, o corte longitudinal da fita de Schirmer em diferentes larguras e também a redução do tempo de exposição (FUJIHARA *et al.*, 2001; HOFFMAN *et al.* 1988; MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2007). Estas variações de métodos impossibilitam a comparação dos resultados (BARABINO *et al.*, 2004). Alternativa possível é o teste lacrimal do fenol vermelho, método comercial que utiliza um fio de algodão embebido

em fenol vermelho que em contato com a lágrima naturalmente alcalina muda da cor amarela para a vermelha, sinalizando a extensão do fio banhada pela fase aquosa da lágrima. Usualmente é utilizado com o auxílio de uma pinça para tencionar a pálpebra inferior e inserir o fio no fórnice conjuntival por um período de quinze segundos. Apesar da falta de valores de referência disponíveis, o teste do vermelho de fenol pode ser utilizado em animais experimentais modelos de olho seco, tais como camundongos e ratos, pois as dimensões reduzidas da espessura do fio de algodão, quando comparado com a fita de papel do teste de Schirmer permite a aplicação em animais com olhos pequenos (BARABINO, 2004). O TLPP utiliza cones ou pontas de papéis estéreis, originalmente desenvolvidos para endodontia. São cones padronizados com diâmetro distal de 0,30 mm (PUMAROLA-SUNÉ *et al.*, 1998); que permitem a inserção no fórnice palpebral mesmo nas menores espécies animais de interesse do oftalmologista veterinário. Foi inicialmente proposto por LANGE *et al.*, (2012), como alternativa para contornar as dificuldades encontradas na mensuração da fração aquosa da lágrima em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*). O presente artigo estabelece valores de referência do TLPP para as aves, curió – *Sporophila angolensis* e canário-da-terra – *Sicalis flaveola*; para o réptil tartaruga-de-orelha-vermelha – *Trachemys scripta elegans*; para os animais de laboratório, camundongo – *Mus musculus* e rato – *Rattus norvegicus*; assim como define o CHFP para estas espécies.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento aqui relatado foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

As mensurações lacrimais foram efetuadas em recintos fechados sem aquecimento, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram aferidas por meio de um termo-higrômetro digital (Mod. 30.5000.02, TFA Technology HK Ltda. Hong Kong/China). A umidade relativa do ar foi mantida em 78% e a temperatura ambiente a 20,9° C para canários-da-terra; 81% de umidade e 19,5° C para curiós; 82% de umidade e 19,8° C para as tartarugas-de-orelhas-vermelhas; 90% de umidade e 20° C para ratos e 86% de umidade e 18,2° C para camundongos.

Os canários-da-terra (*Sicalis flaveola*), os curiós (*Sporophila angolensis*) assim como as tartarugas-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*), foram

disponibilizados pelo CETAS – Centro de Triagem de Animais Selvagens da PUC/IBAMA, localizado em Tijucas do Sul/PR. Os ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem *Wistar*, e os camundongos (*Mus musculus*) linhagem *Swiss Webster*, foram disponibilizados pelo Zoológico de Curitiba. Aspectos gerais dos animais avaliados podem ser observados na FIGURA 1. O número de animais avaliados foi: canários-da-terra (N=21) sendo dez machos, sete fêmeas e quatro indeterminados; curiós (N=19), dez machos e nove fêmeas; tartaruga-de-orelha-vermelha (N=28), dez machos e oito fêmeas; ratos (N=30), somente fêmeas; e camundongos (N=22), dezoito machos e três fêmeas.

Para a mensuração do CHFP, foi utilizado um paquímetro digital de aço inoxidável com visor LCD (PD-150, 0-150mm, precisão: 0,01mm, Vonder, Curitiba/PR, Brasil).

Visando a mensuração da fração aquosa da lágrima o método proposto por LANGE *et al.* (2012) foi adotado. Foi utilizada apenas contenção física para imobilizar o animal, uma ponta de papel absorvente padronizada foi inserida no fórnice conjuntival da pálpebra inferior do olho direito e após 20 segundos outra ponta de papel foi inserida no fórnice do olho esquerdo. Ambas as pontas foram retiradas após permanecerem por um minuto no respectivo fórnice conjuntival. A porção umedecida foi mensurada por meio de uma régua com escala milimétrica. O comprimento da porção umedecida da ponta de papel pode ser facilmente identificado pela mudança de cor e ou pela flexão que sofre ao ser pressionado contra uma superfície rígida promovendo a dobra no ponto extremo de umedecimento (LANGE, 2012).

A ponta de papel absorvente utilizada foi (Roeko Color N° 30, Langenau, Germany) (FIGURA 2), com extremidade de 0.30 mm de diâmetro. Esta marca específica foi escolhida, pois um teste comparativo com outras doze marcas demonstrou melhor qualidade de absorção e menor desvio padrão, indicando a melhor padronização e controle de qualidade durante a produção industrial (PUMAROLA-SUNÉ *et al.*, 1998).

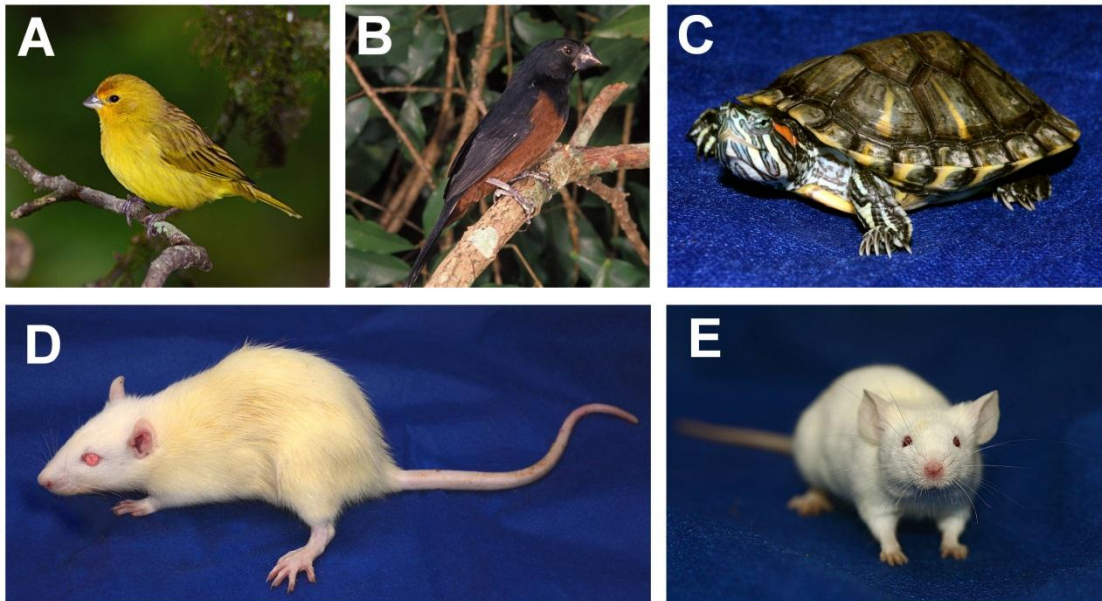


FIGURA 1 – IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS ESPÉCIES AVALIADAS NO EXPERIMENTO, (A) CANÁRIO-DA-TERRA (*SICALIS FLAVEOLA*) ♂; (B) CURIÓ – (*Sporophila angolensis*) ♂ (FOTO CEDIDA POR ZIG KOCH); (C) TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA (*Trachemys scripta ELEGANS*); (D) RATO (*Rattus norvegicus*); (E) CAMUNDONGO (*Mus musculus*).

Os canários-da-terra, assim como os curiós, foram retirados das gaiolas onde estavam alojados por meio de captura manual, e com cuidado foram contidos manualmente para o procedimento do TLPP. Um único operador, utilizando uma das mãos manteve a ave imobilizada enquanto com a outra mão inseria a ponta de papel no fórnice conjuntival de cada um dos olhos.

O manejo das tartarugas-de-orelha-vermelha foi executado da seguinte maneira: os animais foram retirados do tanque d'água onde se encontravam alojados no CETAS, duas horas antes da mensuração. Ao serem retirados da água foram secados com toalhas e instalados em uma caixa de plástico onde permaneceram fora da água até o momento do teste lacrimal. Para a mensuração do TLPP e do CHFP foram contidos manualmente e a cabeça foi cuidadosamente imobilizada. Os animais foram manipulados gentilmente, tomando cuidado para que não houvesse desconforto excessivo ou compressão exagerada.

Para o procedimento do TLPP e mensuração do CHFP nos ratos, uma contenção manual cuidadosa foi efetuada, segurando dorsalmente o animal pela região cervical com os dedos indicador e polegar, apoiando com a mesma mão e os demais dedos o corpo do animal, evitando assim o acesso dos membros torácicos do rato aos seus olhos, impedindo desta maneira que os animais retirassem com a mão a ponta de papel.

Os camundongos foram cuidadosamente contidos pelas orelhas, ambas mantidas entre os dedos: indicador e polegar de uma das mãos do operador, enquanto com a outra se procedia a colocação das pontas de papel nos fórnices conjuntivais e a mensuração do CPFH.

Aspectos da mensuração lacrimal com o TLPP das espécies avaliadas podem ser vistos na FIGURA 2.

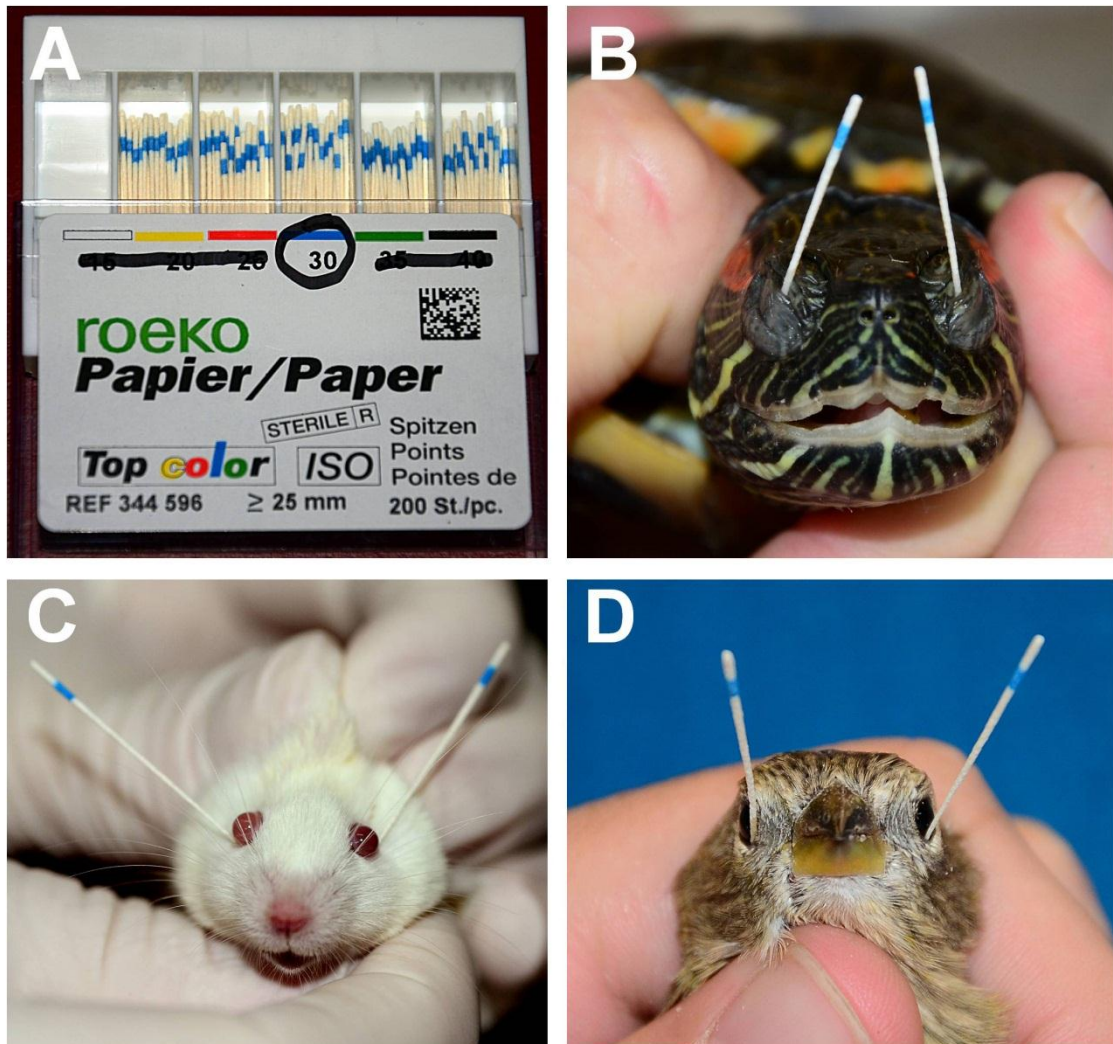


FIGURA 2 – (A) ASPECTO DA EMBALAGEM COMERCIAL DOS CONES OU PONTAS DE PAPEL MARCA ROEKO COLOR DA SÉRIE 15 A 40, SENDO QUE FORAM RETIRADOS OS CONES DAS DEMAIS NUMERAÇÕES E ADICIONADOS EM TODOS OS COMPARTIMENTOS, AS PONTAS DE PAPEL NÚMERO 30; TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL (TLPP) REALIZADO EM AMBOS OS OLHOS SIMULTANEAMENTE: (B) TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA (*Trachemys scripta elegans*), (C) CAMUNDONGO (*Mus musculus*) (D) CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*) – INDIVÍDUO IMATURO.

Análise estatística

Os dados obtidos na presente estudo foram submetidos à análise estatística descritiva. Inicialmente foi efetuado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Após este procedimento, os testes-*t* não pareados foram aplicados para comparar a diferença significativa entre dois grupos independentes quanto aos valores numéricos contínuos do TLPP em centímetros. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Foi utilizado o programa JMP (SAS Institute, Inc., Cary NC, USA) para as análises estatísticas: descritiva e inferencial.

3.5 RESULTADOS

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk demonstrou que os dados apresentaram distribuição normal de erros. A estatística descritiva do CHFP e da mensuração da fração aquosa da lágrima (TLPP) estão resumidas na TABELA 1.

TABELA 1 – RESULTADOS MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO, OBTIDOS NA MENSURAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA PELO TESTE LACRIMAL DAS PONTAS DE PAPEL (TLPP), VALORES DE 95% DE INTERVALO DE CONFIANÇA, COMPRIMENTO HORIZONTAL DA FENDA PALPEBRAL (CHFP); PESO CORPORAL; UMIDADE RELATIVA DO AR E TEMPERATURA AMBIENTE OBTIDOS EM CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*), CURIÓ (*Sporophila angolensis*), TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA (*Trachemys scripta elegans*), RATO (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar E CAMUNDONGO (*Mus musculus*) linhagem Swiss Webster.

Espécie	TLPP (mm/min.)	95% intervalo de confiança (mm/min.)	CHFP (mm/min.)	Peso (g)	Umid. rel. ar (%)	Temp. amb. (°C)
<i>Sicalis flaveola</i>	5,10 ± 0,26	4,59 – 5,61	4,46 ± 0,09	20,00 ± 0,10	78	20,09
<i>Sporophila angolensis</i>	4,11 ± 0,34	3,44 – 4,78	4,77 ± 0,05	14,00 ± 0,10	81	19,50
<i>Trachemys s. elegans</i>	8,79 ± 0,38	8,05 – 9,53	8,59 ± 0,08	663,50 ± 201,68	80	19,30
<i>Rattus norvegicus</i>	6,18 ± 2,06	2,14 – 10,22	6,45 ± 0,09	151,20 ± 68,89	90	22,00
<i>Mus musculus</i>	4,39 ± 1,45	1,55 – 7,23	3,59 ± 0,27	30,45 ± 5,69	78	19,50

Para todas as espécies avaliadas, não foram encontradas diferenças significativas comparando os resultados obtidos para o TLPP e o CHFP entre machos e fêmeas ou entre os olhos direitos e esquerdos ($P > 0,05$).

3.6 DISCUSSÃO

O TLPP foi possível e facilmente executado em todas as espécies, mesmo as com menores dimensões oculares como os camundongos e os canários-da-terra. Tanto nas aves testadas quanto nos répteis e mamíferos, o procedimento de contenção e de inserção das pontas de papel no fórnice conjuntival das pálpebras inferiores pôde ser praticado por um único operador. Adicionalmente, o procedimento de mensuração da fração aquosa da lágrima pelo método do TLPP implicou em curto período de contenção e imobilização e mínimo desconforto para todas as espécies avaliadas, não sendo observadas reações adversas atribuíveis ao estresse.

Foi possível aplicar o TLPP em ambos os olhos simultaneamente, utilizando uma defasagem de tempo de 15 a 30 segundos entre a inserção da ponta de papel em um fórnice conjuntival e no contralateral. Esta prática permitiu a redução do tempo de contenção necessária para a avaliação bilateral e conseqüentemente a diminuição do tempo total de contenção reduzindo assim o estresse.

Dentre as cinco espécies de animais avaliados pelo TLPP as aves ofereceram maior facilidade de manejo. A terceira pálpebra, muito móvel, não promoveu a movimentação das pontas de papel inseridas no fórnice palpebral. Por outro lado, nas aves a fita do TLSI é frequentemente retirada do fórnice conjuntival pelo movimento da terceira pálpebra. Apesar das tartarugas-de-orelha-vermelha, necessitarem de contenção adequada para a exposição e imobilização da cabeça, o uso do TLPP foi muito prático. Os camundongos foram os animais mais difíceis de manejar e de proceder à mensuração lacrimal pelo método do TLPP. A contenção ofereceu dificuldades, decorrente do pequeno tamanho corporal e da grande agilidade. Na maior parte das vezes os camundongos reagiram agressivamente tentando morder os dedos do operador. Os membros torácicos necessitaram ser imobilizados, pois em caso contrário os animais imediatamente retiravam as pontas de papel inseridas nos seus fórnices palpebrais, utilizando as mãos com muita eficiência e habilidade. No caso dos ratos, sugere-se a mensuração individual de cada olho, pois embora a contenção não tenha oferecido dificuldades, quando se mensuravam simultaneamente os dois olhos pelo TLPP, frequentemente os animais agitavam a cabeça provocando a saída das pontas de papel dos fórnices.

Não houve qualquer intercorrência na aplicação do TLPP nas espécies avaliadas, todos os animais submetidos aos procedimentos retornaram aos recintos de origem sem apresentar sinais de estresse ou distúrbios oculares como secreção ou blefaroespasma.

Os resultados obtidos para o TLPP nas cinco espécies avaliadas neste artigo, não permitem comparações com os poucos valores de referência disponibilizados na literatura, devido às diferenças intrínsecas aos métodos. Para canários-da-terra, curiós e tartarugas-de-orelha-vermelha, não foram encontrados dados de mensuração da fração aquosa da lágrima na bibliografia.

Quanto à praticidade, a execução da mensuração da fração aquosa da lágrima por meio do TLPP demonstrou-se altamente viável, principalmente em aves, onde a interferência do animal foi praticamente nula. Quanto ao réptil avaliado, o resultado também foi favorável, embora exija do operador maior habilidade na contenção. Quanto aos ratos, o procedimento foi executado com menor dificuldade do que nos camundongos, foi possível a contenção e a mensuração lacrimal, por um único operador. Embora os camundongos ofereçam maior dificuldade, estes também puderam ser executados com um treinamento prévio na contenção de modo a adquirir familiaridade com o método.

O presente experimento demonstrou que o TLPP caracteriza-se como um método padronizado de mensuração da fração aquosa da lágrima e pode ser utilizado em animais com olhos pequenos ($CHFP \leq 5$ mm), e permite futuras comparações com os dados disponibilizados aqui.

Mais experimentos e o estabelecimento de valores de referência para novas espécies permitirão, a identificação de indivíduos que desviem destes parâmetros e a comparação da produção fisiológica da fração aquosa da lágrima entre espécies.

3.7 REFERÊNCIAS

BARABINO S., CHEN W., DANA M.R. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eyes; uses and limitations. **Experimental Eye Research** 2004; 79: 613-621.

FUJIHARA T.; NAGANO T.; NAKAMURA M.; SHIRASAWA E. Lactoferrin suppresses loss of corneal epithelial integrity in rabbit short-term dry eye model. **Journal Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 1988. 14, 99-107.

HOFFMAN R.W.; ALSPAUGH M.A.; WAGGIE K.S.; DURHAM J.B.; WALKER S.E.; Sjögren's syndrome in MRL/1 and MRL/n mice. **Arthritis & Rheumatism**. 1988, 27, 157-165.

KASWAN, R.L. SALISBURY, MA, WAND, DA, 1989. Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca. A useful model for human keratoconjunctivitis sicca: tratament with cyclosporine eyes drops. Arch. Ophthalmol. 107, 1210-1216. *Appud*: BARABINO S, CHEN W, DANA MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eyes; uses and limitations. **Experimental Eye Research** 2004; 79: 613-621.

LANGE R.R., LIMA L., MONTIANI-FERREIRA. Measurement of tear production in black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) using three different methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and standardized endodontic absorbent paper points. **Veterinary Ophthalmology** 2012, 1-7.

MARTS B.S., BRYAN G.M., PRIETO D.J., Schirmer tear test measurements and lysozyme concentration of equine tears. **Journal of Equine Medical Surgery** 1977; 1:427.

MONTIANI-FERREIRA F., Oftalmologia – Capítulo 65 In: **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. Eds. Zalmir S. Cubas, Jean C. R. Silva e J. L. Catão-Dias. Roca. 2007: 1092-1104.

MONTIANI-FERREIRA F., Ophthalmology – Chapter 37 In: **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals** Eds. Murray E. Fowler and Zalmir S. Cubas. Iowa State University Press/Ames. 2001 437-456.

NELSON PS., A shorter Schirmer tear test. **Optometric Weekly**; 1982. 73:568-9.

PUMAROLA-SUNÉ J., SOLA-VICENS L., SENTIS-VILALTA J., SENTIS-VILALTA, J., CANALDA-SAHLI, C., BRAU-AGUADÉ, E. Absorbancy properties of diferente brands of standardized endodontic paper points. **Journal of Endodontics** 1998; 24; 12.

SCHIRMER O. Principios y métodos de determinación funcional de las glándulas lagrimales. Arch Oftalmol Hisp-Amer. 1903; 3:366–367 *Appud*.: Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eyes; uses and limitations. **Experimental Eye Research** 2004; 79: 613-621.

STRUBBE D. T., GELATT K.K., Chapter 11 ophthalmologic examination and diagnostic procedures, 427-466. In: **Veterinary Ophthalmology**, 3rd ed. (ed. Gelatt KK) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, 1544p.

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**. 2001; 10: 143-213.

4 BIOMETRIA OCULAR DE TRÊS PRIMATAS NEOTROPICAIS: SAGUI-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*), MICO-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*) E MACACO-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*)

Ocular biometry of three neotropical primates: black-tufted marmoset (Callithrix penicillata), squirrel monkey (Saimiri sciureus) and owl monkey (Aotus azarae infulatus)

4.1 RESUMO

Objetivo: estabelecer valores de referência para medidas oftálmicas anatômicas e fisiológicas nas três espécies de primatas neotropicais, sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) e macaco-da-noite (*Aotus azarae infulatus*), relacionar as medidas obtidas com os respectivos hábitos.

Material e métodos: foram aferidas medidas por meio de contenção manual, utilizando paquímetro convencional, tonômetro de rebote, sistema ultrassonografia modo B, estesiômetro de Cochet-Bonnet, paquímetro ultrassônico de córnea, termômetro, balança e fitas do teste lacrimal de Schirmer. Foram avaliados 24 macacos-da-noite e 24 micos-de-cheiro disponibilizados pelo Centro Nacional de Primatas – Ananindeua – Pará; e 19 saguis-de-tufo-preto, capturados no Parque Barigui – Curitiba – Paraná.

Resultados: foram estabelecidos valores de referência das principais medidas oculares, biométricas, ultrassonográficas e fisiológicas e foi estabelecido um índice correlacionando o diâmetro da córnea com o diâmetro axial do bulbo ocular que permite caracterizar o hábito de vida da espécie, relacionado à atividade diurna ou noturna.

Discussão: Foi possível estabelecer valores de referência para medidas oftálmicas em pequenos primatas selvagens submetendo-os somente a contenção manual, algumas medidas oftálmicas permitiram estabelecer inferências anatômicas aos hábitos diurnos ou noturnos das espécies.

Palavras-chave: Oftalmologia. Biometria. Primatas não humanos. Ultrassonografia. Valores de referência.

4.2 ABSTRACT

Objective: To establish reference values for anatomical and physiological ophthalmic measures in three species of neotropical primates, the black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*), the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) and the owl monkey (*Aotus azarae infulatus*), relating measurements with their habits.

Material and methods: measurements were taken using manual restraint, using conventional caliper, rebound tonometer, B-mode ultrasound system, Cochet-Bonnet esthesiometer, ultrasonic corneal pachymetry, thermometer, balance and Schirmer tear test paper strips. We evaluated 24 squirrel monkeys and 24 owl monkeys provided by the National Primate Center (Centro Nacional de Primatas – CENP), Ananindeua-Pará, and 19 black-tufted marmosets, captured in Barigui Park, Curitiba-Paraná.

Results: We established reference values for the main ocular, biometric, ultrasound and physiological measures and also an index correlating the diameter of the cornea with the axial length of the eye, which allows the characterization of the life habits of the species, related to the animal activity during the day or night.

Discussion: It was possible to establish reference values for ophthalmic measures in small wild primates using only manual restraint. Some ophthalmic measures allowed that anatomical inferences about diurnal or nocturnal habits of species were made.

Keywords: ophthalmology, biometrics, nonhuman primates, ultrasound, reference values.

Keywords: Ophthalmology. Biometrics. Nonhuman primates. Ultrasound system. Reference values.

4.3 INTRODUÇÃO

Os valores de referência de medidas oftálmicas, incluídas a biometria e dados fisiológicos, para diferentes espécies de animais selvagens, particularmente os sul-americanos, são escassos na literatura (MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2006). Dentre estes, os primatas, são particularmente carentes em valores de referência. Os primatas não humanos compreendem um importante grupo zoológico devido à proximidade filogenética com o homem (SASAKI *et al.*, 2009), sendo o Brasil o país do mundo com o maior número de espécies (CHIARELO *et al.*, 2008). Desta forma, os primatas brasileiros representam um contingente animal de especial interesse na pesquisa médica. Os primatas neotropicais por seu tamanho pequeno, quando comparados com as espécies do Velho Mundo – historicamente utilizadas como animais de experimentação, apresentam reduzidos custos de reprodução e manutenção em cativeiro, sendo uma alternativa economicamente mais interessante como modelo de experimentação biomédica (SASAKI *et al.*, 2009). Os primatas do Velho Mundo, especialmente os grandes símios, principalmente por razões sentimentais são cada vez mais evitados nas experimentações científicas (HAMPTON-JUNIOR *et al.*, 1966; EPPLE, 1970).

Uma etapa importante no uso destes novos animais, os primatas neotropicais, como modelos biomédicos é o estabelecimento dos valores de referência da avaliação oftálmica utilizados na rotina médica de animais domésticos (MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2006).

No Brasil existem alguns centros de pesquisa que mantêm coleções de primatas cativos, e albergam populações numericamente suficientes para o

estabelecimento de valores de referência, entre estes se destaca o Centro Nacional de Primatas (CENP).

Populações de primatas impropriamente introduzidas em ambientes urbanos ou naturais, são indesejadas e frequentes no Brasil. Estes contingentes populacionais, ao serem manejados também constituem boas oportunidades para a tomada de medidas oculares.

A opção pelas três espécies aqui avaliadas justifica-se por serem cada uma delas representante de um dos três grupos da Ordem dos Primatas, segundo a classificação proposta por SILVEIRA (2004), no que se refere à razão entre a densidade de bastonetes e de cones na retina. O sagui-de-tufo-preto representa o grupo dos primatas diurnos de olhos pequenos que apresenta uma pequena razão entre a densidade de bastonetes e cones; o mico-de-cheiro representa os primatas diurnos de olhos médios a grandes que apresenta uma grande razão entre bastonetes e cones, o macaco-da-noite representa os primatas noturnos de olhos grandes que apresentam uma razão muito grande entre a densidade de bastonetes e de cones (SILVEIRA, 2004).

KIRK (2004) relata que dada a grande atenção que a pesquisa tem dedicado ao estudo da adaptação funcional e das características evolutivas do sistema visual dos primatas, é surpreendente que poucos autores tem se dedicado a considerar a relação morfológica com os hábitos de vida diurnos ou noturnos.

ROSS e KIRK, (2007) discutem a evolução visual dos primatas, analisando o tamanho e a forma do olho, concluem que estes acumularam dois passos evolutivos. No primeiro passo, o ancestral sendo um predador noturno, desenvolveu um olho grande com uma grande córnea para aperfeiçoar a captação luminosa característica da visão escotópica. No segundo passo quando mudou de hábitos tornando-se diurno, ampliou o diâmetro axial aumentando a acuidade típica da visão fotópica.

A disponibilidade de valores de referência para testes oftálmicos, bem como das medidas anatômicas e fisiológicas oculares seriam os primeiros passos para uma adequada avaliação oftálmica dos diferentes primatas não humanos, facultando o discernimento entre o normal e o patológico. Tais valores de referência são curiosamente escassos na literatura, particularmente para primatas neotropicais. O presente estudo se propõe a estabelecer valores de referência das principais medidas anatômicas oculares, da pressão intraocular e da fase aquosa do filme

lacrimal para as três espécies de primatas neotropicais: sagui-de-tufo-preto, mico-de-cheiro e macaco-da-noite.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Foi também aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Todos os procedimentos que envolveram a utilização dos primatas foram conduzidos de acordo com as “Normas para uso de animais em pesquisas oftalmológicas” da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*).

Previamente ao experimento, visando excluir os animais que porventura apresentassem doença ocular e/ou sistêmica, realizou-se exame físico, avaliação hematológica, bioquímica sérica, coproparasitária, ectoparasitária, radiográfica esquelética, torácica e abdominal laterolateral e anteroposterior além de exame ultrassonográfico ocular e abdominal.

Visando utilizar apenas indivíduos saudáveis, cujos parâmetros hematológicos e bioquímicos não destoassem dos valores de referência, todos os indivíduos foram avaliados, as coletas das amostras de sangue foram efetuadas através de punção da veia femoral.

A sequência de realização dos procedimentos no estudo incluiu a identificação da espécie, o sexo, a idade, o peso e o escore corporal. Foi efetuada avaliação da cavidade oral visando descartar do experimento animais que apresentassem alterações. Foi efetuada inspeção ocular, avaliando-se as estruturas do segmento anterior com auxílio de um transiluminador.

Os procedimentos de tomada de dados foram efetuados em horário diurno, em ambiente climatizado, para a manipulação dos animais foram utilizados equipamento de proteção individual, tais como avental, luvas, máscara, toca e roupas de uso exclusivo.

Para a realização dos testes oftálmicos, os primatas foram contidos manualmente de maneira cuidadosa, atendendo para que não houvesse desconforto excessivo ou compressão exagerada.

Animais experimentais

Sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*)

Os saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) utilizados no experimento foram capturados no Parque Barigui – Curitiba, Paraná, Brasil (25°25'40" sul, 49°16'23" oeste), utilizando-se diferentes métodos, sendo principalmente cevas-armadilhas e captura manual. Foram mensurados 19 animais adultos (12 fêmeas e sete machos). Para identificação individual, foi implantado em cada sagui um microchip (AnimalTag, Korth, RFID, São Paulo, Brasil) que podia ser reconhecido com um scanner apropriado.

Os saguis do Parque Barigui são invasores e a retirada destes animais do Parque fez parte de um programa de restauração da fauna desenvolvido pela Prefeitura Municipal de Curitiba em parceria com o Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

Os animais capturados foram mantidos em recintos individuais medindo um metro de altura, meio metro de largura e meio metro de profundidade, sendo possível sua divisão por uma porta tipo guilhotina em dois compartimentos de modo a facilitar o manejo nos procedimentos de higiene e captura. Estas instalações compõem um biotério situado no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

A alimentação utilizada durante a permanência dos saguis-de-tufo-preto no biotério do Hospital Veterinário da UFPR foi constituída por frutas da estação sendo que bananas compunham o cardápio diário, polvilhadas com goma arábica em pó; queijo tipo “*petit suisse*”, porções de salsichas e larvas de insetos (*Tenerio molitor*), oferecidos em dias alternados, constituindo a fonte proteica.

Após a realização da investigação, todos os animais, tanto machos como fêmeas foram esterilizados cirurgicamente e entregues aos cuidados do Zoológico de Curitiba sendo alojados em recintos expositivos ou retornaram aos locais de origem onde foram capturados.

Macaco-da-noite (*Aotus azarae infulatus*)

Os macacos-da-noite (*Aotus a. infulatus*) utilizados na pesquisa pertenciam ao acervo do Centro Nacional de Primatas (CENP) localizado em Ananindeua – Pará/Brasil (1°21'59" sul, 48°22'20" oeste), com o qual a UFPR mantém cooperação. Todos os animais do plantel do CENP foram identificados por meio de tatuagem e microchip (AVID, Califórnia, EUA). Foram avaliados 24 macacos-da-noite adultos sendo 12 machos e 12 fêmeas.

Os macacos-da-noite apresentam comportamento monogâmico e foram alojados em um galpão construído em alvenaria, com área própria para o manejo dos animais; área para limpeza de utensílios; banheiro para tratadores e sala de depósito de materiais de limpeza. O galpão está disposto no sentido norte/sul e tem as laterais abertas, protegidas por telas metálicas tipo mosquiteiro, para impedir a entrada de artrópodes e promover a entrada de luz solar e a aeração do ambiente interno. Os recintos em seu interior estão dispostos em baterias, criando corredores de circulação (limpo - central) e de recolhimentos de dejetos (sujos - laterais). Os recintos distribuídos no interior do galpão medem 1,20 metros de largura, 3,85 metros de comprimento e 2,40 metros de altura, estão dispostos em duas baterias de 26 recintos. No interior de cada recinto há quatro poleiros transversais de cinco cm de diâmetro e plataformas de madeira nas laterais e no fundo, em três níveis, para viabilizar o banho de sol. Há também uma caixa ninho de metal e piso telado, fixada na parte frontal do recinto, utilizada para abrigo e contenção. A dieta é baseada em produtos hortifrutigranjeiros, ração peletizada específica para primatas neotropicais (Megazoo P25, Vale Verde, São Paulo - Brasil), leite de vaca industrializado, fornecido duas vezes por semana, ovo cozido uma vez por semana e larvas de besouro (tenébrio-gigante: *Zophobas morio*) três vezes por semana. A alimentação é oferecida em bandeja de inox, fixada na parte frontal do recinto, água e leite são oferecidos em bebedouros do tipo mamadeira de meio litro.

Mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*)

Os micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), utilizados na pesquisa pertenciam ao acervo do Centro Nacional de Primatas (CENP) localizado em Ananindeua – Pará/Brasil, com o qual a UFPR mantém cooperação. Todos os animais do plantel do CENP foram identificados por meio de tatuagem e microchip (AVID, Califórnia, EUA). Foram avaliados 24 micos-de-cheiro adultos sendo 13 machos e 11 fêmeas.

Os micos-de-cheiro, sendo poligâmicos são alojados em 24 recintos de 2,30 metros de largura, 3,85 metros de comprimento e 2,55 metros de altura, conjugados em duas partes, possuindo uma portinhola central que dá passagem aos animais. Tal disposição facilita o manejo e possibilita maior segurança aos tratadores. Cada conjunto de recinto duplo abriga um grupo reprodutivo composto por um macho adulto e 10 fêmeas. Cada recinto possui quatro poleiros transversais e plataforma de ripas de madeira.

A dieta é baseada em produtos hortifrutigranjeiros, ração peletizada específica para primatas neotropicais (Megazoo P25, Vale Verde, São Paulo - Brasil), leite industrializado de vaca, fornecido duas vezes por semana, ovo cozido uma vez por semana e larvas de besouro (tenébrio-gigante: *Zophobas morio*) três vezes por semana. Os animais foram submetidos à identificação da espécie e do sexo, e à leitura do transponder por meio de scanner, foi obtida a idade dos indivíduos consultando os registros do plantel.

Biometria

Para a tomada das medidas oculares: distância entre os cantos nasais (DCN), distancia entre os cantos temporais (DCT), distância inter-pupilar (DIP), comprimento horizontal da fenda palpebral (CHFP), diâmetro da córnea (DC), foi utilizado um paquímetro digital de aço inoxidável com visor LCD (PD-150, 0-150 mm, acurácia: 0.01 mm; Vonder, Curitiba, PR, Brasil). Os animais foram contidos manualmente sendo mensurada a abertura horizontal da fenda palpebral, o diâmetro da córnea (limbo a limbo) de ambos os olhos a distância entre as pupilas, a distância entre os cantos nasais e a distância entre os cantos temporais.

Para a aferição do peso foi utilizada uma balança eletrônica digital de mesa (Filizola BPS, 15 kg, precisão 5 g, São Paulo, Brasil). Foi efetuada a tara da balança com o peso da caixa de transporte vazia, após o que a caixa foi pesada novamente desta feita com o animal no seu interior, obtendo-se assim o peso do animal.

A temperatura retal foi obtida por meio de um termômetro digital (DeltaTrak - 40°C a 150°C, precisão de 0,5°C).

A temperatura do ambiente e a umidade relativa do ar foram obtidas por meio de um termo-higrômetro digital (Mod 30.5000.02, TFA Technology HK Limited. Hong Kong, China).

Para a mensuração da pressão intraocular (PIO) foi utilizado um tonômetro de rebote (TonoVet, Kruuse, Langskov, Dinamarca), foram efetuadas três medidas de cada um dos olhos dos animais (Figura 1).

Para mensuração da espessura central da córnea (ECC), foi utilizado o aparelho portátil de paquimetria ultrassônica (PalmScan, Micro Medical Devices, California, EUA) (Figura 1).

Para a mensuração da sensibilidade da superfície da córnea (EST) foi utilizado um estesiômetro de Cochet-Bonnet (Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France) (FIGURA 1).

Para a ecobiometria ocular ultrassônica foram avaliados: 1) comprimento axial da câmara anterior (CA); 2) espessura medial da lente (EL); 3) comprimento axial da câmara vítrea (CV) e, 4) diâmetro axial do bulbo ocular (DABO). Para os micos-de-cheiro e macacos-da-noite, foi utilizado um sistema de ultrassonografia modo-B (MyLab 30 Vet Gold, Esaote, Genova, Itália) com um transdutor linear com frequência de 12 MHz. Para os saguis-de-tufo-preto foi utilizado outro sistema de ultrassonografia de mono-B (Sonix OP, Ultrasonix, Columbia, Canada), com transdutor linear de frequência de 14 MHz.

As imagens e mensurações foram obtidas a partir de sonogramas do plano dorsal. Antes do procedimento, visando à redução do desconforto, a córnea foi anestesiada com colírio de cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%. O exame ultrassonográfico foi realizado pela técnica transcorneana, porém em algumas exceções, os animais não permitiram a manobra, sendo realizada a técnica transpalpebral com o auxílio de gel acústico. Em todos os casos só foram mensuradas as imagens consideradas adequadas para discernir o limite de todas as estruturas oculares. Foram aferidas as dimensões entre a córnea e a cápsula anterior da lente, a qual corresponde à câmara anterior; entre a cápsula anterior e posterior da lente a qual corresponde à espessura da lente; entre a cápsula posterior da lente e o disco óptico, a qual correspondente à câmara vítrea; e o comprimento axial do olho que corresponde à medida entre a córnea e o disco óptico. Todas as mensurações efetuadas mediante ultrassonografia foram praticadas por um único operador para evitar as variações entre observadores.

Teste lacrimal de Schirmer

Doenças oculares podem perturbar a produção lacrimal, são identificadas por sinais como epífora e olho seco, o teste lacrimal de Schirmer é o método clássico para a mensuração da fração aquosa da lágrima, é utilizado no homem e em uma variedade de espécies animais (BARABINO *et al.*, 2004).

Teste lacrimal de Schirmer I

Para micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), e macacos-da-noite (*Aotus a. infulatus*), foi efetuado o teste lacrimal de Schirmer I (TLSI) (Ophthalmos, São Paulo, SP, Brasil), utilizando a fita convencional, com um tempo de leitura de um minuto (FIGURA 1). Foram avaliados 24 macacos-da-noite sendo 12 machos e 12 fêmeas (48 olhos) e 24 micos-de-cheiro sendo 13 machos e 11 fêmeas (48 olhos).

Teste lacrimal de Schirmer I modificado

Para os saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), foram utilizadas fitas de papel absorvente do Teste Lacrimal de Schirmer (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), cortadas longitudinalmente pela metade. Quando a marca de umidade na fita atingiu apenas a porção arredondada anterior ao entalhe, inferior a marca zero, considerou-se resultado negativo (TROST *et al.*, 2001). Os animais foram contidos manualmente por um auxiliar enquanto o operador tencionava gentilmente a pálpebra inferior com pinça de Adson Brown romba para facilitar a inserção da fita de Schirmer modificada no fórnice conjuntival. Foram avaliados 19 saguis-de-tufo-preto sendo 12 fêmeas e 07 machos.

Análise estatística

Os dados obtidos na pesquisa foram submetidos à análise estatística descritiva. Inicialmente foi efetuado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Após este procedimento, os testes-*t* não pareados foram aplicados visando à comparação entre os dados obtidos para machos e fêmeas, olhos direitos e esquerdos avaliando se eram diferenças significativas entre os grupos independentes quanto aos valores numéricos contínuos. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Foi utilizado o programa JMP (SAS Institute, Inc., Cary NC, USA) para as análises estatísticas: descritiva e inferencial.

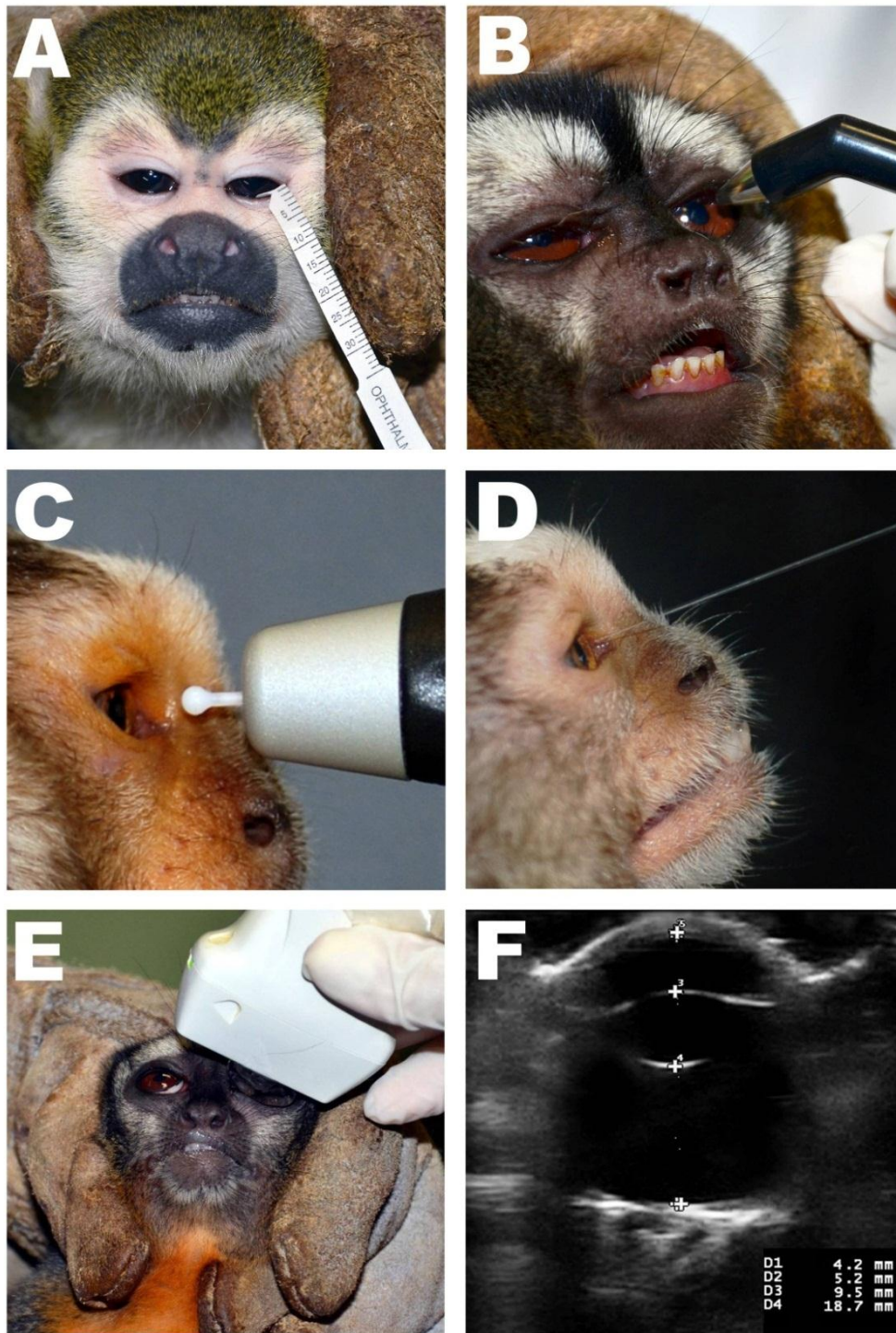


FIGURA 1 – ASPECTO DA MENSURAÇÃO DA FASE AQUOSA DO FILME LACRIMAL POR MEIO DO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I EM MICO-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*) (A); MACACO-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*), NO MOMENTO DA MENSURAÇÃO DA ESPESSURA CENTRAL DA CÓRNEA UTILIZANDO UM APARELHO PORTÁTIL DE PAQUIMETRIA ULTRASSÔNICA (B); SAGUI-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) SENDO SUBMETIDO À MENSURAÇÃO DA PRESSÃO INTRAOCULAR POR MEIO DE UM TONÔMETRO DE REBOTE (C); SAGUI-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) DURANTE A AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DA CÓRNEA COM O USO DE ESTESIÔMETRO DE COCHET-BONNET (D); MACACO-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*), NO MOMENTO DA AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO BULBO OCULAR, COM UM TRANSDUTOR LINEAR (E); ASPECTO ULTRASSONOGRÁFICO DA IMAGEM OBTIDA EM PLANO DORSAL POR MEIO DA ULTRASSONOGRAFIA DO BULBO OCULAR DO MACACO-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*)

4.5 RESULTADOS

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk demonstrou que os dados apresentaram distribuição normal de erros. Os dados obtidos na estatística descritiva dos diversos parâmetros avaliados são apresentados nas tabelas que seguem.

TABELA 1 – RESULTADOS OBTIDOS NA TOMADA DE MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), EM MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*), MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*) E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) POR MEIO DE UM PAQUÍMETRO DIGITAL. (DCN) DISTÂNCIA ENTRE OS CANTOS NASAIS; (DCT) DISTÂNCIA ENTRE OS CANTOS TEMPORAIS; (DIP) DISTÂNCIA INTER-PUPILAR; (CHFP) COMPRIMENTO HORIZONTAL DA FENDA PALPEBRAL; E (DC) DIÂMETRO DA CÔRNEA DE LIMBO A LIMBO.

Espécie	DCN (mm)	DCT (mm)	DIP (mm)	CHFP (mm)	DC (mm)
<i>Callithrix penicillata</i>	7,75 ± 0,90	22,71 ± 5,50	12,85 ± 0,79	7,83 ± 0,72	Não mensurado
<i>Saimiri sciureus</i>	6,52 ± 0,56	26,21 ± 1,44	16,64 ± 1,06	10,56 ± 1,03	8,11 ± 0,54
<i>Aotus a. infulatus</i>	10,42 ± 0,85	38,98 ± 1,61	24,13 ± 1,17	14,61 ± 1,16	13,40 ± 0,76

TABELA 2 – MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), EM MICO-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*), MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*), E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*), AFERIDAS POR MEIO DE ULTRASSONOGRRAFIA MODO B. COMPRIMENTO AXIAL DA CÂMARA ANTERIOR (CA), ESPESSURA MEDIAL DA LENTE (EL), COMPRIMENTO AXIAL DA CÂMARA VÍTREA (CV), DIÂMETRO AXIAL DO BULBO OCULAR (DABO).

Espécie	CA (mm)	EL (mm)	CV (mm)	DABO (mm)
<i>Callithrix penicillata</i>	1,58 ± 0,18	2,05 ± 0,22	7,01 ± 0,44	10,63 ± 0,43
<i>Saimiri sciureus</i>	2,54 ± 0,19	2,45 ± 0,22	9,14 ± 0,35	14,23 ± 0,33
<i>Aotus a. infulatus</i>	4,19 ± 0,27	4,75 ± 0,28	9,89 ± 0,48	18,85 ± 0,58

TABELA 3 – MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), OBTIDAS EM MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*), (N=24); MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*) (N=24), E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) DA SENSIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DA CÔRNEA MENSURADA POR MEIO DO ESTESIÔMETRO DE COCHET-BONNET (EST), ESPESSURA CENTRAL DA CÔRNEA (ECC) MENSURADA UTILIZADO UM APARELHO PORTÁTIL DE PAQUIMETRIA ULTRASSÔNICA, FRAÇÃO AQUOSA DA LÁGRIMA AVALIADA PELO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I (TLIS) E TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER I MODIFICADO (TLSIM), PRESSÃO INTRAOCULAR (PIO) MEDIDA PELO TONÔMETRO DE REBOTE TONOVET.

Espécie	EST (mm)	ECC (mm)	TLIS	PIO (mm/hg)
<i>Callithrix penicillata</i>	5,78 ± 0,44	0,33 ± 0,03	-0,46 ± 3,41**	12,73 ± 2,29
<i>Saimiri sciureus</i>	4,77 ± 0,99	0,43 ± 0,06	4,67 ± 2,75*	9,22 ± 2,21
<i>Aotus a. infulatus</i>	2,65 ± 0,60	0,44 ± 0,04	2,09 ± 2,32*	13,72 ± 5,65

*Teste Lacrimal de Schirmer I.

**Teste Lacrimal de Schirmer I modificado.

TABELA 4 – MEDIDAS OFTÁLMICAS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO), DE MICO-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*) (N=24), MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*) (N=24), E SAGUIS-DE-TUFO-PRETO (*Callithrix penicillata*) IDENTIFICANDO O PESO CORPORAL, A IDADE, A TEMPERATURA RETAL, A TEMPERATURA AMBIENTE E A UMIDADE RELATIVA DO AR.

Espécie	Peso (g)	Idade (dias)	Tem. Retal (°C)	Tem. Amb. (°C)	URA (%)
<i>Callithrix penicillata</i>	291,82 ± 93,58	Não disponível	39,00 ± 1,15	18,47 ± 1,23	51,09 ± 11,96
<i>Saimiri sciureus</i>	754,79 ± 14,63	2654,08 ± 1283,69	39,84 ± 0,46	25,55 ± 0,53	49,46 ± 2,62
<i>Aotus a. infulatus</i>	1046,75 ± 154,26	3557 ± 1101,88	38,02 ± 6,61	25,38 ± 5,10	48,52 ± 9,91

Para todas as medidas obtidas, não foram encontradas diferenças significativas comparando os resultados obtidos entre machos e fêmeas ou entre os olhos direitos e esquerdos ($P > 0,05$).

KIRK (2004), visando à comparação entre bulbos oculares de diferentes espécies de mamíferos estipulou um índice constituído pela razão entre a média dos diâmetros máximo e mínimo da córnea dividido pela média entre os diâmetros máximo e mínimo do equador do bulbo ocular. O referido autor estudou bulbos oculares fixados.

Visando avaliar a relação entre o tamanho da córnea e o diâmetro axial do bulbo ocular do macaco-da-noite e do mico-de-cheiro, estabelecemos um índice semelhante ao proposto por KIRK (2004), porém ao invés de utilizar o diâmetro equatorial do bulbo ocular, utilizamos o diâmetro axial. Os valores dos índices obtidos para cada uma das espécies são significativamente diferentes entre si ($P < 0,0001$) e são apresentados na TABELA 5 e na FIGURA 2.

TABELA 5 – OS VALORES OBTIDOS NA MENSURAÇÃO DOS DIÂMETROS DAS CÓRNEAS DE LIMBO A LIMBO, FORAM DIVIDIDOS PELO DIÂMETRO AXIAL DO BULBO OCULAR, OBTENDO-SE O ÍNDICE: DIÂMETRO DA CÓRNEA/DIÂMETRO AXIAL DO BULBO OCULAR ($DC \div DABO$), A MÉDIA DESTES VALORES E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO SÃO AQUI APRESENTADOS. DC: DIÂMETRO DA CÓRNEA, MENSURADO COM PAQUÍMETRO DIGITAL E DABO: DIÂMETRO AXIAL DO OLHO, MENSURADO POR ULTRASSONOGRÁFIA MODO B.

Espécie	$DC \div DABO$
<i>Saimiri sciureus</i>	0,57 ± 0,04
<i>Aotus a. infulatus</i>	0,71 ± 0,04

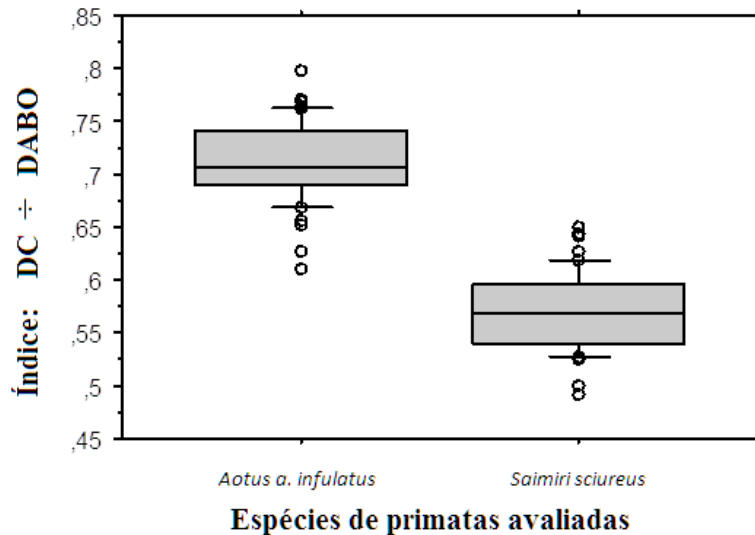


FIGURA 2 – GRÁFICO DO TIPO “BOX PLOTS” DEMONSTRANDO OS QUARTIS DOS ÍNDICES OBTIDOS DIVIDINDO O DIÂMETRO DA CÔRNEA PELO COMPRIMENTO AXIAL DO BULBO OCULAR EM MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*), ANIMAL DE HÁBITO DIURNO E EM MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarae infulatus*), DE HÁBITO NOTURNO

4.6 DISCUSSÃO

As medidas oculares aqui disponibilizadas preenchem parcialmente uma lacuna de informações quanto aos valores de referência da biometria ocular das três espécies de primatas abordadas. Muito embora algumas destas medidas já estivessem disponibilizadas na literatura científica (KIRK, 2004; ROSS e KIRK, 2006), estas haviam seguido métodos de tomadas de dados diversos dos aqui aplicados, amostraram um pequeno número de indivíduos ou referiam-se a espécies ou subespécies diferentes ou não identificadas.

Verificou-se que o exame ultrassonográfico ocular é uma modalidade diagnóstica eficiente para a obtenção da biometria ocular, pois apesar de ser um método recente na avaliação das estruturas oculares, atualmente está mais difundido na rotina clínica oftalmológica, possui custo relativamente acessível, boa repetitividade, além de ter sido possível sua realização sem a necessidade de anestesia geral nas espécies estudadas. Outro fato interessante é que além de permitir a obtenção de medidas possibilita a verificação de características anatômicas e a avaliação de possíveis anormalidades que poderiam vir a interferir na idoneidade do estudo. Ressalta-se o fato da necessidade de um aparelho de alta resolução associado a transdutores de alta frequência, acima de 10 MHz para a realização deste tipo de estudo e avaliação adequada das estruturas oculares

(GONZALES *et al.*, 2001), principalmente por esses primatas apresentarem bulbos oculares pequenos quando comparados a outros mamíferos.

As mensurações obtidas por meio de exame ultrassonográfico ocular modo-B podem ser consideradas fidedignas segundo COTTRILL *et al.*, (1989), porém quando comparadas a outros dados de referência da literatura deve ser tomado o cuidado de analisar mensurações também obtidas por esta técnica, pois alguns autores encontraram pequenas divergências entre medidas coletadas por meio do modo-A e do modo, devido a artefatos de velocidade e refração (HAMIDZADA, 1999). Em alguns estudos foi percebido que geralmente as diferenças entre os dois modos de coleta de dados são mais evidentes em estruturas com maior profundidade como a espessura da lente, câmara vítrea e comprimento axial do olho, quando comparados à espessura da córnea e câmara anterior (HAMIDZADA, 1999) enquanto outros não demonstraram diferenças estatisticamente significantes (COTTRILL *et al.*, 1989). BOROFFKA *et al.*, (2006) demonstraram que erros de repetitividade entre observadores e em um mesmo observador não proporcionam a ocorrência de resultados discrepantes quando o modo-B é utilizado como ferramenta para coleta de dados de biometria ocular.

No presente experimento, apesar de terem disso utilizados aparelhos diferentes não houve diferença na obtenção das imagens, pois ambos são de alta resolução e possuem transdutores de alta frequência, sendo indicados para mensurações de estruturas superficiais, como os olhos.

O estesiômetro de Cochet-Bonnet afere o maior comprimento da haste de náilon que provoca nocicepção ao tocar a superfície da córnea. A sensibilidade é inversamente proporcional à magnitude da medida em milímetros. Desta forma, o comprimento da haste caracteriza a sensibilidade corneana. Quanto maior o comprimento menor será a pressão aplicada sobre a córnea. A pequena sensibilidade apresentada pelo macaco-da-noite chama a atenção, quando comparada ao mico-de-cheiro e ao sagui-de-tufo-preto: 2,65 mm; 4,77 mm e 5,78 mm respectivamente. A seleção natural de uma córnea ampla, adaptada para a vida noturna, observada no macaco-da-noite, parece ter reduzido a concentração de terminações nervosas distribuídas na sua superfície. Esta hipótese é corroborada pela maior sensibilidade observada em sagui-de-tufo-preto sendo esta a espécie entre as três avaliadas que apresenta o menor diâmetro da córnea, embora no presente experimento nesta espécie não tenha sido aferido o diâmetro da córnea,

ROSS e KIRK (2006), relatam 5,9 mm para *Callithrix jacchus* e 5,6 mm para *Callithrix* sp. que são espécies muito próximas de *C. penicillata* e que aprestaram outras medidas semelhantes. Porém, é potencialmente mais difícil a aplicação correta do método de avaliação da sensibilidade por meio do estesiômetro de Cochet-Bonnet nos olhos pequenos. Isto se deve ao fato de que nos animais com olhos pequenos é maior a possibilidade de que durante o procedimento de mensuração da sensibilidade da córnea, a haste de náilon toque a margem da pálpebra e os cílios promovendo resposta muitas vezes indevida e, em alguns casos, falsa leitura.

A espessura central da córnea é semelhante em duas espécies: macaco-da-noite e o mico-de-cheiro (0,44 mm e 0,43 mm respectivamente). Um valor bastante menor foi encontrado para o sagui-de-tufo-preto (0,33 mm). Portanto, a ampliação da superfície da córnea na adaptação à vida noturna, no caso do macaco-da-noite, parece não ter interferido sobre a espessura da mesma.

A pressão intraocular observada nos micos-de-cheiro (9,22 mm/Hg) foi bastante inferior à observada nos saguis-de-tufo-preto e nos micos-de-cheiro (12,73 mm/Hg e 13,72 mm/Hg respectivamente), esta observação carece de mais investigação para que possa ser buscada a justificativa para o caso dos saguis-de-tufo-preto. Valores de referência da pressão intraocular de diferentes espécies de primatas não humanos não está disponível na literatura, embora seja mensurada comparativamente em experimentos que utilizam primatas como modelos, especialmente em estudos de glaucoma, onde se avaliam grupos com e sem determinados tratamentos terapêuticos (CAMRAS e BITO, 1981; SCHUBERT *et al.*, 1985; MACDONALD *et al.*, 1991).

Quanto ao teste lacrimal, o método utilizado para o sagui-de-tufo-preto foi diverso do adotado para as duas outras espécies o que determina a impossibilidade de comparação entre os resultados. Porém, ao compararem-se os resultados obtidos para o mico-de-cheiro e o macaco-da-noite, respectivamente: 4,67 mm e 2,09 mm chama atenção a pequena produção lacrimal observada na espécie noturna. O fato de a mensuração ter sido praticada em horário diurno pode ter influenciado este resultado aparentemente pequeno. Recomenda-se que novas mensurações sejam praticadas em horário noturno, atendendo a esta característica comportamental da espécie para dirimir o fato.

Com vistas ao diâmetro da córnea e o diâmetro axial do bulbo ocular dos três primatas, ROSS e KIRK (2006), mensurando olhos fixados, obtiveram as seguintes medidas: para macacos-da-noite (*Aotus* sp.), média de dois exemplares, diâmetro da córnea: 13,4 mm e comprimento axial do bulbo: 20,0 mm; no presente estudo encontramos 13,4 mm e 18,85 mm respectivamente. Para micos-de-cheiro os autores citados encontraram para cinco exemplares de *Saimiri boliviensis* 7,6 mm e 14,5 mm, para apenas três exemplares de *Saimiri* sp. 8,1 mm e 15,3 mm, para apenas quatro exemplares de *Saimiri sciureus* 7,8 mm e 15,5 mm; no presente estudo encontramos 8,11 mm e 14,23 mm respectivamente. Considerando os saguis os citados autores encontraram para seis exemplares de *Callithrix jacchus* 5,9 mm e 11,3 mm para dois exemplares de *Callithrix* sp. 5,6 mm e 11,5 mm; no nosso levantamento, encontramos para o diâmetro axial do bulbo ocular 10,63 mm e não obtivemos a medida do diâmetro da córnea. As medidas aqui apresentadas foram efetuadas em animais vivos e com métodos diferentes do utilizado pelos autores citados. As mensurações presentes nesta investigação foram realizadas por meio de paquímetro para a córnea e por meio de ultrassonografia de modo B para o eixo axial, o número de amostragem do presente estudo foi em macacos-da-noite e micos-de-cheiro de 48 olhos, e em saguis 38 olhos. Considerando estas diferenças de desenho experimental, pode-se afirmar que os resultados aqui obtidos são mais fidedignos e, não obstante, muito similares. O número de animais amostrados no nosso experimento foi amplamente superior e a mensuração de bulbos oculares de animais vivos torna as medidas mais correlacionadas com a fisiologia ocular preservada, sem ter sido alterada pelos procedimentos de enucleação, fixação e estocagem. Por outro lado a similaridade das medidas obtidas nos dois métodos valida a mensuração de olhos fixados como método para o estabelecimento de valores de referência.

Segundo KIRK (2004), estudos comparativos da morfologia ocular de mamíferos demonstram que o tamanho relativo da córnea tem correlação com a ecologia visual. Espécies noturnas tendem a apresentar córneas relativamente grandes, adaptadas para ampliar a capacidade visual noturna. Ao contrário, as espécies diurnas, tendem a apresentar córneas proporcionalmente pequenas, pois sua morfologia está direcionada a ampliação da acuidade visual. Quanto aos primatas, embora as evidências gerais corroborem com a mesma teoria, diversas hipóteses propõem que os antropóides e os lêmures apresentem variações deste

modelo. KIRK (2004) encontrou evidências de que os primatas se comportam da mesma maneira que os demais mamíferos. O autor trabalhou com bulbos oculares fixados, originários de diversas coleções, fez medidas das córneas e dos diâmetros na linha do equador e estabeleceu um índice dividindo a medida da córnea pela medida do bulbo e verificou que os índices maiores correspondem a animais de hábitos noturnos.

No presente estudo, foi efetuado um índice assemelhado, dividindo a medida da córnea obtida em animais vivos, mensurada diretamente com paquímetro pela medida do comprimento axial do bulbo ocular, obtida por ultrassonografia. Os resultados aqui obtidos para macaco-da-noite 0,71 e para mico-de-cheiro 0,57 foram muito semelhantes aos encontrados por KIRK (2004) 0,70 e 0,51 respectivamente para as mesmas espécies. Chama atenção o fato de que embora os resultados comparativos dos índices sejam assemelhados, na presente pesquisa foi medido o comprimento axial do bulbo ocular e no trabalho de KIRK (2004) foi medida a largura ou diâmetro no equador do bulbo ocular. O comprimento axial, segundo nosso entender, tem mais relevância por ser a medida axial com valor óptico no funcionamento do bulbo ocular e também por ser uma informação acessível por meio da ultrassonografia sendo que a mensuração do equador não é acessível por intermédio do ultrassom, ficando o uso do índice proposto restrito a animais mortos ou a casos de enucleação. As medidas efetuadas no presente estudo foram obtidas unicamente em animais vivos submetidos à contenção manual, no artigo citado foram avaliados olhos de cadáveres. KIRK (2004) estudou uma grande coleção de olhos de diversas espécies, trabalhou com dois olhos de macacos-da-noite e dez olhos de mico-de-cheiro, no presente experimento foram aferidos ambos os olhos de 24 indivíduos de cada uma das espécies. Vale lembrar que o índice concebido, por se tratar de uma razão entre medidas, não tem uma unidade específica. Quanto mais semelhantes forem entre si forem as duas medidas; o diâmetro da córnea, e o comprimento axial do bulbo ocular, maior será o índice (mais próximo do valor um). Quanto maior proporcionalmente for o eixo nodal do aparelho ocular, menor será o índice. O referido índice não foi aplicado para o sagui-de-tufo-preto, pois nesta espécie não foi efetuada a mensuração do diâmetro da córnea, futuras pesquisas poderão suprir esta deficiência.

Quanto à temperatura retal, para o sagui e o mico-de-cheiro: 39,0° C e 39,84° C; respectivamente, foram muito próximas, já para o macaco-da-noite foi observada

uma temperatura menor (38,02° C). A temperatura menor, observada no mico-da-noite, pode estar relacionada à baixa taxa metabólica. Ainda, a mensuração da temperatura retal foi efetuada em período diurno, como se trata de espécie de hábito noturno, a taxa metabólica pode estar reduzida neste período, implicando em menor temperatura retal.

O presente artigo ampliou o conhecimento oftálmico no que se refere a valores de referência para as três espécies investigadas e estabeleceu um índice que potencialmente permitem que outras espécies sejam classificadas quanto a aspectos biométricos oculares associando-os aos seus hábitos circadianos. Novas pesquisas necessitam ser efetuadas para esclarecer as hipóteses aqui lançadas.

4.7 REFERÊNCIAS

BOROFFKA SA, VOORHOUT G, VERBRUGGEN AM, *et al.* Intraobserver repeatability of ocular biometric measurements obtained by means of B-mode ultrasonography in dogs. **American Journal Veterinary Research**. V.67. 2006.1743-1749.

CAMRAS CB, BITO LZ. Reduction of intraocular pressure in normal and glaucomatous primate (*Aotus trivirgatus*) eyes by topically applied prostaglandin F2 alpha. **Current Eye Research**. 1981;1(4):205-9.

CHIARELLO AG, AGUIAR LMS, CERQUEIRA R, *et al.* Mamíferos ameaçados de extinção do Brasil. In: **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. (Eds Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP) Ministério do Meio Ambiente - Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2008; 681–874.

COTTRILL NB, BANKS WJ, PECHMAN RD. Ultrasonographic and biometric evaluation of the eye and orbit of dogs. **American Journal Veterinary Research**. 1989; v.50:898-903.

EPPLE G. Maintenance breeding and development of marmoset monkeys in captivity. **Folia Primatologica** 1970; 12: 56–76.

GONZALES EM, RODRIGUEZ A, GARCIA I, Review of ocular ultrasonography. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. Vol. 40, No. 4, 1999, 502-507.

HAMIDZADA AW, OSUOBENI EP. Agreement between a-mode and b-mode ultrasonography in the measurement of ocular distances. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Vol. 40, No. 4, 1999, pp 502-507.

HAMPTON-JUNIOR JK, HAMPTON SH, LANDWEHR BT. Observations on a successful breeding colony of the marmoset (*Oedipomidas oedipus*). **Folia Primatologica** 1966; 4: 265–287.

KIRK EC, Comparative Morphology of the eye in primates. **The Anatomical Record Pat A** 281A:1095-1103. 2004.

MCDONALD TF, CHEEKS L, SLAGLE T, GREEN K. Marijuana-derived material-induced changes in monkey ciliary processes differs from those in rabbit ciliary processes. **Current Eye Research**. 1991 Apr;10(4):305-12.

MONTIANI-FERREIRA F, Oftalmologia. In: **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. Editores: CUBAS, S. ZALMIR; SILVA, JEAN C.R. e CATÃO-DIAS, J.L. Editora Roca 2006.

MONTIANI-FERREIRA F, Ophthalmology. In: **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Editores FOWLER, MURRAY E. e CUBAS, ZALMIR S. Editora Iowa State University Press/Ames, 2001.

ROSS FC, KIRK EC, Evolution of eye size and shape in primates. **Journal of Human Evolution** 52 294-313. 2007.

SASAKI E, SASAKI E, SUEMIZU H, SHIMADA A, HANAZAWA K, OIWA R, KAMIOKA M, TOMIOKA I, SOTOMARU Y, HIRAKAWA R, ETO T, SHIOZAWA S, MAEDA T, ITO M, RYOJI ITO, KITO C, YAGIHASHI C, KAWAI K, MIYOSHI H, TANIOKA Y, TAMAOKI N, HABU S, OKANO H & NOMURA T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. **Nature** Vol 459. 28/05/2009 doi:10.1038/nature08090

SCHUBERT HD, MORRIS WJ, TROKEL SL, BALAZS EA. The role of the vitreous in the intraocular pressure rise after neodymium-YAG laser capsulotomy. **Archives of Ophthalmology**. 1985 Oct;103(10):1538-42.

SCHUBERT HD, DENLINGER JL, BALAZS EA. Exogenous Na-hyaluronate in the anterior chamber of the owl monkey and its effect on the intraocular pressure **Experimental Eye Research** Volume 39, Issue 2, August 1984, Pages 137–152.

SILVEIRA LCL, SAITO, CA, LEE BB, KREMERS J, FILHO MS, KILAVIK BE, YAMADA ES, PERRY VH, Morphology and physiology of primate M- and P-cells, **Progress in Brain Research**, 2004 Vol. 144, 21- 46p, Chapter 2

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**. 2001; 10: 143-213.

anexos

Measurement of tear production in black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) using three different methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and standardized endodontic absorbent paper points

Rogério R. Lange, Leandro Lima and Fabiano Montiani-Ferreira

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Medicina Veterinária, Rua dos Funcionários, 1540, 80035-050, Curitiba – PR, Brazil

Address communications to:

F. Montiani-Ferreira

Tel: (41) 3350-5724

Fax (41) 3350-5725

e-mail: montiani@ufpr.br;
ferreir9@cvm.msu.edu

Abstract

Objective: To report normal tear production of healthy adult black-tufted marmosets and propose a novel alternative for the measurement of the aqueous portion of tear production in animals with small eyes.

Animal studied: Black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*).

Procedures: Tear production of 19 animals was evaluated by the following methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and the novel use of standardized endodontic absorbent paper points. These methods and results were compared. Additionally, blink frequency and palpebral fissure length were measured.

Results: Modified Schirmer's test I, mean = -0.46 ± 3.41 mm/min; Phenol red thread, mean = 13.27 ± 5.41 mm/15 s.; Standardized endodontic paper points, size 30, mean = 9.32 ± 3.09 mm/min; Mean palpebral fissure length = 7.83 ± 0.72 mm. Blink frequency, mean = $20.27 \pm 5.92/5$ min.

Conclusions: Normal parameters for blink frequency, palpebral fissure length and tear production measurement are presented. The palpebral fissure of black-tufted marmoset is very small and tear production is one of the lowest reported for all animal species. A novel and practical alternative for tear production measurement using standardized endodontic absorbent paper points is presented and is indicated for animals with small eyes.

Key Words: black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*), endodontic absorbent paper points, phenol red tear test, primate, Schirmer's tear test

INTRODUCTION

In general, the eye bulb of nonhuman primates is very similar to that of human beings. Primates have been used over the years as experimental models for ophthalmic studies.^{1–3} Historically, comparative ophthalmic experimental studies initially used Old World primates; however, their high cost, low fecundity associated with their large size and general handling difficulties have limited their use. The choice then fell on the New World primates, such as those in the genera *Callithrix* and *Saguinus*, because of their small size, low cost, ease of handling and prolific nature with the ability to produce up to four offspring per year.^{4,5} Nevertheless, Old World primates, particularly macaques, are still widely used in ophthalmic comparative research.¹ Marmosets of the genus *Callithrix* are not at risk of extinction, reproduce well in captivity and represent a less expensive alternative to be

used as animal models for human ocular diseases. And although there is a distinct size difference, marmosets and human beings are phylogenetically close.⁵ Brazil has the world's greatest natural diversity of primates, with a total of 133 species.⁶ The black-tufted marmoset *Callithrix penicillata* and white-tufted marmoset *Callithrix jacchus* were originally distributed mainly throughout Brazil's Northeast Region, from the northeast to the north of the of the São Francisco River and to the east of Parnaíba River.⁷ In recent years, however, both species were artificially introduced into other Brazilian regions and currently can be found in the entire country. These animals compete for food with indigenous small mammal species and are considered a threat to the ecological balance.^{8,9}

Several studies have collected normal physiological ophthalmic parameters in primates such as the rhesus monkey (*Macaca mulatta*),¹⁰ capuchin monkey (*Cebus apella*),¹¹ and

squirrel monkey (*Saimiri sciureus*).¹² However, tear production studies to establish reference values have not been done for most small primates, which may be due to the small size of their eyes and the consequent difficulty to acquire accurate measurements.¹³

Tear production can be measured in several ways. Schirmer's tear test I (STTI) is the most commonly used test in human beings,¹⁴ domestic animals such as dogs,¹⁵ cats,¹⁵ horses,¹⁶ guinea pigs,¹⁷ ferrets,¹⁸ chinchillas,¹⁹ and even wild animals like capuchin monkeys¹¹ and capybaras,²⁰ among others. Another test used to measure tear production is the phenol red cotton thread tear test (PRT). Normal results for this test have been described in human beings,²¹ dogs,²² guinea pigs,¹⁷ and specifically for animals with small palpebral fissures such as Psittaciformes.²³

To improve the accuracy of ophthalmic diagnoses in non-domestic species, it is essential to understand their normal physiological ocular characteristics. There is no information on tear production in marmosets (*Callithrix* sp.) and the literature on ophthalmic parameters in New World primates is certainly limited. Yet, measurement of the aqueous fraction of the lacrimal production in each patient is an important clinical parameter to diagnose different disease conditions, such as excess lacrimation or keratoconjunctivitis sicca.¹³ Thus, this study aims to establish normal ophthalmic parameters for tear production in marmosets (*Callithrix* sp.) using two well-known tests, phenol red thread (PRT) and modified Schirmer's tear test I (mSTTI) and proposes an innovative method to measure tear production in animals with very small eyes, such as marmosets. Additionally, palpebral fissure length and blink frequency were evaluated in this species, because these parameters directly affect the measurement of lacrimal production and spread of the tear film, respectively.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation – ICMBIO through the authorization of activities and by the Ethics Committee on Animal Use from the Sector of Agricultural Sciences, Federal University of Paraná.

The animals used in the experiment, a total of 19 young, sexually mature, adults (12 females and seven males) black-tufted marmosets (*C. penicillata*), were captured at Barigui Park in Curitiba, Paraná, Brazil (25°25'40" south; 49°16'23" west), by the use of traps and manual capture with catch nets. Barigui Park marmosets are nonindigenous animals and their removal is part of a wildlife restoration program developed by the Federal University of Paraná in partnership with the Curitiba City Hall. All procedures involving the use of live animals were conducted in accordance with the ARVO statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Each marmoset was identified with an implanted transponder (AnimalTag Korth, RFID, São Paulo, Brazil) which could be recognized by the appropriate scanner.

Before beginning the study, complete physical and ophthalmic examinations were carried out to exclude all animals showing signs of eye and/or systemic diseases. Baseline data included hematological evaluation, serum chemistry profile, presence of endo- and ectoparasites, as well as radiographic and ultrasonographic evaluations. Different evaluators performed the various ophthalmic tests; however, to avoid interobserver discrepancy, each evaluator always performed the same type of test in all animals during the study.

The sequence of procedures carried out in the study was as follows: (i) Measurement of the palpebral fissure length using a caliper; (ii) Eye blink frequency, (iii) mSTTI; (iv) PRT; (v) Standardized endodontic absorbent paper point tear test (PPTT).

The marmosets were gently restrained manually to carry out the ophthalmic tests. A leather glove protected the left hand for restraint of the animal, and the right hand of the examiner was free to perform the tests. The animal was held with his thoracic limbs pressed against his body, while the pelvic limbs were free to move. The examiner then would rest his gloved hand holding the animal on a table surface and wait for approximately 2 min before starting to perform the tests with his right hand. During that time, the animals would become visibly calmer. Only one test was performed each day to reduce stress on the animals and to avoid potential interference among tests.

The animals were housed in the animal facility at the Federal University of Paraná Veterinary Hospital. They were surgically sterilized after this study and transferred to Curitiba Zoo to become permanent members of the collection.

Modified Schirmer's tear test I

The test was performed using STT sterile paper strips (Ophthalmos, São Paulo, Brazil). Owing to the small palpebral fissure of the marmosets, the absorbent paper strips used were cut lengthwise in half (reducing the width of 5–2.5 mm) (Fig. 1), creating a modified version of STTI (mSTTI) as previously used and reported²⁴ in neonatal dogs

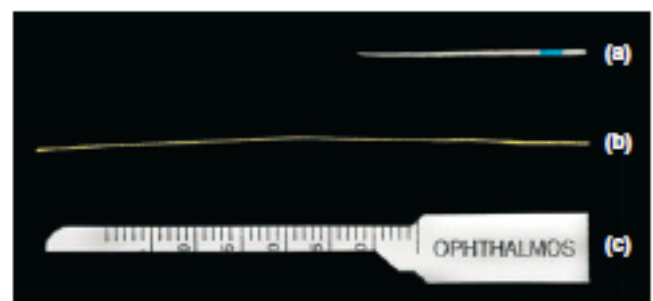


Figure 1. Material used in the measurement of the aqueous fraction of the tear film in black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*). (a) Standardized endodontic absorbent paper point; (b) Phenol red thread; (c) Schirmer's test strip cut in half lengthwise.

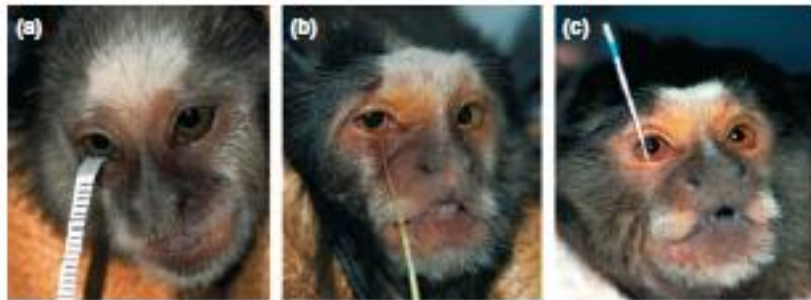


Figure 2. Images of the tests being performed on black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) to measure the aqueous fraction of the tear film. (a) Modified Schirmer's test I. Note that the width of half of a Schirmer's test strip occupies almost the entire palpebral fissure. There is limited space to insert the strip and this makes the procedure difficult in this species. (b) Phenol red thread test being performed. Note the color change where the thread was moistened. (c) Standardized endodontic absorbent paper point securely inserted in the conjunctival fornix, which was performed by only one person and without the use of any instruments for eyelid manipulation.

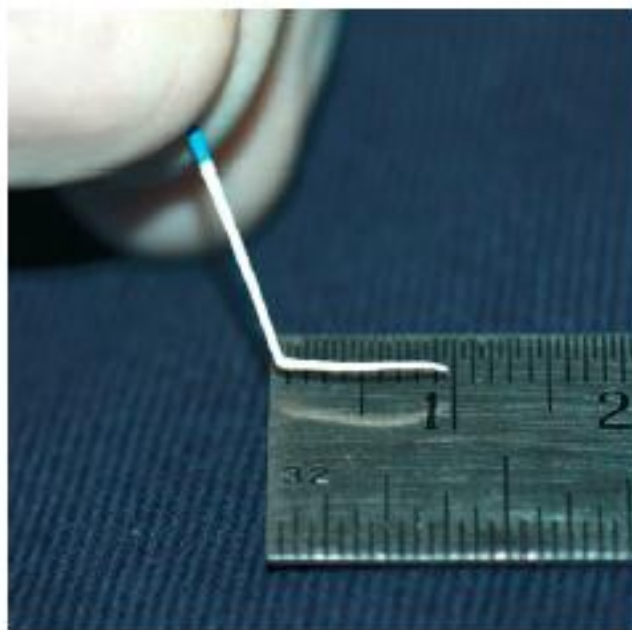


Figure 3. Representative photograph demonstrating how the absorption of the aqueous fraction of the tear was measured in the standardized endodontic absorbent paper points. The end portion of the paper point moistened with tears becomes flexible and bends when compressed against a hard surface, allowing reading and interpretation of the test in millimeters.

of small breeds. Because of the low tear production in most of the eyes, the very first graded line (mm) of the tear strip was often not reached, so the distance from this first line (or notch level – at the other half of the paper strip) to the point where the strip was moistened was measured. These values received a negative sign. Values above the first line received a positive sign. The measuring methodology employed in the study was previously presented by Trost *et al.*¹⁷

The mSTTI was performed with the marmoset manually restrained by an assistant while the operator gently pulled the lower eyelid with Adson-Brown blunt forceps to facilitate the insertion of the mSTT strip into the conjunctival

fornix (Fig. 2). The paper strip was removed from the eye after 1 min and measured.

Phenol red cotton thread tear test

The PRT was performed using threads impregnated with phenol red, a pH indicator, (Zone-Quick®; Menicon Inc., Clovis, CA, USA) that change from yellow to red when they absorb slightly alkaline tears. The procedure was carried out similarly to the mSTTI, with the marmosets manually restrained, while the operator gently used Adson-Brown forceps to pull down the lower eyelid and inserted the PRT thread into the conjunctival fornix with another pair of small forceps (Fig. 2). The thread was removed after 15 s. As the conjunctival fornix depth is very small in these animals, the folded end of the thread (previously standardized to 3 mm in length) could not be fully inserted. The entire length of the red portion, including the portion proximal to the fold was measured and recorded in millimeters.

Sterile standardized endodontic absorbent paper point tear test

Standardized endodontic absorbent paper points (Roeko Color size 30; Langenau, Germany) were used in this study. These paper points are extensively used in dentistry, more precisely for endodontic procedures, because of their highly absorptive properties. Only one evaluator was necessary to measure the tear production with the endodontic absorbent paper point. The marmoset was manually restrained with one hand and the point of the paper was inserted into the bottom of the conjunctival fornix with the other hand. The point of the paper remained there during the 1-min evaluation time (Fig. 2). After the measurement, the paper point was removed for the reading of the aqueous fraction of the tear (Fig. 3).

Palpebral fissure length

Palpebral fissure length was measured using a stainless steel caliper with an LCD display and an accuracy of ± 0.02 mm

Table 1. Results of the tests used to measure the tear aqueous portion, palpebral fissure length, and eye blink frequency of black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*)

Parameters	Mean value	Median	SD	CV
Modified Schirmer's tear test I (mm/min)	-0.46	-1	3.41	-7.35
Phenol red thread tear test (mm/15 s)	13.27	13	5.41	0.41
Standardized endodontic absorbent paper point 0.30 mm tear test (mm/min)	9.32	9	3.09	0.33
Palpebral fissure length (mm)	7.83	7.77	0.72	0.09
Eye blink frequency (5 min)	20.27	22	5.92	0.29

SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

(Neiko Tools; Klamath Falls, OR, USA). The animals were manually restrained to measure the palpebral fissure length of both eyes.

Eye blink frequency

The eye blink frequency was measured with the marmosets under very gentle manual restraint, avoiding as much stress as possible, for a period of 5 min and counting the total number of blinks in this period. The evaluation was performed with the aid of a timer and a mechanical hand tally counter.

Statistical analyses

Descriptive statistical analyses and the Shapiro-Wilk normality test were performed on the data. Unpaired *t*-tests were then used for data comparison, between right and left eyes and between males and females. *P*-values <0.05 were deemed significant. JMP (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) software was used to perform both, descriptive and inferential statistical analyses.

RESULTS

The Shapiro-Wilk normality test demonstrated that the data errors were normally distributed. Descriptive statistics data of palpebral fissure length, eye blink frequency and tear production tests (mSTTI, PRT and PPTT) are summarized in Table 1.

Modified Schirmer's I tear test

The range of the mSTTI result was 12 mm. Values ranged from -5 to 7 mm/min (mean value -0.46 ± 3.41 mm/min). The coefficient of variation was -7.35.

The right eye mean value was -0.29 ± 3.53 mm/min and the left was -0.63 ± 3.33 mm/min. According to gender, the mean values were -0.35 ± 3.56 mm/min for females and -0.75 ± 3.08 mm/min for males. There were no significant differences for mSTTI values between males and females ($P = 0.66$) or between right and left eyes ($P = 0.69$).

Phenol red thread tear test

The range of the PRT results in marmosets was 20 mm. Values ranged from 4 to 24 mm/15 s (mean value 13.27 ± 5.41 mm/15 s). The coefficient of variation was 0.41.

The right eye mean value was 13.40 ± 4.95 mm/15 s and the left was 13.12 ± 5.94 mm/15 s. According to gender, the mean values were 13.30 ± 5.96 mm/15 s for females and 13.21 ± 4.35 mm/15 s for males. There were no significant differences between males and females ($P = 0.96$) or between right and left eyes ($P = 0.88$).

Standardized endodontic absorbent paper point tear test

The range of the results using the endodontic absorbent paper point tear test (EAPPTT) was 19 mm. Values ranged from 3 to 22 mm/min (mean value 9.32 ± 3.09 mm/min). The coefficient of variation was 0.33 mm/min.

The right eye mean value was 10 ± 3.72 mm/min and left eye was 9.67 ± 3.58 mm/min. According to gender, the mean values were 9.64 ± 2.98 mm/min for females and 10.21 ± 4.73 mm/min for males. There were no significant differences between males and females ($P = 0.63$) or between right and left eyes ($P = 0.77$).

Palpebral fissure length

The range of the palpebral fissure length measurement data was 2.98 mm, that is, ranged from 6.66 to 9.64 mm with a mean value of 7.83 ± 0.72 mm.

The right eye mean value was 7.88 ± 0.71 mm and left eye was 7.77 ± 0.74 mm. According to the gender, the mean values were 7.74 ± 0.73 mm for females and 7.79 ± 0.72 mm for males. There were no significant differences between males and females ($P = 0.43$) or between right and left eyes ($P = 0.56$).

Eye blink frequency

The amplitude of the eye blink frequency results was 17. Values ranged from 13 to 30 with a mean value of $20.27 \pm 5.92/5$ min.

According to the gender, the mean values were $21.2 \pm 6.54/5$ min for females and $19.5 \pm 5.86/5$ min for males. There were no significant differences between males and females ($P = 0.66$).

DISCUSSION

No reference values for tear production have been reported for marmosets. However, the literature describes STT values in other primates such as Rhesus monkeys (*M. mulatta*), with a mean value of 15.1 mm/min (6-24 mm/min),⁶ capuchin monkeys (*C. apella*) 14.9 ± 5.1 mm/min,¹¹ squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) 16.9 ± 1.2 mm/5 min,¹² and human beings 10.30 ± 11.55 mm/5 min.¹⁴ Results described in the literature for these other primates showed higher values than the ones for marmosets found in our study. These primates, however, are larger than marmosets

and have a much wider palpebral fissure (wider than 5 mm), which allows the standard STT to be performed. As the marmosets' palpebral fissure length is considerably narrower, it was necessary to use the mSTT, with the strips cut in half lengthwise.

Several different techniques have been used to measure tear production in species with smaller eyes.²⁵ Fujihara *et al.*,²⁶ used mSTT strips that were 1 mm wide for 1 min in rats, while Hoffman *et al.*²⁷ used mSTT strips that were 0.5 mm wide for 2 min. Results obtained by these authors are very low (around 2 mm). However, these values are not comparable with those obtained for the species studied in our investigation, because the methods differ significantly.

The guinea pig (*Cavia porcellus*), although phylogenetically distant from marmoset, demonstrated very low values (0.36 ± 1.09 mm/min).¹⁷ However, this value was obtained using regular 5 mm wide Schirmer's test strips. The guinea pig presents some species-specific differences, such as a low mean eye blink frequency (3.24/10 min), compared with other animals. Nonetheless, its tear production was higher than the one found in the marmosets, even though in marmosets mean eye blink frequency is considerably higher (40.54/10 min). It is worth mentioning that it was impossible to measure blink frequency with the animals free in the cage. Marmosets are naturally high-strung and move constantly and even try to hide, particularly while being observed by someone outside the cage. This difficulty was overcome by evaluating the blink frequency while gently restraining the animals. The animals became increasingly adapted to the physical restraint procedure, as the investigation days continued, because it was performed in a quiet environment, with the same person performing the physical restraint, clinical tests, and observations on each animal. The procedure became 'routine' and the animals would become calmer, tolerating most of the procedures, with the only exception being the mSTT test (discussed further below). Thus, the animals were apparently very calm relaxed and the blink frequency data acquisition was precise and uncomplicated to perform this way. We believe data acquisition was minimally confounded by animals being under physical restraint.

The depth of the conjunctival fornix was not measured in the studied marmosets or in the guinea pigs. However, our subjective impression was that the conjunctival fornix of marmosets is much shallower than that of the guinea pigs. It is possible to imagine that a deeper fornix stores more residual tears than a shallow one, so this might partially explain the lower values found in the marmosets. Furthermore, the influence of the depth of the conjunctival fornix on STT test results has not been investigated yet. Thus, further studies could be carried out to answer this question in the future.

We found that even though the palpebral fissure has 7.83 mm in length, a regular STT, using commercial 5-mm wide strips, is not possible to perform because the palpebral tissue has little elasticity, necessitating the lengthwise halving. Even with a modified STT strip, the insertion of the

paper in the conjunctival fornix was still somewhat difficult. We also question the accuracy of the test because of loss of standardization, because the mSTT strip is always produced by hand and the width likely varied from strip to strip, despite the care to standardize the procedure. Another point of difficulty in performing this test was the necessity for two people to test an animal, because one person had to restrain the animal and perform the test, while another had to gently pull the eyelid to facilitate the insertion of the strip into the conjunctival fornix.

In our opinion, it is important to measure values lower than 0 mm exactly, because if all the negative values (below the first graded line) were recorded as 0 mm, the mean mSTT test would be recorded as higher than their actual value, exactly as it was previously described in guinea pigs.¹⁷ It is also important to state that owing to the small size of the marmosets' eyes, the insertion of the modified strip in the conjunctival fornix was not possible without touching the cornea, which might have possibly caused some artifact in tear production because of the irritating stimulus.

The PRT is used in situations where the tear production is reduced or in animals with lower basal tear production, such as the guinea pig.¹⁷ It is relatively easy and convenient and has a shorter evaluation time. Despite the reported convenience to perform this test in other animals, in our study some difficulties were noted in its use in marmosets. Two people were required to properly insert the tip of the thread into the conjunctival fornix, one to restrain the animal and the other to gently pull down the lower eyelid with forceps while with the tip of the thread is inserted into the conjunctival sac with another pair of blunt forceps. Owing to the small size of these animals' eyelids, and the relative flexibility of the thread, forceps manipulation was challenging.

The standardized endodontic absorbent paper points (American National Standards Institute and American Dental Association ANSI/ADA Specification n. 73) are made from Manila hemp (*Musa textilis*) or abaca plant. These commercially available paper points are commonly used in dentistry, mainly for endodontic procedures, because of their highly absorptive properties to promote drying after canal irrigation, carry medicines such as antiseptics and disinfectants,²⁸ and even to assist in collecting samples for microbiological culture,²⁹ because they are sterile. The paper points have a conical shape and are available from several brands. The standard length is 28 mm. The tips range from 0.15 to 0.80 mm in diameter in intervals of 0.05 mm. The standardized endodontic absorbent paper points from Roeko Color size 30 with an extremity of 0.3 mm in diameter was chosen because of better performance observed in a previous comparative study between twelve brands that investigated absorbency control standards.³⁰ The evaluation of tear production using the paper points offered a practical alternative, even without the aid of a second person to manipulate the eyelids. As the paper point is somewhat more rigid than the STT strip, one person was able to restrain the patient with ease, insert the paper into the conjunctival for-

nix without touching other structures and was even able read the test result by himself. The width of the paper point is compatible with the size of the palpebral fissure in this species and probably many other small wild and exotic animal species. Although the tip of paper is not graded, it was easy to read the proposed test, because the end portion of the paper when moistened with tears becomes flexible and bends when pressed against a hard surface (Fig. 3), such as a ruler, allowing tears aqueous fraction reading in millimeters. Additionally, data obtained with EAPTT had the lowest variation (lowest standard deviation and coefficient of variation) (Table 1), compared with mSTT1 and PRT.

This study presented reference values for tear production in marmosets obtained from the conventional tear tests, mSTT and PRT. Additionally, it includes anatomic and physiologic information about blink frequency and biometric data concerning the palpebral fissure length. We believe the information is valuable for researchers and clinicians, especially to diagnose subtle pathological changes in the tear film in this species. The standardized EAPTT is potentially applicable to small mammals, particularly wild and unconventional pets with small eyes, such as rats, mice, hamsters, gerbils, hedgehogs, sugar glider and guinea pigs, and also for small birds, amphibians, and reptiles. At least in marmosets, EAPTT certainly proved to be more practical than the other conventional tests. Possibly in the future, when commercially produced for this purpose, the addition of the phenol red to the endodontic absorbent paper points could make this test even more practical and user-friendly. However, for general veterinary use, more studies with the EAPTT establishing tear production rate for other animal species are required.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Curitiba City Hall, specially Curitiba Zoo by providing the food and transponders used, as well as hosting the animals at the end of the measurements; The Municipal Guard for their support in the capturing procedures performed in Barigui Park; Dr. Gillian Shaw, our long time collaborator; The Residency Program of the Federal University of Paraná Veterinary Hospital for their support in all procedures performed with the animals of the experiment and in their routine care.

REFERENCES

- Girard MJ, Suh JK, Bortlang M *et al*. Biomechanical changes in the sclera of monkey eyes exposed to chronic IOP elevations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2011; 52: 5656-5669.
- Jaax GP, Graham RR, Rozniarek H. The Schirmer tear test in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Laboratory Animal Science* 1984; 34: 293-294.
- Benirschke K, Richart R. Spontaneous acute toxoplasmosis in a marmoset monkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1960; 9: 269-273.
- Hampton-Junior JK, Hampton SH, Landwehr BT. Observations on a successful breeding colony of the marmoset (*Oedipomias oedipus*). *Folia Primatologica* 1966; 4: 265-287.
- Epple G. Maintenance breeding and development of marmoset monkeys in captivity. *Folia Primatologica* 1970; 12: 56-76.
- Chiarello AG, Aguiar LMS, Cerqueira R, *et al*. Mamíferos ameaçados de extinção do Brasil. In: *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. (eds Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP) Ministério do Meio Ambiente - Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2008; 681-874.
- Auricchio P, Granstau R. *Primates do Brasil*, 1st edn. (ed. Terra Brasilis) Terra Brasilis, São Paulo, SP, Brazil, 1995: 352.
- Rylands AB, Bernardes ATA. *Primatology no Brasil*, 3rd edn. (ed. Fundação Biodiversitas) Fundação Biodiversitas, Juiz de Fora, MG, Brazil, 1991; 352.
- Primack RB, Rodrigues E. Ameaças à diversidade biológica. In: *Biologia da conservação*, 1st edn. (eds Primack RB, Rodrigues E) Vida, Londrina, PR, Brazil, 2001; 69-133.
- Cleary PE, Ryan SJ. Histology of wound, vitreous, and retina in experimental posterior penetrating eye injury in the rhesus monkey. *American Journal of Ophthalmology* 1979; 88: 221-231.
- Montiani-Ferreira F, Shaw G, Mattos BC *et al*. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Veterinary Ophthalmology* 2008; 11: 197-201.
- Maitchouk DY, Beuerman RW, Ohia T *et al*. Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. *Archives of Ophthalmology* 2000; 118: 246-252.
- Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Experimental Eye Research* 2004; 79: 613-621.
- Strubbe DT, Gelatt KK. Chapter 11 ophthalmologic examination and diagnostic procedures, 427-466. In: *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edn. (ed. Gelatt KK) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999; 1544.
- Serruya LG, Nogueira DC, Hida RY. Comparação entre os testes de Schirmer em olhos abertos e fechados em indivíduos normais. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 2009; 72: 65-67.
- Matts BS, Bryan GM, Prieto DJ. Schirmer tear test measurements and lysozyme concentration of equine tears. *Journal of Equine Medical Surgery* 1977; 1: 427.
- 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* 2001; 10: 143-146.
- Montiani-Ferreira F, Mattos BC, Russ HH. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9: 209-213.
- Lima I, Montiani-Ferreira F, Tramonin MH *et al*. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13: 14-25.
- Montiani-Ferreira F, Trappel J, Tramonin MH *et al*. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. *Veterinary Ophthalmology* 2008; 11: 386-394.
- Hida RY, Nishiwaki-Dantas MC, Tsubota K. Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 2005; 68: 433-437.
- Brown MH, Galland JC, Davidson HJ *et al*. The phenol red thread tear test in dogs. *Veterinary Comparative Ophthalmology* 1996; 6: 274-277.
- Sakamoto R, Bennett ES, Hengy VA. The phenol red thread tear test: a cross-cultural study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1993; 34: 3510-3514.

24. Silva EG, Galera PD. Evaluation of tear formation during neonatal period in small breed dogs, using the Schirmer tear test: STT & STT2. Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Washington, DC. *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7: 437-453.
25. Holdt E, Rosenthal K, Shofer FS. The phenol red thread tear test in large Psittaciformes. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9: 109-113.
26. Fujihara T, Marakami T, Fujita H *et al*. Improvement of corneal barrier function by the P2Y₂ agonist INS365 in a rat dry eye model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2001; 42: 96-100.
27. Hoffman RW, Alsbaugh MA, Waggle KS *et al*. Sjögren's syndrome in MRL/lp mice. *Arthritis and Rheumatism* 1984; 27: 157-165.
28. Wiggs RB, Lobprise HB. Basic endodontic therapy. In: *Veterinary Dentistry: Principles and Practice*. (eds Wiggs RB, Lobprise HB) Lippincott-Raven, Philadelphia, NY, 1997; 280-324.
29. Harroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiology Immunology* 1999; 14: 326-330.
30. Pumarola-Suné J, Sola-Vicens L, Sentís-Vilàta J *et al*. Absorbancy properties of different brands of standardized endodontic paper points. *Journal of Endodontics* 1998; 24: 12.



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Veterinary Ophthalmology*.

Manuscript ID: VOP-12-08-0871

Title: Reference values for the production of the aqueous fraction of the tear film measured by the standardized endodontic absorbent paper point test in different exotic and laboratory animal species

Authors: Langa, Rogério
Lima, Leandro
Przydziminski, Andreise
Montiani-Ferreira, Fabiano

Date Submitted: 14-Aug-2012

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.9.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)



Reference values for the production of the aqueous fraction of the tear film measured by the standardized endodontic absorbent paper point test in different exotic and laboratory animal species

Journal:	<i>Veterinary Ophthalmology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lange, Rogério; Federal University of Paraná, Veterinary Medicine Department Lima, Leandro; Federal University of Paraná, Veterinary Medicine Department Przydzimirski, Andreise; Federal University of Paraná, Veterinary Medicine Department Montiani-Ferreira, Fabiano; Federal University of Paraná, Veterinary Medicine Department; Michigan State University, Small Animal Clinical Sciences
Keywords:	<i>Sicalis flaveola</i> , <i>Sporophila angolensis</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Trachemys scripta elegans</i> , endodontic absorbent paper points tear test

Reference values for the production of the aqueous fraction of the tear film measured by the standardized endodontic absorbent paper point test in different exotic and laboratory animal species

ABSTRACT

The aqueous fraction of the tear film and the horizontal palpebral fissure length (HPFL) were measured in exotic and laboratory animals, specifically saffron finches (*Sicalis flaveola*), chestnut-bellied seed-finches (*Sporophila angolensis*), red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*), rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). These species possess small eyes making it difficult to perform the typical Schirmer tear test. Measurement of the aqueous fraction of the tear was performed using the standardized endodontic absorbent paper point tear test (PPTT), accomplished with manual restraint by a single operator. The following results were obtained: Saffron finches (n = 42) HPFL (4.46 ± 0.09 mm) and PPTT (5.10 ± 0.26 mm); Chestnut-bellied seed-finches (n = 38) HPFL (4.77 ± 0.05 mm) and PPTT (4.11 ± 0.34 mm); Red-eared sliders (n = 56) HPFL (8.59 ± 0.08 mm) and PPTT (8.79 ± 0.38 mm); Rats (n = 60) HPFL (6.45 ± 0.09 mm) and PPTT (6.18 ± 2.06 mm); Mice (n = 22) HPFL (3.59 ± 0.27 mm) and PPTT (4.39 ± 1.45 mm).

KEY WORDS: *Sicalis flaveola*, *Sporophila angolensis*, *Trachemys scripta elegans*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, standardized endodontic absorbent paper points tear test.

INTRODUCTION

The aqueous fraction of the tear film is an important physiological parameter evaluated during the ophthalmic examination of animal species of veterinary interest. There are few literature sources for normal ocular parameters in wild animals due to the great number of species. Therefore, it is important to establish reference values for the tests routinely used in domestic animals^{1,2}. In many species, the small size of the globe hinders the use of conventional techniques for measuring the aqueous fraction of the tear film, necessitating alternative measurement techniques for which there are no standard reference values. This is true even for well-known laboratory animals such as mice³. Schirmer's tear test (STT), originally developed for human medical use^{4,5} is the most widely used and accepted method to measure the aqueous fraction of the lacrimal film in veterinary medicine as well^{6,7,8}. STT uses standard absorbent five mm-wide paper strips. In human patients STT was originally carried out in five minutes. In order to minimize ocular discomfort and save time, Nelson⁹ proposed shortening the standard Schirmer I test by performing it in one minute instead of five minutes. In animals the test time also was reduced to one minute in order to facilitate handling and reduce stress⁵. STT cannot be performed in animals with small eyes, having a palpebral fissure length smaller than the width of the strip (0.5 cm) or in species whose tear production is lower than could be measured in the STT. In order to avoid these difficulties, alternative techniques have been proposed by several authors, including aseptically cutting the Schirmer strips in half or in different widths or alternatively reducing the STT time^{1,2,10,11}. These method variations, however, may preclude comparison of the results³ and sometimes require optical equipment for reading the results¹¹. Another alternative is the cotton thread embedded with phenol red. It is a commercially available test that can be applied, usually using small forceps, in the lateral canthus for 60 seconds. Nevertheless, the high standard deviation recorded for this method in the literature

1
2
3 suggests the need for further refinements. Despite the lack of available data, the phenol
4 red cotton thread test may be used in animal models of dry eye, such as the MRL/I
5 mice, and rats, because of the reduced size (width) of the cotton threads compared to the
6 filter paper of the Schirmer test³. The paper points tear test (PPTT)¹² aims to overcome
7 these limitations and enable the comparison among species. The PPTT uses sterile
8 standardized paper cones or tips, originally developed for endodontics. These sterile
9 paper cones are standardized with a distal diameter of 0.30 mm¹³, allowing insertion
10 into the conjunctival fornix even in the smallest species of interest to the veterinary
11 ophthalmologist. It was originally proposed by Lange et al.¹² as an alternative to
12 overcome the difficulties found while measuring tear production in black-tufted
13 marmosets (*Callithrix penicillata*). The present article is a logical step forward from the
14 original work, providing reference PPTT values for two bird species, the chestnut-
15 bellied seed-finch - *Sporophila angolensis* - and the saffron finch - *Sicalis flaveola*, for
16 one reptile, the red-eared slider - *Trachemys scripta elegans*, and for two laboratory
17 species, the mouse - *Mus musculus* - and the rat - *Rattus norvegicus*. HPFL was
18 measured in all these species as well.

21 MATERIAL AND METHODS

22
23
24 This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use from the
25 Sector of Agricultural Sciences, Federal University of Paraná.

26 The lacrimal production measurements were performed in an unheated
27 enclosure. The ambient temperature and relative humidity were measured using a digital
28 thermo-hygrometer (Mod 30.5000.02, TFA Technology HK Limited, Hong Kong,
29 China). The room was maintained with 78% humidity and 20.9°C temperature for
30 saffron finches, 81% humidity and 19.5°C for chestnut-bellied seed-finches, 82%
31 humidity and 19.8°C for red-eared sliders, 90% humidity and 20°C for rats, 86%
32 humidity and 18.2°C for mice.

33 The saffron finches (*Sicalis flaveola*), the chestnut-bellied seed-finches
34 (*Sporophila angolensis*) as well as the red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*)
35 were kindly provided by the Screening Center of Wildlife (CETAS) PUCPR-IBAMA,
36 located in Tijucas do Sul, PR, Brazil. Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and Swiss Webster
37 mice (*Mus musculus*) were provided by the Curitiba Zoo, Curitiba, PR, Brazil. The
38 general appearances of the animals studied are shown in Figure 1. The numbers of
39 animals investigated were: saffron finches (n = 21) ten males, seven females and four
40 unknown gender; chestnut-bellied seed-finches (n = 19) ten males and nine females;
41 red-eared slider (n = 28) ten males and eighteen females; rats (n = 30) only females; and
42 mice (n = 22) nineteen males and three females. All the animals used in the
43 investigation were sexually mature adults.

44 HPFL measurements were performed using a stainless steel digital caliper with
45 an LCD display (PD-150, 0-150 mm, accuracy: 0.01 mm; Vonder, Curitiba, PR, Brazil).

46 In order to measure the aqueous fraction of the tear film, the overall
47 methodology for PPTT proposed by Lange et al.¹² was used. In brief, under physical
48 restraint one standardized absorbent paper point was inserted into the lower conjunctiva
49 fornix of the right eye and after 20 seconds another paper point was inserted in the
50 fornix of the left eye. Both paper points are removed after one minute. The wetted
51 portion of the paper point was measured using a ruler with millimeter scale. The length
52 of the wetted portion of the paper point can be identified by the color change that occurs
53 when it is wetted or by bending the wetted end against a rigid surface¹².

1
2
3 The absorbent paper strip used was (Roeko Color number 30, Langenau,
4 Germany) (Figure 2), with 0.30 mm diameter strip. This particular paper strip model,
5 size and brand was chosen because in a comparative test with other twelve brands it has
6 shown a good absorption capacity with lower standard deviation values, indicating a
7 better standardization control when industrially produced¹³.
8

9
10
11 The saffron finches and the chestnut-bellied seed-finches were removed from
12 their cages by manual capture and then were carefully physically restrained to allow the
13 PPTT and HPFL procedure. A single operator used one hand to hold the bird
14 immobilized while the other hand could insert the paper strip in the conjunctival fornix
15 of each eye.

16
17 The red-eared slider handling was performed as follows: the animals were
18 removed from the water tank where they were housed at CETAS two hours prior to the
19 PPTT and HPFL measurements. After being removed from the water tank, the animals
20 were dried with towels and placed in a dry plastic box where they remained until the
21 time of the tear testing. Subsequently, for the PPTT and HPFL measurements the red-
22 eared sliders were physically restrained and the head was gently immobilized. During
23 restraint, extreme care was taken so that there was no excessive discomfort or excessive
24 compression on the animals' bodies.

25
26 For the PPTT procedure and the HPFL measurement on rats, the animals were
27 carefully manually restrained by holding them dorsally by the cervical region with the
28 index finger and the thumb, supporting the animal body with the other fingers of the
29 same hand, thus preventing the paper tip withdraw by the animals' paws.

30
31 Mice were carefully restrained by the ears, both held between the index finger
32 and the thumb of one hand of the operator, while the other hand proceeded to the
33 placement of the paper tips in the palpebral fornix and the measurement of HPFL.

34
35 General aspects of the PPTT measurements in the different species evaluated can be
36 seen on Figure 2.
37

38 39 Statistical analysis

40
41 Data obtained in this investigation were analyzed using descriptive statistics.
42 The Shapiro-Wilk normality test was initially performed. Following this procedure,
43 unpaired t-tests were used to compare two groups of independent subjects presenting
44 PPTT values as continuous numeric data in cm of paper-wetting. Data were deemed
45 significant when $P < 0.05$. All tests were performed using SAS v. 9.2 (SAS Institute,
46 Cary, NC, USA). Additionally, paired t-test analyses of paired tear production were
47 performed in the same individuals, comparing left to right eyes.
48

49 50 51 52 RESULTS

53
54
55 Shapiro-Wilk test showed that the data errors were normally distributed.
56 Descriptive statistics of HPFL and PPTT are summarized in Table 1.
57
58
59
60

1
2
3 For all species evaluated, no significant differences were observed comparing
4 results obtained for PPTT and HPFL between males and females ($P > 0.05$) or between
5 right and left eyes ($P > 0.05$).
6

7 DISCUSSION

8
9 The PPTT method has shown to be easily performed on all species evaluated,
10 even those with very small eyes such as mice and saffron finches. For all species of
11 birds, reptiles and mammals tested the processes of restraint and insertion of the paper
12 points in the conjunctival fornix of the lower eyelids could all be performed by a single
13 operator. Additionally, measuring the aqueous fraction of the tears using the PPTT
14 method requires a short period of restraint and produces apparently minimal discomfort
15 for all species evaluated, and there were no obvious adverse reactions attributable to
16 stress.
17

18 It was possible to apply the PPTT in both eyes simultaneously using a time gap
19 of 15-30 seconds from the insertion of the paper strip into the conjunctival fornix to its
20 placing into the contralateral one. This practice resulted in a reduction in restraint time
21 for the bilateral assessment and hence a reduction in total restraint time, thereby
22 reducing stress.
23

24 Among the five animal species evaluated using PPTT, the two bird species were
25 the easiest ones to perform in terms of handling. The third eyelid, which is very mobile,
26 did not cause displacement of the somewhat unyielding paper points inserted into the
27 palpebral fornix. On the other hand, Schirmer test strips are commonly displaced by
28 birds' third eyelids. Although the red-eared sliders need proper restraint for the
29 immobilization of the head, the implementation of the procedure was also very
30 practical. Mice were certainly the most difficult animals to handle and perform the
31 PPTT. Physical restraint was hard in this species due to the small body size and agility.
32 In most cases, mice reacted aggressively to the test, trying to bite the operator's fingers.
33 Moreover, the forelimbs had to be well immobilized; otherwise the animals would
34 quickly withdraw the paper points, using their paws with great dexterity. However, no
35 difficulties restraining rats were encountered. When the paper points were inserted
36 simultaneously into both eyes, animals often moved their heads more actively than
37 when they was inserted unilaterally. So, though it is possible to measure both eyes at the
38 same time, we suggest that in the future, PPTT should be performed individually on
39 each eye to facilitate the process for the evaluation of an animal.
40

41 No complications were observed following PPTT measurement in any species
42 evaluated. All animals returned to their enclosures without showing any signs of stress
43 or ocular disturbances such as secretion or blepharospasm.
44

45 PPTT results obtained for the five species studied do not allow comparisons with
46 the few reference values available in literature due to the intrinsic differences in the
47 methods used to obtain the data. For saffron finches, chestnut-bellied seed-finches and
48 red-eared sliders there are no measurement data of the aqueous fraction of the tear film
49 in the literature.
50

51 Regarding the practicality, the measurement of the aqueous fraction of the tear
52 film using PPTT was demonstrated to be highly feasible, particularly in birds, where the
53 animal interference was practically non-existent. Red-eared slider restraint requires
54 greater skill than birds. Restraining rats for the PPTT was much easier than restraining
55 mice. Although mice were more difficult to restrain, the procedure can also be
56 performed with some previous training for handling and after acquiring some familiarity
57 with the method.
58
59
60

1
2
3 For all species evaluated, no significant differences were observed comparing
4 results obtained for PPTT and HPFL between males and females ($P > 0.05$) or between
5 right and left eyes ($P > 0.05$).
6

7 DISCUSSION

8
9
10 The PPTT method has shown to be easily performed on all species evaluated,
11 even those with very small eyes such as mice and saffron finches. For all species of
12 birds, reptiles and mammals tested the processes of restraint and insertion of the paper
13 points in the conjunctival fornix of the lower eyelids could all be performed by a single
14 operator. Additionally, measuring the aqueous fraction of the tears using the PPTT
15 method requires a short period of restraint and produces apparently minimal discomfort
16 for all species evaluated, and there were no obvious adverse reactions attributable to
17 stress.

18
19 It was possible to apply the PPTT in both eyes simultaneously using a time gap
20 of 15-30 seconds from the insertion of the paper strip into the conjunctival fornix to its
21 placing into the contralateral one. This practice resulted in a reduction in restraint time
22 for the bilateral assessment and hence a reduction in total restraint time, thereby
23 reducing stress.

24
25 Among the five animal species evaluated using PPTT, the two bird species were
26 the easiest ones to perform in terms of handling. The third eyelid, which is very mobile,
27 did not cause displacement of the somewhat unyielding paper points inserted into the
28 palpebral fornix. On the other hand, Schirmer test strips are commonly displaced by
29 birds' third eyelids. Although the red-eared sliders need proper restraint for the
30 immobilization of the head, the implementation of the procedure was also very
31 practical. Mice were certainly the most difficult animals to handle and perform the
32 PPTT. Physical restraint was hard in this species due to the small body size and agility.
33 In most cases, mice reacted aggressively to the test, trying to bite the operator's fingers.
34 Moreover, the forelimbs had to be well immobilized; otherwise the animals would
35 quickly withdraw the paper points, using their paws with great dexterity. However, no
36 difficulties restraining rats were encountered. When the paper points were inserted
37 simultaneously into both eyes, animals often moved their heads more actively than
38 when they was inserted unilaterally. So, though it is possible to measure both eyes at the
39 same time, we suggest that in the future, PPTT should be performed individually on
40 each eye to facilitate the process for the evaluation of an animal.
41

42
43 No complications were observed following PPTT measurement in any species
44 evaluated. All animals returned to their enclosures without showing any signs of stress
45 or ocular disturbances such as secretion or blepharospasm.

46
47 PPTT results obtained for the five species studied do not allow comparisons with
48 the few reference values available in literature due to the intrinsic differences in the
49 methods used to obtain the data. For saffron finches, chestnut-bellied seed-finches and
50 red-eared sliders there are no measurement data of the aqueous fraction of the tear film
51 in the literature.

52
53 Regarding the practicality, the measurement of the aqueous fraction of the tear
54 film using PPTT was demonstrated to be highly feasible, particularly in birds, where the
55 animal interference was practically non-existent. Red-eared slider restraint requires
56 greater skill than birds. Restraining rats for the PPTT was much easier than restraining
57 mice. Although mice were more difficult to restrain, the procedure can also be
58 performed with some previous training for handling and after acquiring some familiarity
59 with the method.
60

1
2
3
4 This study demonstrates that PPTT can become a standardized method for
5 measuring the aqueous fraction of the tear film, which is of greatest value in animals
6 with small eyes (HPFL \leq 5 mm). The data included in this paper serves as the second
7 application of this method and will allow for future comparisons in different species.

8 More experiments and the establishment of reference values for other species
9 need to be performed in order to allow identification of individuals who deviate from
10 normal physiological values and the comparison of the physiological production of the
11 aqueous fraction of the tear among species.
12
13

14 Acknowledgements

15 Special thanks to the veterinarian MSc Grazielle Sorensini, competent manager of
16 CETAS - Triage Center for Wildlife - PUCPR/IBAMA - for allowing access to the birds
17 and reptiles used in this study. Great thanks also to the Biologist PhD Cristina
18 Castellano Margarido from the Curitiba Zoo, for allowing the use of animals in the
19 vivarium and thanks to Gillian Shaw for her help in preparing this manuscript.
20
21

22 REFERENCES

- 23
24 1. Montiani-Ferreira F. Ophthalmology. In: Fowler ME, Cubas ZS. *Biology,*
25 *Medicine and Surgery of South American Wild Animals.* Iowa State University
26 *Press/Ames.* 2001; 37: 437-456.
- 27
28 2. Montiani-Ferreira F. Oftalmologia. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL.
29 *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.* Ed Roca. São Paulo.
30 2007; 65: 1092-1104.
- 31
32 3. Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal
33 models of dry eyes; uses and limitations. *Experimental Eye Research.* 2004; 79:
34 613-621.
- 35
36 4. Schirmer O. Principios y métodos de determinación funcional de las glándulas
37 lagrimales. *Archivos de Oftalmología Hispano Americana* 1903; 3: 366-367.
38 Appud: Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in
39 animal models of dry eyes; uses and limitations. *Experimental Eye Research.*
40 2004; 79: 613-621.
- 41
42 5. Strubbe DT, Gelatt KN. Ophthalmologic examination and diagnostic
43 procedures. In: Gelatt KN. *Veterinary Ophthalmology,* 3rd Ed. Lippincott
44 *Williams & Wilkins,* Philadelphia. 1999; 11: 427-466.
- 45
46 6. Marts BS, Bryan GM, Prieto DJ. Schirmer tear test measurements and lysozyme
47 concentration of equine tears. *Journal of Equine Medical Surgery.* 1977; 1: 427.
- 48
49 7. Kaswan RL, Salisbury MA, Wand DA. Spontaneous canine keratoconjunctivitis
50 sicca. A useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with
51 cyclosporine eyes drops. *Archives of Ophthalmology.* 1989; 107: 1210-1216.
52 Appud: Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in
53 animal models of dry eyes; uses and limitations. *Experimental Eye Research.*
54 2004; 79: 613-621.
55
56
57
58
59
60

- 1
- 2
- 3
- 4 8. Trost K, Skalicky M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye
- 5 blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Veterinary*
- 6 *Ophthalmology*. 2001; 10: 143-213.
- 7
- 8
- 9 9. Nelson PS, 1982. A shorter Schirmer tear test. *Optom Mon*; 73:568-9.
- 10
- 11 10. Fujihara T, Nagano T, Nakamura M, Shirasawa E. Lactoferrin suppresses loss of
- 12 corneal epithelial integrity in rabbit short-term dry eye model. *Journal of Ocular*
- 13 *Pharmacology and Therapeutics*. 1988; 14: 99-107.
- 14
- 15 11. Hoffman RW, Alspaugh MA, Waggle KS, Durham JB, Walker SE. Sjögren's
- 16 syndrome in MRL/l and MRL/n mice. *Arthritis & Rheumatism*. 1988; 27: 157-
- 17 165.
- 18
- 19 12. Lange RR, Lima L, Montiani-Ferreira F. Measurement of tear production in
- 20 black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) using three different methods:
- 21 modified Schirmer's I, phenol red thread and standardized endodontic absorbent
- 22 paper points. *Veterinary Ophthalmology*. 2012, 1-7.
- 23
- 24
- 25 13. Pumarola-Suñé J, Solá-Vicens L, Sentis-Vilalta J, Canalda-Sahli C, Brau-
- 26 Aguadé E. Absorbency properties of different brands of standardized endodontic
- 27 paper points. *Journal of Endodontics*. 1998; 24: 12.
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60