

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

INVESTIGAÇÕES SOBRE A SENSIBILIDADE DA CÓRNEA EM ANIMAIS

CURITIBA

2012

RAQUEL DE ARAUJO CANTARELLA

INVESTIGAÇÕES SOBRE A SENSIBILIDADE DA CÓRNEA EM ANIMAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA

2012


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**INVESTIGAÇÕES SOBRE A SENSIBILIDADE DA CÓRNEA EM ANIMAIS**” apresentada pela Mestranda RAQUEL DE ARAÚJO CANTARELLA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato RAQUEL para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 28 de Março de 2012


Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Professora Dra. Tilde Rodrigues Froes
Membro


Professora Dra. Heloísa Helena Abil Russ
Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda bênção concedida, pela graça imerecida e por olhar pelas pessoas que amo.

À minha família: Agda Aparecida de Araujo (mãe), Ismael Antônio Cantarella (pai) e Cesar Augusto de Araujo Cantarella (irmão) - pessoas que representarão eternamente meu porto seguro.

Ao André Luis Selmi, pelo nosso reencontro, por hoje fazer parte da minha vida e por todo amor e respeito que se estabelece a cada dia juntos.

Ao meu orientador Professor Fabiano Montiani-Ferreira, pela oportunidade de aprendizado e por ter prontamente me acolhido no momento de transição do mestrado.

Ao colega de pós-graduação Leandro Lima, por ter participado ativamente dessa pesquisa; pelos ensinamentos, sugestões e por todo auxílio cedido.

Aos colaboradores da pesquisa André Tavares Somma, Suelen Baldotto e Ana Carolina Rodarte, por todo apoio e por tornarem os momentos de pesquisa mais divertidos.

À Isabella Romanel, por gentilmente receber a equipe de pesquisa em seu canil e por ceder os animais para o experimento.

À Professora Tilde Rodrigues Froes, pela contribuição com seus conhecimentos em estudo interobservador e por estar presente na banca de defesa; e à Dr^a. Heloísa Russ, por participar da conclusão desta etapa e igualmente abrilhantar a composição da banca.

À Maria José, secretária da Pós-graduação e ombro amigo nos momentos difíceis. Obrigada pelas orientações e pelo carinho!

Aos amigos Michelly Batisti, Carol Rodarte, Suelen Baldotto, Lorena Karine Soares, Michele Izar, Andréa Meirelles, Ana Laura D'Amico e Emanuel Silveira; a vocês, um carinhoso "muito obrigado". Sem vocês o período de mestrado não teria sido o mesmo.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de crescimento profissional.

RESUMO

A inervação da córnea é suprida por neurônios sensoriais originários do gânglio do nervo trigêmio, sendo estas terminações nervosas sensíveis a uma variedade de estímulos externos e denominados nociceptores polimodais. Uma vez que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) inibem a produção de prostaglandinas e promovem analgesia ocular por dessensibilização nociceptiva, o estudo contido no Capítulo 1 avaliou as influências do uso tópico de três AINE's e de um agente conservante, sobre a sensibilidade da córnea de cães por meio do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet; a presente investigação foi eficaz em detectar as variações de sensibilidade da córnea em virtude da aplicação tópica das drogas. Porém, vale lembrar, que a variável mensurada pelo aparelho (reflexo de piscar) possui alta subjetividade observacional e foi questionada a confiabilidade do seu uso para coleta de dados científicos, particularmente nos estudos multicêntricos. Desta forma, o estudo contido no Capítulo 2 investigou a confiabilidade do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet como método de avaliação da sensibilidade da córnea, sendo selecionados três avaliadores para realizarem estesiometria em cães e coelhos e os índices de concordância entre os observadores foram comparados; esse experimento sugeriu que o estesiômetro possui alta precisão para avaliação da sensibilidade da córnea, porém promove baixa confiabilidade na obtenção de dados quando realizada individualmente por um único observador, necessitando de um auxiliar para realizar a estesiometria e assim diminuir a subjetividade do exame.

Palavras chave: anti-inflamatórios não esteroidais, córnea, Cochet-Bonnet, interobservador, intraobservador, sensibilidade corneana.

ABSTRACT

Corneal innervation is supplied by the sensory neurons originating from the trigeminal ganglion with terminal fibers sensitive to a variety of external stimuli named polymodal nociceptors. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) act by inhibiting the production of prostaglandins and result in analgesia by nociceptive desensitization. The first chapter study evaluated the effect of topical NSAIDs and a preservative on corneal sensitivity in dogs by means of esthesiometry using the Cochet-Bonnet esthesiometer; the study allowed verification of fluctuations in corneal sensitivity due to the topical application of those drugs. In spite of these results, the blinking reflex was considered a highly subjective variable and its efficacy was questionable, particularly in multicentric studies. So, the investigation on the second chapter evaluated the agreement of the Cochet-Bonnet esthesiometer as a tool for corneal sensitivity evaluation in dogs and rabbits using three different observers. The results indicated that the esthesiometer tested is a high-precision instrument for corneal sensitivity determination, although it presented a low reliability for data acquisition when used by one observer only. Therefore, we suggest using the help of a veterinary technician or nurse to perform the test and decrease its subjectivity.

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory, cornea, Cochet-Bonnet, interobserver, intraobserver, corneal sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

1. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de flurbiprofeno sódico 0,03%. 20
2. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de diclofenaco sódico 0,1%. 20
3. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de cetrolac de trometamina 0,5%. 21
4. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de cloreto de benzalcônio 0,01%. 21
5. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias de todas as drogas testadas (Cloreto de Benzalcônio, Cetrolaco de Trometamina, Diclofenaco Sódico e Flurbiprofeno Sódico) em relação ao tempo de avaliação. 22
6. Estesiometria da córnea do olho esquerdo de uma cadela, com 5 anos de idade, sem raça definida – o estesiômetro de Cochet-Bonnet, graduado em 3 centímetros de filamento de náilon, não exerceu força sobre a superfície da córnea suficiente para estimular o reflexo de piscar. 35
7. Fotografia da estesiometria da córnea do olho direito de uma coelha, com 5 meses de idade, raça Nova Zelândia - o estesiômetro de Cochet-Bonnet, graduado em 2,0 centímetros de filamento de náilon, não exerceu força sobre a superfície da córnea suficiente para estimular o reflexo de piscar. 35
8. Estesiometria da córnea do olho direito de uma coelha, com 3 meses de idade, raça Nova Zelândia; (a) imagem da ponta do fio de náilon, graduado em 2,5 centímetros, tocando a região central da córnea e (b) imagem da ponta do fio de náilon, graduado em 1,5 centímetro, tocando a região central da córnea e exercendo força suficiente para estimular o reflexo de piscar. 36

LISTA DE TABELAS

1. Valores médios das estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após a aplicação tópica de flurbiprofeno sódico 0,03%, diclofenaco sódico 0,1%, cetrolac de Trometamina 0,5% e cloreto de benzalcônio 0,01% na superfície corneana de cães. 19
2. Interpretação dos coeficientes do Kappa. 37
3. Resultados dos coeficientes do teste Kappa referentes à análise interobservadora de cães e coelhos e suas interpretações de concordância da primeira etapa do experimento. 38
4. Resultados dos coeficientes do Teste Kappa na análise interobservadora de cães e coelhos e suas interpretações de concordância referente à segunda etapa do experimento. 38
5. Resultados dos coeficientes do Kappa na análise intraobservadora (diferença de sensibilidade do OD em relação ao OS) de cães e coelhos e suas interpretações de concordância referentes à primeira etapa do experimento. 39
6. Resultados dos coeficientes do Kappa na análise intraobservadora (diferença de sensibilidade do OD em relação ao OS) de cães e coelhos e suas interpretações de concordância referentes à segunda etapa do experimento. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

PG – prostaglandina

PG's – prostaglandinas

AINE – anti-inflamatório não esteroideal

AINE's – anti-inflamatórios não esteroidais

cm – centímetros

Inter – interobservador

Intra – intraobservador

OD – olho direito

OS – olho esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. GERAL	12
2.2. ESPECÍFICOS	12
3. CAPÍTULO 1	13
3.1. RESUMO	13
3.2. ABSTRACT	14
3.3. INTRODUÇÃO	15
3.4. MATERIAL E MÉTODO	17
3.5. RESULTADOS	18
3.6. DISCUSSÃO	22
3.7. REFERÊNCIAS	26
4. CAPÍTULO 2	29
4.1. RESUMO	29
4.2. ABSTRACT	30
4.3. INTRODUÇÃO	31
4.4. MATERIAL E MÉTODO	33
4.5. RESULTADOS	37
4.6. DISCUSSÃO	39
4.7. REFERÊNCIAS	43
5. CONCLUSÕES	45
6. ANEXOS	46
6.1. APROVAÇÃO DO COMITÊ CIENTÍFICO	46
6.2. NORMAS DA REVISTA <i>VETERINARY OPHTHALMOLOGY</i>	47
7. VITA	51

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas desenvolvidas nesse trabalho visaram contribuir com o ramo da Neuro-Oftalmologia por meio da investigação da sensibilidade da córnea de animais, sendo a dissertação dividida em dois capítulos para cumprir essa proposta.

O primeiro capítulo, intitulado “Avaliação das alterações da sensibilidade da córnea frente ao uso tópico de anti-inflamatórios não esteroidais em cães”, objetivou avaliar as alterações da sensibilidade causadas pelo uso de soluções oftálmicas; para isso, três diferentes tipos de anti-inflamatórios não esteroidais, e um agente conservante, foram instilados sobre a superfície corneana de cães e dados subsequentes sobre as alterações da sensibilidade da córnea foram coletados por meio do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet. Apesar do aparelho ser preciso para mensurar a sensibilidade corneana, o reflexo de piscar trata-se de uma variável que possui alta subjetividade observacional para coleta de dados científicos; além disso, publicações recentes na área da oftalmologia veterinária têm frequentemente utilizado este aparelho, sendo portanto questionado sobre a confiabilidade dos resultados obtidos nestas pesquisas.

Desta forma, o objetivo do segundo capítulo, intitulado “Avaliação inter e intraobservador da estesiometria corneana de cães e coelhos”, visou investigar a confiabilidade do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet como método de avaliação da sensibilidade da córnea. Para isso, foram selecionados três avaliadores, com diferentes graus de experiência na área da oftalmologia veterinária, para realizarem estesiometria na córnea de cães e coelhos. Assim, o estudo comparou os índices de concordância entre os observadores, a partir dos dados coletados com o uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet.

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da referida instituição (Anexo 1).

Uma vez que o objetivo final das pesquisas desenvolvidas visa futura divulgação científica, o artigo contido em cada capítulo está formatado segundo normas da revista *Veterinary Ophthalmology* (Anexo 2).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Contribuir com os avanços científicos no estudo investigativo da sensibilidade da córnea de animais.

2.2. ESPECÍFICOS

1) Avaliar as possíveis alterações da sensibilidade da córnea hígida de cães após a aplicação tópica de três diferentes tipos de AINE´s e de um agente conservante;

2) Comparar a concordância entre dados coletados inter e intraobservadores, a partir do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet como ferramenta de mensuração da sensibilidade da córnea;

3) Avaliar a possibilidade de interferência na coleta dos dados causada pelo grau de experiência de cada observador, pela espécie animal estudada (cães e coelhos) e pela presença de um auxiliar para realização do exame;

4) Avaliar a confiabilidade do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet como instrumento de mensuração da sensibilidade da córnea de cães e coelhos.

3. CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA SENSIBILIDADE DA CÓRNEA FRENTE AO USO TÓPICO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS EM CÃES

CHANGES IN CORNEAL SENSITIVITY AFTER THE TOPICAL USE OF NSAIDs IN DOGS

3.1 RESUMO

Objetivo: avaliar as influências sobre a sensibilidade da córnea de cães após a aplicação tópica de três diferentes tipos de anti-inflamatórios não esteroidais (flurbiprofeno sódico 0,03%, diclofenaco sódico 0,1% e cetrolac de trometamina 0,5%) e um agente conservante (cloreto de benzalcônio 0,01%), por meio do estesiômetro de Cochet-Bonnet[®] (Luneau, Paris, França).

Método: foram utilizados seis cães sem raça definida e o experimento realizado em duas etapas: na primeira, instilou-se uma gota de colírio de flurbiprofeno sódico no olho direito e diclofenaco sódico no olho esquerdo; já na segunda, instilou-se uma gota de colírio de cetrolac de trometamina no olho direito e cloreto de benzalcônio no olho esquerdo. Para ambas as etapas, a estesiometria basal era mensurada e, após instilação dos colírios, os dados subsequentes de estesiometria eram coletados a cada 15 minutos, totalizando 105 minutos de avaliação. Para cada etapa foi realizada uma repetição experimental, no mesmo grupo de animais, com uma semana de intervalo entre elas. A avaliação estatística objetivou comparar as médias dos valores obtidos com a estesiometria realizada nos cães em relação ao tempo (em minutos) e a droga instilada, empregando-se o teste de Análise de Variância de Friedman onde valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados e Discussão: de acordo com a avaliação dos AINE's, a aplicação tópica do flurbiprofeno sódico 0,03% demonstrou aumento significativo da média das estesiometrias aos 30 minutos ($P > 0,013$),

representando aumento da sensibilidade e ação irritativa corneana mais evidente que ação analgésica; a aplicação do diclofenaco sódico 0,1% demonstrou diminuição significativa de suas médias aos 75 e 90 minutos ($P > 0,015$), representando diminuição da sensibilidade da córnea, potencial interferência na atividade nociceptora neuronal e possível eficácia analgésica; já as médias das estesiometrias obtidas com o estudo do cetrolac de trometamina 0,5% não demonstram alterações significativas na sensibilidade da córnea. Embora e a aplicação tópica do cloreto de benzalcônio 0,01% tenha causado aumento significativo da média das estesiometrias aos 15 minutos ($P > 0,001$), este efeito não foi observado nos resultados da avaliação do cetrolaco, uma vez que a presença do conservante em sua formulação permite maior penetração do princípio ativo na membrana celular e possivelmente atenuou a ação irritativa do conservante. Já a metodologia utilizada no presente experimento não permitiu a conclusão definitiva sobre a eficácia analgésica dos AINE's testados, porém foi eficaz em detectar as variações de sensibilidade da córnea, conforme proposto pelo estudo.

Palavras chave: córnea, Cochet-Bonnet, nociceptores, sensibilidade corneana.

3.2 ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effects of three different topical non-steroidal anti-inflammatory drugs (0.03% sodium flurbiprofen, 0.1% sodium diclofenac and 0.5% ketorolac tromethamine) or 0.01% benzalkonium chloride on corneal sensitivity by using the Cochet-Bonnet[®] esthesiometer (Luneau, Paris, France).

Method: Six mongrel dogs were used in two different occasions. First, one drop of 0.03% sodium flurbiprofen was applied to the right eye and one drop 0.1% sodium diclofenac was applied to the left eye; on the second occasion, one drop of 0.5% ketorolac tromethamine was applied to the right eye and one drop of 0.01% benzalkonium chloride was applied on the left eye. Basal esthesiometry was determined before eye drop application and every 15 minutes thereafter until 105 minutes of evaluation. A one-week interval was

allowed between treatments. Statistical analysis was used to compare means according to time of evaluation and drug used, by means of ANOVA followed by Friedman test ($P < 0,05$).

Results and Discussion: topical use of 0.03% sodium flurbiprofen showed a significant increase in esthesiometry values 30 minutes after instillation ($P > 0.013$), demonstrating an increase in corneal sensitivity and a greater irritating corneal effect over its analgesic properties; 0.1% sodium diclofenac presented a significant decrease for esthesiometry values at 75 and 90 minutes of evaluation ($P > 0.015$) indicating a decrease in corneal sensitivity with a possible interference on neuronal nociceptive activity and analgesic effect while 0.5% ketorolac tromethamine did not show any variation for esthesiometry means along the evaluation period. Even though 0.01% benzalkonium chloride resulted in a significant increase in corneal sensitivity at 15 minutes of evaluation ($P > 0.001$), this same effect was not observed when ketorolac was instilled, most likely resulting from the greater analgesic effect of the drug in comparison to the irritating effect of its preservative. The evaluation method used in this study did not allow for a definite conclusion over the analgesic effect of NSAIDs tested, however it was effective in detecting corneal sensitivity fluctuations.

Keywords: cornea, Cochet-Bonnet, nociceptors, corneal sensitivity.

3.3 INTRODUÇÃO

A inervação da córnea e da conjuntiva bulbar é suprida por um número relativamente pequeno de neurônios sensoriais primários originários do gânglio trigeminal ipsilateral (cerca de 1,5% do número total de neurônios provenientes do gânglio). Porém, a pequena dimensão da superfície corneana em relação à extensa ramificação dos axônios periféricos sobre esta superfície, torna da córnea a estrutura mais densamente inervada do corpo,¹ sendo 70% destas fibras sensoriais denominadas nociceptores polimodais.²

Os nociceptores polimodais presentes na córnea são terminações nervosas sensíveis a estímulos externos mecânicos, térmicos, químicos e a

mediadores inflamatórios endógenos liberados na lesão tecidual² ou por alterações secundárias às causas infecciosas e imunomediadas,³ sendo a prostaglandina (PG) um dos principais eicosanóides liberados no interior do olho como subproduto da quebra do ácido araquidônico frente a um desses estímulos.⁴ Estas PG's atuam ligando-se aos receptores denominados facilitadores da dor^{5,6} e, desta forma, promovem variações no potencial de repouso da membrana neuronal, sendo o aumento da atividade excitatória das fibras nervosas e amplificação do estímulo doloroso consequências diretas deste evento neurofisiológico.^{6,7,8,9}

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) são um grupo variado de fármacos que têm, em comum, a capacidade de controlar a inflamação, promover analgesia e combater a hipertermia por atuarem inibindo a atividade de subtipos da cicloxigenase, impedindo assim a síntese de eicosanóides pela via metabólica da cascata do ácido araquidônico.^{8,10,11} Na oftalmologia, este grupo de fármacos têm sido amplamente utilizado para o controle da dor causada por lesão tecidual, processo inflamatório local e pós-operatórios.^{3,10,12,13}

Um estudo realizado por Chen e colaboradores (1997) demonstrou que a aplicação tópica de soluções oftálmicas de AINE's em córneas de gatos causou a redução efetiva da sensibilização dos nociceptores polimodais e da sensibilidade da córnea, comprovando que a analgesia e o conforto ocular relatado por seres humanos são decorrentes da diminuição da atividade excitatória das PG's sobre as fibras nervosas.^{12,13} Desta forma, o presente estudo visou avaliar as variações e possíveis diminuições da sensibilidade da córnea de cães frente à aplicação tópica de três diferentes tipos de AINE's e um agente conservante, utilizando o estesiômetro de Cochet-Bonnet (Luneau, Paris, França) como instrumento calibrado de estímulo mecânico externo dos nociceptores corneanos.

3.4. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados seis cães sem raça definida, sendo três machos e três fêmeas; a idade variou de sete a 11 meses, com média de nove meses de idade. Todos os pacientes foram previamente submetidos a exame físico e oftálmico e encontravam-se sadios, devidamente vacinados, livres de doenças oftálmicas ou sistêmicas.

Para estes animais, foram testados três AINE's: flurbiprofeno sódico 0,03% (ALLERGAN; Syntex Inc., EUA), diclofenaco sódico 0,1% (ALLERGAN; Syntex Inc., EUA) e cetrolac de trometamina 0,5% (ALLERGAN; Syntex Inc., EUA). Além desses, um colírio de cloreto de benzalcônio 0,01%, componente conservante da solução oftálmica do cetrolac de trometamina, foi manipulado (Ophthalmos, São Paulo, SP) para sua utilização neste experimento como grupo controle para a referida droga.

O experimento foi realizado em duas etapas, sendo que para cada uma foi realizada repetição do experimento no mesmo grupo de animais. Na primeira, instilou-se uma gota de colírio de flurbiprofeno sódico no olho direito e diclofenaco sódico no olho esquerdo para cada um dos seis animais; após o intervalo de uma semana, este procedimento foi repetido no mesmo grupo de animais. Já na segunda etapa, instilou-se uma gota de colírio de cetrolac de trometamina no olho direito e cloreto de benzalcônio no olho esquerdo no mesmo grupo de animais avaliados na primeira etapa, realizando igualmente a repetição deste procedimento, com o mesmo intervalo de tempo.

Para cada etapa, o experimento era iniciado anotando-se os dados referentes à estesiometria basal representada pelo tempo 0, ou seja, valor referente ao tamanho do fio de náilon suficiente para estimular o reflexo de piscar em cada animal sem aplicação de medicamento tópico nos olhos. Após mensuração basal, os colírios eram instilados na superfície ocular e dados subsequentes de valores da estesiometria eram coletados a cada 15 minutos, por uma hora e 45 minutos, totalizando 105 minutos de experimentação.

Todas as etapas foram realizadas no mesmo ambiente e local com o objetivo de controlar variáveis externas como mudanças climáticas, sonoridades e movimentação na sala de experimentação. Da mesma forma,

somente duas pessoas ficavam presentes no momento da coleta dos dados, sendo uma delas responsável por realizar o manuseio do estesiômetro e o outro, auxiliar de contenção física dos animais.

O estesiômetro mensura o limiar de sensibilidade da superfície corneana; entende-se que quanto maior a média referente ao comprimento do fio de náilon (em centímetros) suficiente para estimular o reflexo de piscar nos animais avaliados, maior é a sensibilidade das córneas de um dado grupo. Assim, a avaliação estatística objetivou comparar as médias dos valores obtidos com a estesiometria realizada nos cães em relação ao tempo (em minutos) e a droga instilada. Uma vez que os dados de estesiometria são variáveis discretas com distribuição não Gaussiana, empregou-se o teste de Análise de Variância de Friedman na sua análise. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. Toda a análise estatística descritiva e inferencial foi realizada empregando o pacote estatístico para computadores JMP v7 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

3.5. RESULTADOS

As médias obtidas a partir dos valores da estesiometria em relação ao tempo de avaliação, para todas as drogas testadas no experimento, estão ilustradas na tabela 1.

Tabela 1. Valores médios das estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após a aplicação tópica de flurbiprofeno sódico 0,03%, diclofenaco sódico 0,1%, cetrolac de trometamina 0,5% e cloreto de benzalcônio 0,01% na superfície corneana de cães.

Drogas	Tempo (minutos)							
	0	15	30	45	60	75	90	105
Flurbiprofeno sódico 0,03%	0,875	1,167	1,250*	0,875	0,958	1,000	0,792	0,875
Diclofenaco sódico 0,1%	1,125	1,083	1,208	0,958	0,958	0,792*	0,792*	0,875
Cetrolaco de trometamina 0,5%	1,125	1,375	1,167	1,125	1,167	1,083	1,000	0,917
Cloreto de benzalcônio 0,01%	1,000	1,458*	1,167	1,000	1,088	1,167	1,208	1,000

* Médias que apresentaram diferença significativa em relação à média da estesiometria basal, onde $P < 0,05$.

Após aplicação tópica de flurbiprofeno sódico 0,03%, observou-se aumento gradativo dos valores médios de estesiometria ocular, sendo significativamente maior aos 30 minutos de avaliação ($P > 0,013$), em relação aos valores basais, com posteriores oscilações para valores inferiores ao longo do período de avaliação (Figura 1).

Com relação às médias de estesiometria após aplicação do diclofenaco sódico 0,1%, observou-se discreto aumento após 30 minutos de aplicação e decréscimo subsequente dos valores, com significância ($P > 0,015$) somente entre 75 e 90 minutos de avaliação, em relação aos valores basais (Figura 2).

Os dados obtidos após aplicação tópica do cetrolac de trometamina 0,5% demonstraram não haver diferença significativa entre as médias das estesiometrias e a média basal (Figura 3).

A análise estatística relativa à aplicação ocular da formulação de cloreto de benzalcônio 0,01% demonstrou haver aumento significativo dos valores médios de estesiometria aos 15 minutos de avaliação ($P > 0,001$) em relação à média basal (Figura 4).

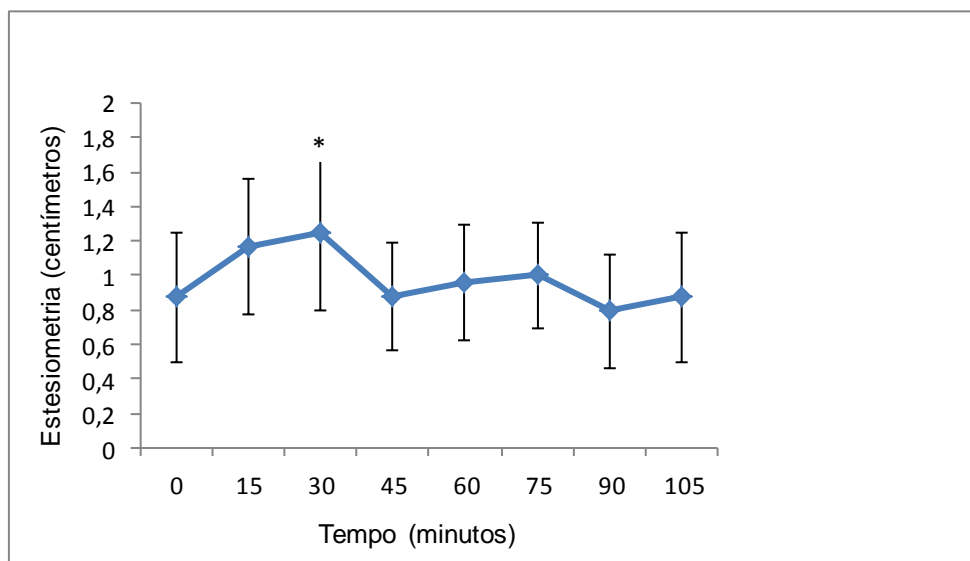


Figura 1. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de flurbiprofeno sódico 0,03%.

* Média que apresenta diferença significativa em relação à média da estesiometria basal, onde $P > 0,013$ aos 30 minutos de avaliação.

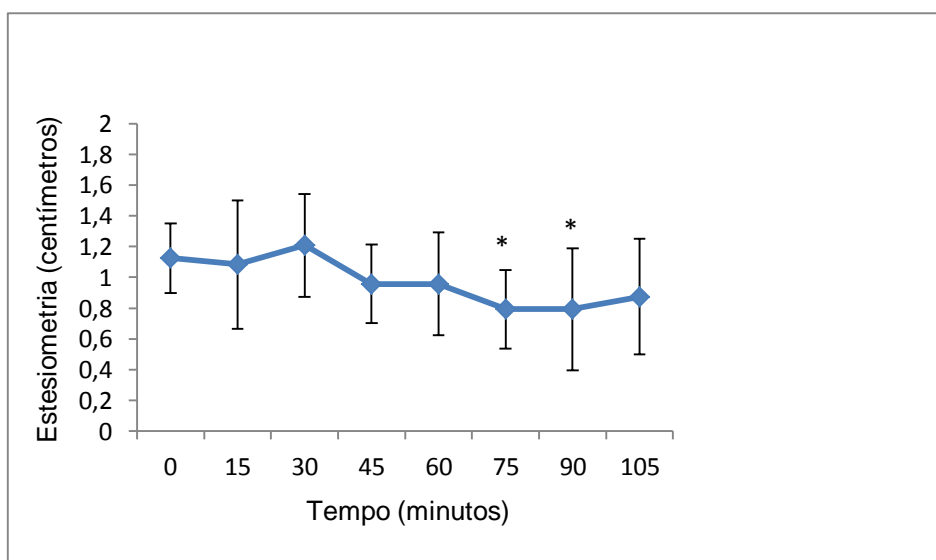


Figura 2. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de diclofenaco sódico 0,1%.

* Médias que apresentam diferença significativa em relação à média da estesiometria basal, onde $P > 0,015$ aos 75 e 90 minutos de avaliação.

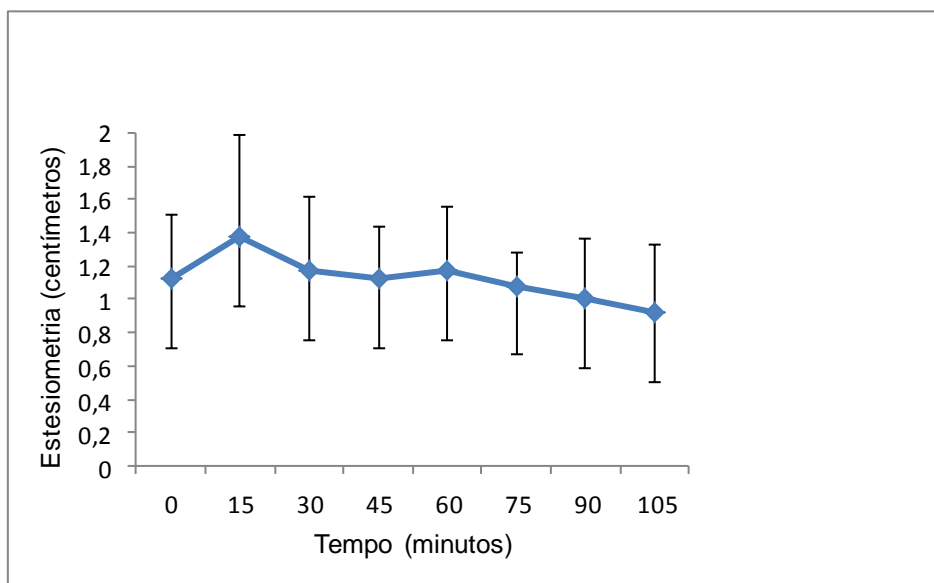


Figura 3. Gráfico representativo das médias das estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de cetrolac de trometamina 0,5%.

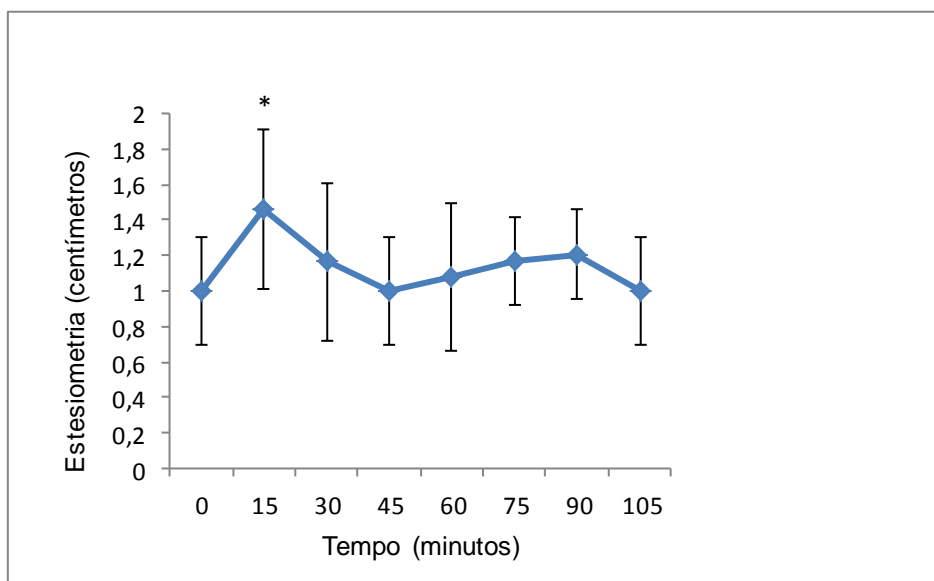


Figura 4. Gráfico representativo das médias das estesiometrias em relação ao tempo de avaliação, após aplicação ocular de cloreto de benzalcônio 0,01%.

* Média que apresenta diferença significativa em relação à média da estesiometria basal, onde $P > 0,001$ aos 15 minutos de avaliação.

A Figura 5 ilustra a representação gráfica das médias das estesiometrias de todas as drogas testadas em relação ao tempo de avaliação, sendo possível observar que as maiores médias foram obtidas durante os primeiros 15-30 minutos e reduções subsequentes ocorreram a partir desse período de tempo.

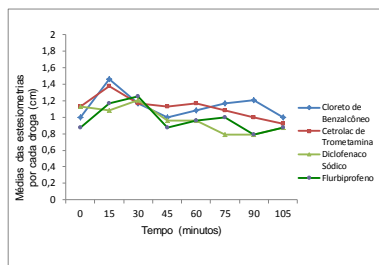


Figura 5. Gráfico representativo das médias obtidas com as estesiometrias de todas as drogas testadas (Cloreto de Benzalcônio, Cetrolac de Trometamina, Diclofenaco Sódico e Flurbiprofeno Sódico) em relação ao tempo de avaliação.

3.6. DISCUSSÃO

A diminuição da sensibilidade da córnea frente ao uso dos colírios anti-inflamatórios não esteroidais era esperada como resultado da experimentação do presente trabalho, uma vez que o bloqueio da ação das prostaglandinas sobre os nociceptores periféricos promovem diminuição da atividade excitatória neuronal, mesmo em olhos não inflamados.^{10,12}

A aplicação tópica de flurbiprofeno sódico 0,03% demonstrou aumento da atividade excitatória dos nociceptores após 30 minutos da sua aplicação ocular. Porém, uma vez que as médias entre 45-105 minutos não diferiram significativamente da média basal, os dados representam retorno da atividade

nociceptora ao normal neste período de tempo e ação irritativa mais evidente que a ação analgésica.

Os dados das estesiometrias oculares após a aplicação tópica de diclofenaco sódico 0,1% evidenciaram, de maneira inédita, o pico de ação analgésica promovido por esta droga, uma vez que as menores médias com diferença significativa em relação à média basal representam o momento máximo de diminuição da atividade excitatória neuronal ocorrida entre 75-90 minutos. Após este período de tempo, observou-se igualmente retorno da atividade nociceptora ao nível basal.

Já aplicação tópica do cetrolac de trometamina 0,5% não demonstrou alterações na sensibilidade da córnea e, portanto, não foi possível observar sua eficácia analgésica com esse experimento. Porém o gráfico apresentado na Figura 3 demonstra uma tendência à diminuição contínua de suas médias após 60 minutos, supondo-se que médias inferiores significativas poderiam ter sido obtidas, caso o delineamento experimental abordasse avaliações posteriores à 105 minutos.

Flurbiprofeno, diclofenaco e cetrolac são AINE's cuja função consiste na inibição da produção de eicosanóides provenientes da via metabólica do ácido araquidônico, responsável por diminuir a atividade nociceptora das fibras nervosas da córnea e gerar conseqüente analgesia tópica.⁸⁻¹² Apesar de outros estudos demonstrarem a similaridade da ação analgésica promovida entre estes três fármacos,^{14,15} o presente estudo sugere que a aplicação ocular de flurbiprofeno sódico 0,03% e cetrolac de trometamina 0,5% promovem ação analgésica pouco representativa na atividade nociceptora da córnea, pelo menos em bulbos oculares hígidos. Porém, o estudo realizado por Acosta *et al.* (2007) testou a eficácia analgésica do cetrolac de trometamina 0,4% e demonstrou que esta droga foi capaz de diminuir a atividade nociceptora periférica de córneas hígidas de gatos. Apesar deste trabalho também empregar o estesiômetro de Cochet-Bonnet como estímulo mecânico externo, a coleta de dados foi realizada a partir da avaliação do potencial evocado das fibras nervosas. Esta metodologia, anteriormente desenvolvida por Chen *et al.* (1997), de fato possibilitou a avaliação fidedigna da atividade dos nociceptores da córnea. Dessa forma, o uso isolado do reflexo de piscar, como parâmetro

observacional da sensibilidade da córnea promovida pelo estesiômetro de Cochet-Bonnet, pode ter refletido em coleta de dados insuficientes sobre a eficácia analgésica tanto do flurbiprofeno sódico 0,03% como do cetrolac de trometamina 0,5%.

A aplicação ocular de diclofenaco sódico 0,1% demonstrou, comparativamente, maior potencial analgésico para a córnea e corroborou dados encontrados no estudo realizado por Aragona et al. (2000). Trabalhos científicos realizados anteriormente também demonstraram a capacidade do diclofenaco sódico em interferir na atividade da β -endorfina (neurotransmissor inibitório endógeno) e da substância P (neurotransmissor excitatório endógeno de nociceptores),⁶ sugerindo que o aumento plasmático do primeiro^{6,10,16} e a diminuição do segundo¹⁷ contribuem com a potência da ação analgésica promovida por esta droga.

Os dados obtidos com a aplicação tópica do cloreto de benzalcônio 0,01% demonstraram aumento significativo da sensibilidade da córnea nos primeiros 15 minutos, alcançando a maior média obtida em relação às demais drogas nesse período de tempo e representando maior potência irritativa sobre a superfície da córnea. Médias significativamente inferiores à média basal não eram esperadas por tratar-se de um agente conservante isento de propriedades anti-inflamatórias.

O cloreto de benzalcônio é comumente utilizado em preparações oftálmicas e presente na formulação do cetrolac de trometamina 0,5%. Este conservante, além de aumentar a penetração do princípio ativo pela membrana celular lipídica,^{18,19} é também responsável por promover ativação da síntese de eicosanóides e consequente irritação ocular.^{18,20} Jean *et al.* (1999) sugerem que a aplicação tópica deste agente conservante, ainda que em baixas doses de 0,0001%, promove a diminuição da atividade proliferativa celular e induz morte por apoptose.²⁰ Apesar do presente estudo ter demonstrado que o uso isolado do cloreto de benzalcônio causou importante ação irritativa na superfície da córnea, não foi possível comprovar o mesmo efeito quando associado à formulação do cetrolac de trometamina. Portanto, uma vez que o cloreto de benzalcônio aumenta os níveis intracelulares do cetrolac de

trometamina,¹⁸ sugere-se que a ação anti-inflamatória do segundo pode ter amenizado a ação irritativa do primeiro sobre as fibras nociceptoras.

Da mesma forma, o experimento demonstrou uma tendência ao aumento da sensibilidade das córneas entre 15-30 minutos após a instilação dos colírios de flurbiprofeno sódico 0,03% e de diclofenaco sódico 0,1%. Este aumento de sensibilidade sugere ação irritativa causada pelos diferentes tipos de agentes conservantes presentes em cada composição, os quais não incluem a presença do cloreto de benzalcônio, e também possivelmente responsáveis pela sensação de ardência relatada por seres humanos.^{9,10,12} Porém, novas investigações são necessárias para comprovar o mecanismo de ação desses agentes sobre a superfície da córnea, não sendo este o objetivo do presente estudo.

Apesar da subjetividade do exame observacional do reflexo de piscar poder ter interferido diretamente na obtenção dos resultados dos valores das estesiometrias, tanto os valores basais como os demais foram avaliados pelo mesmo observador, diminuindo assim os possíveis efeitos de subjetividade na mensuração da variável. Mais estudos com variáveis controladas, além do emprego de outras metodologias de avaliação eletrofisiológica da atividade dos nociceptores da córnea, são necessários para obterem-se dados fidedignos quanto à eficácia analgésica dos anti-inflamatórios testados neste trabalho.

3.7. REFERÊNCIAS

1. De Felipe C, González GG, Gallar J, Belmonte C. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *European Journal of Pain* 1999; 3:32-39.
2. Belmonte C, Acosta MC, Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Experimental Eye Research* 2004; 78:513-525.
3. Giuliano EA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 2004; 34:707-723.
4. Slatter D. Farmacologia ocular e terapêutica. In: *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária* 3^o edição. Roca: São Paulo, 2005; 37-76.
5. Marfurt CF, Murphy CJ, Florczak JL. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001; 42(10):2242-2251.
6. Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ. Perioperative pain and its management. In: *Essentials of Small Animal Anesthesia & Analgesia* 1th edition. Lippincott Williams & Wilkings: Philadelphia, 1999; 28-60.
7. Tasaka AC. Antinflamatórios não-esteroidais. In: *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* 2^o edição. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999; 212-226.
8. Bloom FE. Neurotransmission and the central nervous system. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9th edition. Joel G. Hardman, Alfred Goodman Gilman, Lee E. Limbird: United States of America, 1996; 267-294.

9. Acosta MC, Berenguer-Ruiz L, García-Gálvez A, Perea-Tortosa D, Gallar J, Belmont C. Changes in mechanical, chemical, and thermal sensitivity of the cornea after topical application of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005; 46(1):282-286.
10. Aragona P, Tripodi G, Spinella R, Laganá E, Ferreri G. The effects of the topical administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on corneal epithelium and corneal sensitivity in normal subjects. *Eye* 2000; 14:206-210.
11. Insel PA. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of goat. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9th edition. Joel G. Hardman, Alfred Goodman Gilman, Lee E. Limbird: United States of America, 1996; 617-658.
12. Chen X, Gallar J, Belmont C. Reduction by anti-inflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1997; 38(10):1944-1953.
13. Acosta MC, Luna C, Graff G, Mesenguer VM, Viana F, Gallar J, Belmont C. Comparative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nepafenac on corneal sensory nerve fibers responding to chemical irritation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007; 48(1):182-188.
14. Bellamy N, Bensen WG, Ford PM, Huang SH, Lang JY. Double-blind randomized controlled trial of flurbiprofeno-SR (ANSAID-SR) and diclofenac sodium-SR (Voltaren-SR) in the treatment of osteoarthritis. *Clinical & Investigative Medicine* 1992; 15:427-433.
15. Toscani F, Piva L, Corli O, Galluci M, Speranza R, Tamburini M, De Conno F, Ventafridda V. Ketorolac versus diclofenac sodium in cancer pain. *Arzneimittelforschung / Drug Research* 1994; 44:550-554.

16. Martini A, Bondiolotti GP, Sacerdote P, Pierro L, Picotto GB, *et al.* Diclofenac increases beta-endorphins plasma concentrations. *Journal Internal Medicine Research* 1984; 12:92-95.
17. Yamada M, Ogata M, Kawai M, Mochizuki H, Mashima Y. Topical diclofenac sodium decreases the substance P content of tears. *Archives of Ophthalmology* 2002; 120:51-54.
18. Madhu C, Rix PJ, Shackleton MJ, Nguyen TG, Tang-Liu D. Effect of benzalkonium chloride/EDTA on the ocular bioavailability of ketorolac tromethamine following ocular instillation to normal and de-epithelialized corneas of rabbits. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996; 85(4):415-418.
19. Malhotra M, Majumdar DK. Aqueous, oil, and ointment formulations of ketorolac: efficacy against prostaglandin E2-induced ocular inflammation and safety: a technical note. *AAPS Pharmscitech* 2006; 7(4).
20. De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1999; 40(3):619-630.

4. CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO INTER E INTRA OBSERVADORES DA ESTESIOMETRIA CORNEANA DE CÃES E COELHOS

INTER AND INTRA OBSERVERS EVALUATION OF CORNEAL AESTHESIOMETRY IN DOGS AND RABBITS

4.1. RESUMO

Objetivo: avaliar os coeficientes de concordância inter e intra observadores no exame de estesiometria da córnea de cães e coelhos e a confiabilidade do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet como ferramenta para avaliação da sensibilidade da córnea.

Método: foram selecionados três observadores com diferentes níveis de experiência em oftalmologia veterinária para realizarem estesiometria ocular em 24 cães e 25 coelhos, em duas diferentes etapas. Na primeira etapa, cada observador realizou isoladamente a estesiometria ocular e anotou os dados referentes ao comprimento (em centímetros) do filamento de náilon suficiente para estimular o reflexo de piscar nos animais avaliados. Já na segunda, apenas um colaborador realizou a estesiometria e os mesmos observadores apenas assistiram o procedimento e anotaram individualmente seus dados, sendo realizado um estudo inter e intra observador por meio do teste estatístico Kappa a partir dos dados obtidos com a investigação de ambas as etapas.

Resultados e Discussão: a análise interobservadora de cães e coelhos da primeira etapa demonstrou coeficientes do teste Kappa que variaram de pobres a regulares e, na análise intraobservadora, variações de regulares a moderados. Apesar de o estudo intraobservador indicar melhores índices de concordância por menor variação de sensibilidade entre o olho direito em relação ao esquerdo, o estudo interobservador demonstra pouca concordância entre os observadores em relação a estas variações entre olhos. Já na segunda etapa, a análise interobservadora de cães e coelhos demonstrou

coeficientes do teste Kappa que variaram de moderados a excelentes e, na análise intraobservadora, variações de regulares a pobres. Os baixos índices de concordância intraobservador revelam maior variação de sensibilidade entre o olho direito em relação ao esquerdo, de forma que o estudo interobservador demonstra que os observadores concordam com as variações entre olhos encontradas na segunda etapa, representando coleta de dados mais precisos em relação à primeira. Portanto, segundo os dados obtidos no presente estudo, conclui-se que o estesiômetro de Cochet-Bonnet é um instrumento de alta precisão para avaliação da sensibilidade da córnea, porém promove baixa confiabilidade na obtenção de dados quando a estesiometria é realizada individualmente por um único observador. Este experimento também comprova que a utilização deste instrumento para pesquisas científicas requer o estudo estatístico de análise inter e intraobservadora, bem como a utilização de uma nova metodologia de avaliação para a obtenção de dados mais fidedignos, uma vez que a variável interpretada no exame da estesiometria (reflexo de piscar) possui alta subjetividade observacional.

Palavras chave: córnea, Cochet-Bonnet, interobservador, intraobservador, Kappa.

4.2. ABSTRACT

Purpose: to evaluate inter and intraobserver coefficient agreement in esthesiometry of dogs and rabbits corneas and the reliability of using a Cochet-Bonnet esthesiometer as a tool for assessing the sensitivity of the cornea.

Method: three observers with different levels of experience in veterinary ophthalmology were selected to perform esthesiometry in two groups, one comprised of 24 dogs and the other with 25 rabbits, in two different trials. In the first trial, each independent evaluator performed esthesiometry and recorded data concerning the length (in centimeters) of the nylon filament sufficient to trigger the blinking reflex in animals evaluated. In the second trial, a different trained person performed esthesiometry while the same three evaluators of trial one observed the procedure and recorded their individual data. An inter and

intraobserver agreement study was made using the Kappa statistical test based on data obtained from observations of both trails.

Results and Discussion: interobserver analysis of dogs and rabbits of the first trial showed that Kappa coefficients ranged from poor to regular and, in the intraobserver analysis, from regular to moderate. Although the intraobserver study indicated better concordance rates by less variation between right and left eye, the interobserver study showed little agreement among the observers for these variations between eyes. In the second trial, the interobserver analysis of dogs and rabbits showed that Kappa coefficients ranged from moderate to excellent and, in the intraobserver analysis, from regular to poor. The low rates of intraobserver agreement showed greater variation in sensitivity between right and left eye, but interobserver analysis demonstrated a higher agreement among evaluators, indicating a more accurate collection of data in relation to first trial. Therefore, according to results obtained in this study, it is concluded that Cochet-Bonnet esthesiometer is a high precision instrument for assessing corneal sensitivity, but demonstrated low reliability when esthesiometry is performed individually by a single observer. This study also demonstrated that using this tool for scientific research requires inter and intraobserver statistical analysis and the use of a new assessment methodology to obtain more realistic data, since the variable interpreted in esthesiometry (blinking reflex) is highly subjective.

Keywords: cornea, Cochet-Bonnet, interobserver, intraobserver, Kappa.

4.3. INTRODUÇÃO

O epitélio corneano corresponde a mais inervada superfície corpórea, sendo este de 300-600 vezes mais inervado que a pele. A sensibilidade e inervação corneana deriva-se da ramificação oftálmica do gânglio do nervo trigêmeo que penetra no estroma corneano através do limbo e progride para a camada celular superficial.¹

O estesiômetro de Cochet-Bonnet® (Luneau, Paris, França) consiste em um instrumento que avalia a sensibilidade corneana por meio da mensuração

do limiar de sensibilidade da sua superfície, sendo utilizado em pesquisas com cães^{2,3,4}, gatos⁵, cavalos^{1,6,7}, chinchila^{8,9} e alpacas.¹⁰ Este instrumento possui um filamento de náilon de pequeno diâmetro que, ao entrar em contato com a superfície da córnea de cavalos adultos e potros, estimula aproximadamente 100 terminações nervosas, segundo um estudo realizado por BROOKS et al. (2000). O comprimento do filamento de náilon do estesiômetro possui uma escala de 0,5 até 6,0 centímetros, sendo o tamanho do comprimento inversamente proporcional ao limiar de toque. Quando a pressão exercida pela ponta do filamento na córnea é suficiente para estimular as terminações nervosas da região, observa-se o reflexo de piscar. Desta forma, quanto maior o comprimento do filamento capaz de estimular o reflexo de piscar, menor o limiar de toque e maior o grau de sensibilidade da superfície corneana avaliada.¹ Porém, por tratar-se de um exame observacional e subjetivo, pode haver grande possibilidade de variação interobservadora e intraobservadora.¹¹

Para assegurar que os dados obtidos por observações científicas realizadas por seres humanos se tornem mais objetivos, muitos pesquisadores tem publicado coeficientes que avaliam se dois ou mais observadores assistindo o mesmo comportamento ou resultado registrarão o mesmo dado, revelando a confiabilidade de um determinado dado, instrumento, método ou teste utilizado para a coleta dos referentes dados de diferentes pesquisas médicas.¹²

A variação interobservadora pode ser mensurada em qualquer situação em que dois ou mais observadores independentes avaliam o mesmo dado ou a mesma variável, expressando a concordância entre os observadores em relação ao registro do comportamento observado; já a avaliação intraobservadora mensura as diferenças de interpretações de cada observador isoladamente, ou seja, quando um único observador avalia uma variável em ocasiões distintas e ambas as interpretações são coerentes entre si. Desta forma, os coeficientes de concordância inter e intraobservadora fornecem um importante índice de qualidade e confiabilidade dos dados obtidos em projetos que envolvem técnicas e metodologias observacionais de caráter subjetivo.^{11,12}

O estesiômetro de Cochet-Bonnet tem sido amplamente utilizado em pesquisas recentes como ferramenta para avaliação da sensibilidade da

córnea,^{3,6,8,9,10} porém não existe descrito em literatura quaisquer pesquisas que avaliem o grau de subjetividade da interpretação deste exame e a confiabilidade do uso deste instrumento. Assim, o objetivo do presente estudo visou avaliar os coeficientes de concordância inter e intraobservadora no exame de estesiometria da córnea de cães e coelhos e a confiabilidade do uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet como ferramenta para avaliação da sensibilidade da córnea.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 24 cães e 25 coelhos para cada etapa do experimento, sendo que 79,16% dos cães eram fêmeas (19 animais) e 20,83% machos (cinco animais); das raças de cães avaliadas, 29,17% não possuíam raça definida (sete animais), 25% eram Retriever Dourado (seis animais), 25% Retriever do Labrador (seis animais), 4,16% Cane Corso (um animal), 4,16% Pug (um animal), 4,16% Poodle (um animal), 4,16% Rottweiler (um animal) e 4,16% Pit Bull (um animal); a idade variou de dois a 14 anos, totalizando uma média de 6,83 anos. Dos coelhos, 76% eram fêmeas (19 animais) e 24% eram machos (seis animais); das raças, 40% eram Nova Zelândia (10 animais) e 60% eram Rex (15 animais); a idade variou de três a seis meses, totalizando uma média de quatro meses. Todos os pacientes encontravam-se sadios e livres de doença oftálmica.

Três observadores com diferentes graus de experiência foram selecionados para realização e avaliação da estesiometria ocular nos cães e nos coelhos. O primeiro observador (1) era o mais experiente, atuando na especialidade da Oftalmologia Veterinária há mais de 15 anos; o segundo observador (2) possuía experiência moderada, atuando na especialidade há seis anos; e o terceiro observador (3) era o menos experiente, atuando na especialidade há um ano.

Duas modalidades de estesiometria ocular foram realizadas para obtenção dos resultados do estudo inter e intraobservador. Na primeira etapa, cada observador isoladamente realizou a estesiometria ocular e anotou seus dados

obtidos referentes ao comprimento (em centímetros) do filamento de náilon suficiente para estimular o reflexo de piscar nos animais avaliados, iniciando sempre do observador mais experiente para o menos experiente. Já na segunda etapa, somente um colaborador (auxiliar) realizou a estesiometria ocular nos cães e coelhos enquanto os mesmos três observadores participantes da primeira etapa apenas assistiram o procedimento, sendo este colaborador um profissional atuante na área de Oftalmologia Veterinária e treinado para proceder a estesiometria no presente experimento.

A estesiometria foi realizada, tanto para cães como para coelhos, graduando o estesiômetro inicialmente em 3,0 centímetros e reduzindo o tamanho do fio de náilon a cada meio centímetro gradativamente, até reduzir o fio ao seu menor tamanho (0,5 centímetro), sendo que para cada graduação eram realizados três toques na superfície da córnea do olho direito e do olho esquerdo com a ponta do fio de náilon. Na primeira etapa, o procedimento era interrompido quando o animal avaliado apresentava o reflexo de piscar; na segunda etapa, o colaborador realizava o procedimento até o fio alcançar seu menor tamanho, de forma que os observadores aguardavam a última graduação para, ao mesmo tempo, realizarem suas anotações, evitando assim interferência e influência de resultados entre os observadores. A estesiometria corneana deste estudo foi realizada no mesmo dia para todos os cães e posteriormente para todos os coelhos, de acordo com cada etapa. As Figuras 1 e 2 ilustram a realização da estesiometria ocular em um cão sem raça definida e um coelho da raça Nova Zelândia, respectivamente; já a Figura 3 ilustra a estesiometria ocular de um coelho da raça Nova Zelândia e o reflexo de piscar observado durante o exame.

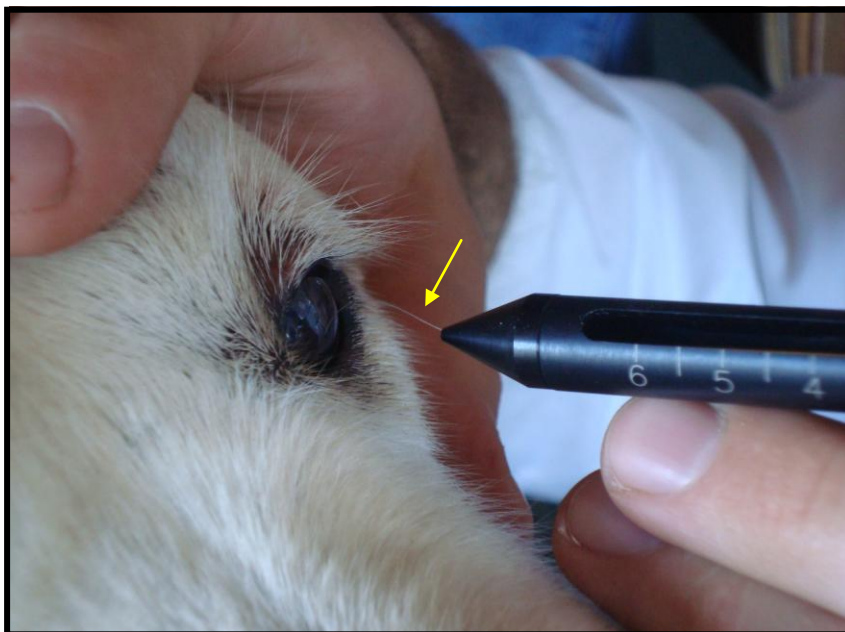


Figura 1. Estesiometria da córnea do olho esquerdo de uma cadela, com 5 anos de idade, sem raça definida – o estesiômetro de Cochet-Bonnet, graduado em 3 centímetros de filamento de náilon (seta amarela), não exerceu força sobre a superfície da córnea suficiente para estimular o reflexo de piscar.

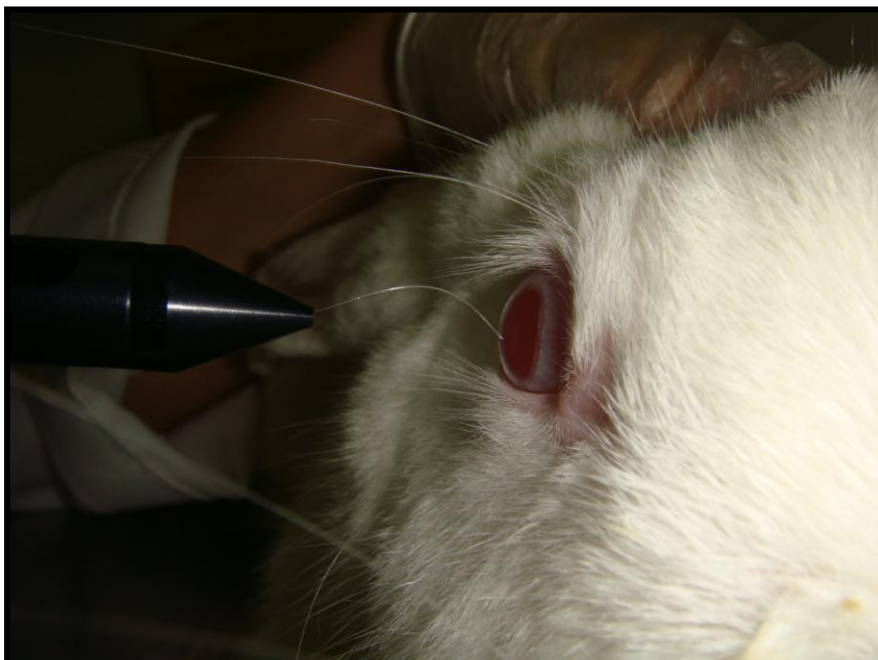


Figura 2. Fotografia da estesiometria da córnea do olho direito de uma coelha, com 5 meses de idade, raça Nova Zelândia - o estesiômetro de Cochet-Bonnet, graduado em 2,0 centímetros de filamento de náilon, não exerceu força sobre a superfície da córnea suficiente para estimular o reflexo de piscar.

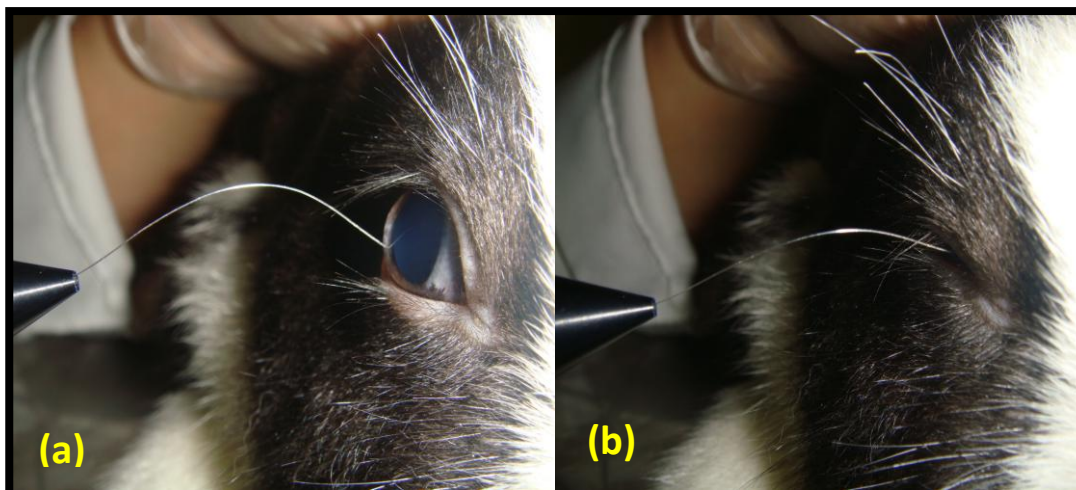


Figura 3. Estesiometria da córnea do olho direito de uma coelha, com 3 meses de idade, raça Nova Zelândia; (a) imagem da ponta do fio de náilon, graduado em 2,5 centímetros, tocando a região central da córnea e (b) imagem da ponta do fio de náilon, graduado em 1,5 centímetro, tocando a região central da córnea e exercendo força suficiente para estimular o reflexo de piscar.

A variabilidade dos dados observacionais obtidos durante a pesquisa foi avaliada pelo teste estatístico Kappa, por meio do programa estatístico MEDCALC[®] statistical software (version 11.5.1.0), o qual mensura os coeficientes e demonstra os índices de concordância inter e intraobservadora, sendo o cálculo do Kappa baseado na diferença entre a concordância de fato presente em comparação à concordância esperada pelo evento ao acaso. Assim, a mensuração desta diferença é padronizada em uma escala de coeficientes que variam de -1 a 1, em que 1 representa a perfeita concordância interobservadora, 0 representa a concordância esperada pelo acaso e valores negativos indicam concordância inferiores ao acaso, ou seja, ausência de concordância entre os observadores.¹³ Desta forma, foram realizadas duas modalidades de cálculo estatístico a partir dos resultados obtidos pela estesiometria dos olhos de cães e coelhos em ambas as etapas: 1) Cálculo para obtenção dos resultados do Kappa referentes à avaliação interobservadora, baseado nos valores da estesiometria obtidos por todos os observadores; 2) Cálculo para obtenção dos resultados do Kappa referentes à concordância intraobservadora, baseado nos valores obtidos por cada

observador na estesiometria do olho direito em relação ao olho esquerdo de cada animal. Os valores de referência para interpretação do teste Kappa estão ilustrados na Tabela 1.¹³

Tabela 1. Interpretação dos coeficientes do Kappa.

Kappa	Concordância
< 0	Ausente
0.01 – 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Regular
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Excelente
0.81 – 0.90	Quase Perfeita

4.5. RESULTADOS

A análise interobservadora de cães e coelhos referentes à primeira etapa do experimento, ilustrada na Tabela 2, demonstra coeficientes do Kappa que variaram de pobres a regulares; a análise interobservadora de cães e coelhos referentes à segunda etapa, ilustrada na Tabela 3, demonstra coeficientes do Kappa que variaram de moderados a excelente.

Tabela 2. Resultados dos coeficientes do teste Kappa referentes à análise interobservadora de cães e coelhos e suas interpretações de concordância da primeira etapa do experimento.

1º Etapa	Cães	Concordância	Coelhos	Concordância
Observador 1 x 2	0,335	Regular	0,103	Pobre
Observador 1 x 3	0,315	Regular	0,218	Regular
Observador 2 x 3	0,235	Regular	0,054	Pobre

Tabela 3. Resultados dos coeficientes do Teste Kappa na análise interobservadora de cães e coelhos e suas interpretações de concordância referente à segunda etapa do experimento.

2º Etapa	Cães	Concordância	Coelhos	Concordância
Observador 1 x 2	0,516	Moderada	0,633	Excelente
Observador 1 x 3	0,562	Moderada	0,525	Moderada
Observador 2 x 3	0,537	Moderada	0,472	Moderada

Já na análise intraobservadora dos cães e dos coelhos referentes à primeira etapa do experimento, ilustrada na Tabela 4, os resultados obtidos demonstram coeficientes do Kappa que variaram de regulares a moderados; na segunda etapa, a análise intraobservadora de cães e coelhos, ilustrada na Tabela 5, demonstra coeficientes do Kappa que variaram de pobres a moderado.

Tabela 4. Resultados dos coeficientes do Kappa na análise intraobservadora (diferença de sensibilidade do OD em relação ao OS) de cães e coelhos e suas interpretações de concordância referentes à primeira etapa do experimento.

1º Etapa	Cães	Concordância	Coelhos	Concordância
Observador 1	0,518	Moderada	0,282	Regular
Observador 2	0,415	Moderada	0,322	Regular
Observador 3	0,275	Regular	0,507	Moderada

Tabela 5. Resultados dos coeficientes do Kappa na análise intraobservadora (diferença de sensibilidade do OD em relação ao OS) de cães e coelhos e suas interpretações de concordância referentes à segunda etapa do experimento.

2º Etapa	Cães	Concordância	Coelhos	Concordância
Observador 1	0,2	Pobre	0,110	Pobre
Observador 2	0,379	Regular	0,198	Pobre
Observador 3	0,455	Moderada	0,03	Pobre

4.6. DISCUSSÃO

A mensuração da sensibilidade da superfície da córnea por meio da estesiometria reflete na observação de dados intrinsecamente subjetivos, uma vez que o reflexo de piscar pode ser interpretado de diferentes maneiras por cada observador.

Os coeficientes do Kappa obtidos com a análise interobservadora de cães e coelhos da primeira etapa demonstram variações de pobres a regulares. VIEIRA et al. (2005) afirmam que os valores do teste Kappa são diretamente afetados pela prevalência da constatação da variável observada, de forma que baixos coeficientes não refletem, necessariamente, baixos índices de concordância. Desta forma, os valores da análise interobservadora obtidos na primeira etapa do experimento podem estar comprometidos devido à

dificuldade na interpretação individual do reflexo de piscar em cada animal, considerando que cada avaliador pode interpretar de diferentes formas o ato de piscar durante o exame.

Além da dificuldade de interpretação do reflexo de piscar, a prática do manuseio do estesiômetro de Cochet-Bonnet pode estar relacionada à obtenção de baixos índices de concordância interobservadora. Uma vez que o fio de náilon deve sofrer deflexão (curvatura após contato com a superfície da córnea) para exercer força e estímulo sensorial local, o contato do fio com os cílios estimula o reflexo de piscar e os dados obtidos conseqüentemente tornam-se incoerentes. Da mesma forma como deslocamento de colunas de ar, vento, sonoridades, ressecamento ocular e movimentação na sala de exame durante a estesiometria são capazes de estimular o reflexo de piscar independentemente da sensibilidade da córnea. Além disso, a estesiometria corneana deste estudo foi realizada no mesmo dia para todos os cães e posteriormente para todos os coelhos, de acordo com cada etapa, havendo a possibilidade de condicionamento do animal para o ato de piscar e aumentando desta forma a variabilidade interobservadora. Assim, a variação dos coeficientes do Kappa de pobre a regular obtidos podem também estar relacionados a variações externas não controladas neste experimento. Porém, os resultados do estudo interobservador obtidos na segunda etapa do experimento demonstram melhores índices de concordância, uma vez que a realização da estesiometria feita por uma única pessoa possivelmente diminuiu a interferência da manipulação do estesiômetro e da variação de interpretação do reflexo de piscar entre os observadores, aumentando desta forma a prevalência de constatação da variável observada.

Segundo Mitchell (1979), a diversificação de variáveis que podem ser estudadas pelo teste estatístico Kappa possui um impacto muito pequeno na obtenção dos coeficientes de concordância interobservadora. O autor afirma que a principal influência sobre estes coeficientes envolve a homogeneidade dos grupos selecionados para o estudo, de forma que em grupos homogêneos obtêm-se, necessariamente, elevados índices do mesmo. Portanto, uma medida que indica elevado índice de concordância pode, em populações heterogêneas, refletir um mau trabalho de diferenciação entre os sujeitos.

Porém, de acordo com o grupo de animais selecionados para o presente experimento, observa-se que a população de cães é mais heterogênea em comparação à população de coelhos, de forma que a segunda reflete coeficientes de concordância tanto inter como intraobservador ainda menores em relação à primeira, segundo os dados obtidos em ambas as etapas da pesquisa. Assim, este dado evidencia que mesmo em populações homogêneas pode-se obter baixos índices de concordância, uma vez que o reflexo de piscar é uma variável de baixa precisão como parâmetro observacional e influenciou diretamente na análise inter e intraobservadora.

Em relação à análise intraobservadora (concordância individual de cada observador quanto aos valores de sensibilidade do OD em relação ao OS) dos cães e dos coelhos, os coeficientes do Kappa obtidos na primeira etapa do experimento variaram de regulares a moderados, indicando interpretações mais coerentes entre si quando cada avaliador foi analisado isoladamente. Porém, apesar desta análise demonstrar que cada observador encontrou menor variação de sensibilidade entre olhos e melhores índices de concordância individual, o estudo interobservador da mesma etapa revela que os observadores possuem pouca concordância entre si quanto às diferenças de sensibilidade encontradas. Desta forma, a metodologia de estesiometria utilizada na primeira etapa promove coleta dados imprecisos e de baixa confiabilidade, reforçando que o reflexo de piscar pode ser interpretado de diferentes maneiras por cada observador, apesar da concordância individual.

Observa-se também que a análise intraobservadora dos coelhos da primeira etapa não foi influenciada pela experiência profissional de cada observador, em relação ao uso da estesiometria como ferramenta para mensuração da sensibilidade da córnea, uma vez que o observador 3, considerado menos experiente, alcançou um coeficiente do Kappa maior (0,507) em relação aos observadores 1 (0,282) e 2 (0,322), sendo este mesmo fato igualmente observado na análise intraobservadora dos cães da segunda etapa (observador 3: Kappa 0,455; observador 2: Kappa 0,379; observador 1: Kappa 0,2).

Sobre os resultados da análise intraobservadora da segunda etapa observa-se variação de coeficientes do Kappa de moderados a pobres,

indicando menores índices de concordância individual por obterem-se maiores diferenças entre os valores de sensibilidade entre olhos. Porém, o estudo interobservador da mesma etapa revela que os observadores possuem melhores índices de concordância entre si quanto às diferenças encontradas, ou seja, os observadores concordam com a variação de sensibilidade entre o olho direito em relação ao olho esquerdo. Portanto, a metodologia de estesiometria utilizada na segunda etapa promove coleta dados mais fidedignos, reforçando que a realização da estesiometria feita por uma única pessoa (um auxiliar) possivelmente diminuiu a variação de interpretação do reflexo de piscar entre os observadores, aumentando desta forma a prevalência de constatação da variável observada e a confiabilidade dos dados coletados.

4.7. REFERÊNCIAS

1. Brooks DE, Clark CK, Lester GD. Cochet-Bonnet aesthesiometer – determined corneal sensitivity in neonatal foals and adult horses. *Veterinary Ophthalmology* 2000; 3: 133-137
2. Stiles J, Krohne S, Rankin A, Chang M. The efficacy of 0,5% proparacaine stored at room temperature. *Veterinary Ophthalmology* 2001; 4(3): 205-207.
3. Williams DL, Pierce V, Mellor P, Health MF. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *Journal of Small Animal Practice* 2007; 48(5): 252-258.
4. Good KL, Maggs DL, Hollingsworth SR, Scagliotti RH, Nelson RW. Corneal sensitivity in dogs with diabetes mellitus. *American Journal of Veterinary Research* 2003; 64(1): 7-11.
5. Blocker T, Wordt AVD. A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and domestic short-haired cats. *Veterinary Ophthalmology* 2001; 4(2): 127-130.
6. Wotman KL, Utter ME. Effect of treatment with a topical ophthalmic preparation of 1% nalbuphine solution on corneal sensitivity in clinically normal horses. *American Journal of Veterinary Research* 2010; 71(2): 223-228.
7. Kalf KL, Utter ME, Woltman KL. Evaluation of duration of corneal anesthesia induced with ophthalmic 0,5% proparacaine hydrochloride by use of Cochet-Bonnet aesthesiometer in clinically normal horses. *American Journal of Veterinary Research* 2008; 69(12): 1655-1658.

8. Muller K, Mauler DA, Eule JC. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eye (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13(1): 29-34.
9. Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin M, 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(1): 14-25.
10. Welihozkiy A, Bedenice D, Price LL, Pizzirani S, Pirie CG. Measurement of corneal sensitivity in 20 ophthalmologically normal alpacas. *Veterinary Ophthalmology* 2011; 14(3): 1463-1469.
11. Mitchell SK. Interobserver agreement, reliability, and generalizability of data collected in observational studies. *Psychological Bulletin* 1979; 86(2): 376-390.
12. Campos MR, Leal MC, Souza PR, Cunha CB. Consistência entre fontes de dados e confiabilidade interobservador do estudo da morbi-mortalidade e atenção Peri e Neonatal no município do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro* 2004; 20(1): 34-43.
13. Vieira AJ, Garrett JM. Understanding Interobserver agreement: the Kappa statistic. *Family Medicine* 2005; 37(5): 360-363.

5. CONCLUSÕES

Segundo dados obtidos com o experimento realizado no Capítulo 1, o uso do estesiômetro de Cochet-Bonnet possibilitou observar os picos máximos de inibição nociceptora promovidos pelas drogas testadas, concluindo-se que o diclofenaco sódico 0,1% possui maior potencial inibitório sobre as fibras nervosas da córnea. Da mesma forma, o emprego desse aparelho possibilitou concluir que os antiinflamatórios testados promovem irritação corneana nos primeiros 15-30 minutos, caracterizados por excitação nociceptora e aumento da sensibilidade, sendo que o cloreto de benzalcônio, um conservante, também promoveu atividade excitatória sobre as fibras nervosas da córnea. Assim, o estesiômetro de Cochet-Bonnet foi eficaz em detectar as variações de sensibilidade corneana promovidas pela aplicação tópica de agentes anti-inflamatórios e pelo agente conservante.

Com relação ao Capítulo 2, conclui-se que o estesiômetro de Cochet-Bonnet é um instrumento de alta precisão para avaliação da sensibilidade da córnea, porém promove baixa confiabilidade na obtenção de dados quando a estesiometria é realizada individualmente por um único observador. Portanto, este experimento concluiu que o uso metodológico de um auxiliar para realização da estesiometria diminui as variações externas geradas pelo manuseio do instrumento, bem como a variabilidade observacional do reflexo de piscar, sugerindo também a necessidade do estudo inter e intraobservador para análise estatística da confiabilidade dos dados obtidos.

Assim, outros estudos e experimentos com variáveis controladas e diferentes metodologias de utilização do estesiômetro de Cochet-Bonnet são necessários para a confirmação da confiabilidade do mesmo para seu uso nos animais.

6. ANEXOS

6.1. ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA


CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 013/2010, referente ao projeto “Sensibilidade e cicatrização corneana”, sob a responsabilidade de Raquel de Araujo Cantarella, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 16 de Agosto de 2010. Este certificado expira em 16 de agosto de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 013/2010, regarding the project “Corneal sensibility and healing”, in charge of Raquel de Araujo Cantarella, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on August 2010. This certificate expires on August, 2011.

Curitiba, 16 de agosto de 2010.


Geraldo Camilo Alberton
Presidente


Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

6.2. ANEXO 2 - NORMAS DA REVISTA VETERINARY OPHTHALMOLOGY



Author Guidelines

Veterinary Ophthalmology publishes original material relating to all aspects of clinical and investigational veterinary and comparative ophthalmology. The following types of material will be published:

- Original articles including clinical (prospective and retrospective clinical studies) and investigational studies. Research studies involving animals must have the approval of the institution's animal care and use committee and be acceptable to the Editor.
- Review articles (including papers which clarify, summarize and critically evaluate the current literature). These will be invited by the Editor or a member of the editorial board.
- Case reports (patient-based studies; either single or multiple animals).
- Viewpoint articles (papers which challenge existing concepts or present an alternative interpretation of available information) are usually invited by the Editor or a member of the editorial board.
- Short communications: Brief research and clinical communications (limited to 6 pages and 12 references).
- Letters to the editor.

All original research and review articles will be peer reviewed by at least two independent referees. Submission

EarlyView

We are happy to announce that *Veterinary Ophthalmology* is now part of the Wiley-Blackwell Early View service. All articles will now be published online in advance of their appearance in a print issue. These articles are fully peer reviewed, edited and complete - they only lack page numbers and volume/issue details - and are considered fully published from the date they first appear online. This date is shown with the article in the online table of contents. Because Early View articles are considered fully complete, please bear in mind that changes cannot be made to an article after the online publication date even if it has not yet appeared in print.

Beginning January 1, 2007, *Veterinary Ophthalmology* accepts manuscripts only through our submission website. To submit a manuscript, please follow the instructions below:

Getting Started

1. Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go

to the *Veterinary Ophthalmology* ScholarOne Manuscripts homepage
<http://mc.manuscriptcentral.com/vop>

2. Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user of ScholarOne Manuscripts.
3. If you are creating a new account:
 - After clicking on 'Create Account' enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as prompted then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID) and then select your area of expertise.
 - Click 'Finish' when done.
4. Log-in and select 'Author Center.'

Submitting Your Manuscript

1. After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link on the Author Center screen.
2. Enter data and answer questions as prompted.
3. Click on the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
4. You will be prompted to upload your files:
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the description of the file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload' button.
5. Review your submission (in both PDF and HTML formats) before sending to the Editors. Click the 'Submit' button when you are done reviewing.

You may stop a submission at any phase and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation via e-mail. You can also log-on to ScholarOne Manuscripts at any time to check the status of your manuscript. The Editors will send you information via e-mail once a decision has been made. A covering letter, signed by all authors, must be included. This should state that the work has not been published and is not being considered for publication elsewhere, and that all authors meet the journal's criteria for authorship (see below). Information on any financial or other conflict of interest which may have biased the work should be provided (even if precautions were taken and authors are satisfied that bias was avoided).

On acceptance, papers become the copyright of the Journal and all accepted papers must be accompanied by a copyright assignment form. Authors will be required to assign copyright in their paper to the Journal Title. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. To assist authors an appropriate copyright assignment form will be supplied by the editorial office. (Government employees in both the US and the UK need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned.) The form can be found [here](#).

Manuscript Style

The manuscripts must be in Microsoft Word format (.doc or .docx). The manuscript (including footnotes, references, figure legends, and tables) must be double-space typed, using 12-point Times New Roman font, 1-inch margins, and left justification. Original Research papers and Review Articles should usually not be longer than 5000 words. Viewpoint articles will not normally exceed 2000 words, and reviews of books and information materials should be less than 1000 words long.

Title Page

The title page should include a descriptive title for the article, the names [first name, initials of middle name(s), surnames], qualifications and affiliations of all authors, and the full postal address, fax, e-mail (if available), and telephone number of the author to whom correspondence should be addressed. A suggested running title of not more than 50 characters including spaces should be included.

Abstract and Keywords

The abstract should be on a separate page and should not exceed 250 words. Where possible, the abstract should be structured. Suggested headings for abstracts of primary research are: Objective; Animal studied, Procedure(s), Results, and Conclusions.

Key words are used by indexes and electronic search engines, and should appear after the abstract. Use the heading 'Key words', typed in bold and followed by a colon, and then the key words separated by commas. Include up to six key words. Also enter the key words where prompted during the submission process.

Main Text

This should begin on a separate page. Sections within the main text should be appropriately sub-headed: Introduction; Materials and methods, Results, and Discussion. Abbreviations and footnotes should be avoided where possible.

References

These should be in the Vancouver style. References should be numbered sequentially as they occur in the text and identified in the main text by arabic numbers in brackets after the punctuation. The reference list should be typed on a separate sheet from the main text, and references should be listed numerically. The following are examples of the style. All authors should be listed and journal titles and page ranges should not be abbreviated.

1. Bagley LH, Lavach JD. Comparison of postoperative phacoemulsification results in dogs with and without diabetes mellitus: 153 cases (1991-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; 205: 1165-1169.
2. Barnett KC. *Color Atlas of Veterinary Ophthalmology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1990.
3. Davidson MG. Equine ophthalmology. In: *Veterinary Ophthalmology* 2nd edition (ed. Gelatt KN). Lea and Febiger: Philadelphia, 1991; 576-610

4. Maggs DJ, Nasisse MP. Effects of oral L-lysine supplementation on the ocular shedding rate of feline herpesvirus (FHV-1) in cats (abstract). *28th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists* 1997; 101: 67-78.

Please note that work that has not been accepted for publication and personal communications should not appear in the reference list, but may be referred to in the text (e.g. M. van der Burgh, personal communication). Also, it is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication.

Electronic Artwork

Figures must be uploaded as separate files and not be embedded in the main text file. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available on the Wiley Homepage at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

The figures should be referred to as 'Fig.' and numbered consecutively in the order in which they are referred to in the text. Captions to figures, giving the appropriate figure number, should be typed on a separate page at the end of the manuscript; captions should not be written on the original drawing or photograph. In the fulltext online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure. Further guidelines regarding the submission of artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Video Files

The journal will consider up to 2 video files to accompany articles. For video files to be accepted, they must clearly show a dynamic condition that can not be adequately captured in still images. The Editor and/or Associate Editors will scrutinize all video submissions very carefully to assure they meet the intent of providing unique information. Video files of routine imaging findings will not be accepted. Up to 2 video files will be considered for each paper. Video files must be submitted in Quicktime format and each file must be less than 5MB in size. The video files will accompany the online version of the manuscript only; reference to the video file should be made in the print version of the paper.

Tables

Clear tables which contain essential data are welcome. Format tables with the table function in a word processor, such as MS Word, on a separate page with the legend typed above. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. All abbreviations must be defined in footnotes to the table. Number tables consecutively in the order they occur in the text, with Arabic numerals.

Acknowledgements

Acknowledgements should be brief and must include reference to sources of financial and logistical support. Author(s) should clear the copyright of material they wish to reproduce from other sources and this should be acknowledged.

7. VITA

Médica Veterinária graduada pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (2007). Possui pós-graduação Lato sensu em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais pela empresa Qualittas, residência em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pela Universidade Tuiuti do Paraná e aperfeiçoamento em Oftalmologia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Possui também cursos em Neurologia Veterinária e atuação profissional direcionada para esta especialidade. Atualmente, está inserida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná (especialização Stricto sensu), desenvolvendo pesquisa na área de Neuro-Oftalmologia.