

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

ANA CAROLINA DA VEIGA RODARTE DE ALMEIDA

CONTRIBUIÇÕES PARA A OFTALMOLOGIA DESCRITIVA DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS E SELVAGENS

CURITIBA

2014

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

ANA CAROLINA DA VEIGA RODARTE DE ALMEIDA

CONTRIBUIÇÕES PARA A OFTALMOLOGIA DESCRITIVA DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS E SELVAGENS

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

Orientador: Professor Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA

2014

Texto

A447 Almeida, Ana Carolina da Veiga Rodarte de  
Contribuições para a oftalmologia descritiva de animais  
domésticos e selvagens. / Ana Carolina da Veiga Rodarte de  
Almeida. – Curitiba : 2014  
128 f. il.

Orientador: Fabiano Montiani-Ferreira  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias

1. Oftalmologia veterinária. 2. Retina - Doenças.  
I. Montiani-Ferreira, Fabiano. II. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título

CDU 619:617.7

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada “**CONTRIBUIÇÕES PARA A OFTALMOLOGIA DESCRITIVA DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS**” apresentada pela Doutoranda **ANA CAROLINA DA VEIGA RODARTE DE ALMEIDA** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 21 de março de 2014

Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira  
Presidente/Orientador

Professora Dra. Paula Diniz Galera  
Membro

Professor Dr. Marcos Pereira de Ávila  
Membro

Professor Dr. Mário Teruo Sato  
Membro

Professor Dr. Peterson Triches Dornbusch  
Membro

## DEDICATÓRIA

A meus pais, **Maria Bernadete** e **José Henrique**, que são o meu alicerce e me apoiaram durante todos estes anos.

A meus irmãos **José Henrique** e **Pedro Paulo**, pelo carinho, por fazerem parte da minha história e que, apesar da distância, são meus companheiros.

A minha vó **Lurdinha V. Rodarte**, pelo exemplo de vida, fé, e que em toda a minha jornada torceu, vibrou e me deu apoio incondicional.

A todos os meus familiares que torceram se preocuparam e acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** e a **JC**, pelo dom da vida, pelo amor incondicional e pela providência que me conduziu e me permitiu ter o necessário, me dando força para vencer mais esta etapa. E a **Nossa Senhora**, pela proteção e intercessão.

Ao meu orientador **Fabiano Montiani-Ferreira**, pela oportunidade, confiança e orientação. Por transmitir um enorme entusiasmo e paixão pela oftalmologia e pela ciência, fato este que me motivou nesta jornada. Obrigada pelo exemplo que foi pra mim, pois tu foste um dos meus precursores na oftalmologia veterinária.

Ao **Dr. Simon Petersen-Jones**, pela oportunidade de acompanhar o laboratório de oftalmologia comparada da Michigan State University (MSU). Obrigada pela disponibilidade, carinho e paciência. Agradeço também a toda equipe deste laboratório, em especial a **Paige Winkle e Laurence Ocelli**, pela prontidão, ambas foram fundamentais, auxiliando na realização da parte genotípica do projeto e na análise dos resultados da tomografia de coerência ótica (TCO) desta pesquisa.

À **Dra. Ingeborg Langohr**, professora da Louisiana State University (LSU) pela realização de exames histopatológicos e imunohistoquímicos deste trabalho. Bem como, pela ajuda na língua inglesa e correção de dois capítulos, resultando na coautoria deles.

À Fundação Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) PEG- PG, pela concessão da bolsa de estudo. E ao PDSE pela concessão da bolsa de estudos no exterior

À **Optigen** pela realização do teste genético RD/OSD e ao **Dr. Christian Leutegger** e a **IDEXX** pela realização dos testes para Herpesvírus Canino Tipo 1 nos animais desta pesquisa

Ao **Célio Guedes**, proprietário da cadela Shaira, portadora da Displasia de retina, que gentilmente permitiu que nós a acompanhásemos e posteriormente nos doou o animal permitindo a realização desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Oftalmologia Comparada da UFPR, que me ajudou nesta jornada. Agradeço imensamente aos meus colegas **Suelen Baldotto**,

**Lucianne Leigue, André Somma, Savia Caline, Amália Turner, Letícia Olbertz**, pelo esforço, e ajuda nos cuidados dos animais envolvidos neste projeto. Principalmente ao **Leandro Lima**, que antes do meu ingresso no doutorado foi responsável pelos cuidados dos animais e me ajudou a compilar os dados clínicos e histológicos dos mesmos. Agradeço imensamente a cada aluno de graduação e bolsista que me ajudou com os Pit Bulls. Principalmente aos meus colegas **Gustavo Alburquerque, Camila Bollmann, Andreise Przydzimirski, Juliana Kravetz, Verena Voget, Mariza Bortolini, Rafaelle Gerez, Fernanda Cancelli, Christiane Montenegro**. Obrigada pelo empenho, dedicação, força, esforço e amor por cada um dos animais envolvidos neste projeto. Certamente todos vocês tiveram papel fundamental nesta pesquisa.

À colega **Andressa Tucholski** pela parceria e paciência em realizar a ultrassonografia ocular dos animais. Certamente essa parceria gerou e ainda gerará muitos frutos.

Ao prof. Dr. **Peterson Dornbusch**, que nos realizou a fundoscopia e captação de imagens deste trabalho e pela coautoria de um dos capítulos. Aos **Prof. Dr. Naoye Shiokawa e Prof. Dr. Mario Teruo Sato**, que auxiliaram na realização de alguns exames retinianos e por permitirem que eu acompanhasse o serviço de oftalmologia, resultando em coautorias de trabalhos científicos. E ao prof. Dr. Rogério Lange, pela prontidão e amplo conhecimento sobre animais selvagens que compartilhou resultando na coautoria de um dos trabalhos.

Ao prof. Dr. **Ivan Roque**, diretor do hospital veterinário da UFPR, por ceder um espaço no HV e auxiliar nos cuidados dos Pit Bulls.

A todos os veterinários residentes do hospital veterinário da UFPR, em especial a **Otávia Dorigon, Tatiana Schneider, Camila Sanches, Dani Mattos, Débora Callado, Mhayara Reusing, Bruno Castilhos, Daniel Capucho, Tatiane Sorgon e Ana Roberge**, por me ajudarem nos cuidados clínicos e cirúrgicos de cada animal.

Aos meus colegas de pós-graduação, obrigada pela força e apoio de cada um nesta etapa, pela amizade e cumplicidade.

Aos meus queridos e amados amigos **Lucas Alaião, Raquel Cantarella, Aline Fujita, Ricardo Hayashi, Suelen Baldotto, Denis Fernandes, Camila Linden, Fernanda Cunha, Andressa Festa, Francieli Manginelli, Vinicius Vieira, Crislaine Rosa, Bruna Hartmann, Priscila Cavilha, Cristina Kraemer, Rejane**

**Veiga, Clarice Freire, Paula Hunning, Luciana Queiroga, Simone Scherer, Mariana Pavelski, Bryan Grochowski, Mike Kategaya, Alejandro El Campeon, aos lindos do universo, amigos da UZP, do forró, da FIT e de Porto Alegre,** obrigada pelo carinho, força, apoio, festas, sorrisos e por me suportarem nos momentos mais difíceis, permitindo que meus dias em Curitiba se tornassem mais fáceis. Amo cada um de vocês.

Aos Meus queridos e amados gatos **Edubas e Gatolha**, meus companheiros do dia a dia. E aos **Pit Bulls**, em especial a Shaira, objetos de pesquisa desta tese, que me ensinaram a entender a pureza do amor simples e incondicional sem esperar nada em troca. A vocês também dedico este trabalho.

A minha família, minha mãe **Bernadete**, pai **José Henrique** e irmãos **José Henrique e Pedro Paulo** que sempre estiveram presentes, torcendo, aconselhando e ajudando a tomar decisões corretas. Amo vocês!

Foram tantas as pessoas que passaram pela minha vida nesta jornada e que contribuíram para concretização deste trabalho, para meu crescimento profissional e pessoal, que se torna impossível agradecer-los nominalmente. Portanto, obrigado a todos que torceram e me ajudaram em gestos e palavras. Vocês moram no meu coração.

Muito Obrigada!

## RESUMO

A presente tese de doutorado buscou contribuir com a oftalmologia clínica, histopatológica e investigativa de animais domésticos e selvagens. Para tanto o trabalho foi dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo é uma breve introdução salientando a importância do estudo fenotípico e genotípico das doenças generalizadas da retina em cães e o reflexo destas pesquisas na oftalmologia comparada. Neste capítulo serão justificados os capítulos seguintes da tese, abrangendo inclusive a importância do estudo fenotípico e histopatológico da displasia de retina canina. Por fim, na introdução cita-se o que será abordado no estudo oftálmico descritivo sobre aves de rapina, mais especificamente a coruja-orelhuda (*Asio clamator*).

O segundo capítulo discorre sobre a caracterização fenotípica da displasia de retina (DR) em cães da raça Pit Bull Terrier, artigo este, que será submetido ao periódico *Veterinary Ophthalmology*. Até então a descrição da ocorrência de DR nesta raça era inédita na literatura. Os exames oftálmicos de rotina e as imagens de retina foram obtidos e estudados durante três gerações. Adicionalmente neste período foi estabelecido o heredograma desta colônia. Alguns animais foram submetidos a exames ultrassonográficos do bulbo ocular, tomografia de coerência óptica e histopatologia ocular. A presente caracterização demonstrou modo de herança autossômico dominante, que é incomum na maioria dos casos de DR hereditária canina. Com testes genéticos, excluiu-se ainda a possibilidade dos animais desta colônia serem afetados pela displasia óculo-esquelética, uma doença bem conhecida e descrita em cães da raça Labrador Retriever e Samoieda, tratando-se portanto de uma condição inédita também do ponto de vista genético.

O terceiro capítulo é um estudo histopatológico que complementa o estudo fenotípico da mesma condição descrita acima. Este artigo, que será submetido a publicação no periódico *Veterinary Ophthalmology*, caracteriza com detalhes os achados histopatológicos, da DR hereditária dos cães da raça Pit Bull Terrier oriundos da mesma colônia. Através do processamento histotécnico de rotina, associada a colorações especiais foi possível estudar e caracterizar histopatologicamente as lesões decorrentes da DR desde o estágio inicial até o crônico da doença. A natureza e a gravidade das alterações histológicas da DR variaram de acordo com a evolução da idade dos animais.

O quarto capítulo se refere a um artigo publicado no periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*, sobre um estudo oftálmico descritivo em coruja-orelhuda (*Asio clamator*), de forma que contribuiu com detalhes sobre as observações morfológicas do crânio e da anatomia oftálmica. Foram ainda estabelecidos os parâmetros oftálmicos para testes oftálmicos específicos incluindo o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), cultura da microbiota normal da conjuntiva, estesiometria, pressão intraocular (PIO), espessura de córnea central (ECC), diâmetro horizontal da rima palpebral, diâmetro horizontal da córnea e oftalmoscopia indireta.

Palavras-chave: oftalmologia, oftalmologia comparada, doenças hereditárias oftálmicas, histopatologia ocular, testes oftalmológicos, retina, cães, rapinantes.

## ABSTRACT

This PhD thesis aimed to bring novel information concerning clinical, histopathologic, descriptive and investigative ocular research in domestic and wild animals. For that, this work was divided in four chapters. The first chapter is a brief introduction, with emphasis on a discussion of the phenotype and genotype of general retinal diseases in dogs. It also stresses the importance of these types of investigations for comparative ophthalmology. This chapter substantiates the other chapters of this thesis covering points about phenotype and histological investigation from the inherited form of retinal dysplasia in Pit Bull Terriers dogs. Then, the importance of performing descriptive studies in birds of prey, more specifically the owls is discussed.

The second chapter describes the phenotype characterization of an inherited form of retinal dysplasia (RD) in Pit Bull Terrier dogs. This paper will be submitted for publication in the periodical entitled *Veterinary Ophthalmology*. Regular ophthalmic examinations and fundus photography was performed on three different generations of offspring from the founder animal. Additionally in this period was established the heredogram of this colony. Some selected animals were examined using ocular ultrasonography, optical coherence tomography and histologic exam. This is the first investigation reporting and characterizing this disease in Pit Bull Terriers. Also suggests an uncommon mode of inheritance, autosomal dominant condition. Also, the possibility that the animals of this colony had the same mutation already recognized and described in Labrador Retrievers and Samoyeds, the oculoskeletal dysplasia (OSD), was excluded with genetic testing. Thus the condition is novel also from the genetic standpoint.

The third chapter is a histological study which complement the phenotype study of the same condition above. This paper will be submitted to publication in the journal *Veterinary Ophthalmology*, and characterizes in details the histologic findings of the same condition above, the RD in Pit Bull Terriers dogs from the same breeding colony. Through histotechnical routine processing associated with special stains was possible to perform the histologic characterization of these RD lesions since its initial up to the chronic stages of the RD. The nature and severity of the histological findings of RD varied with advancing age of the animals.

The fourth chapter refers to a published paper in the journal "*Pesquisa Veterinaria Brasileira*", an ophthalmic descriptive study of the striped owl (*Asio clamator*). This study aimed to describe the most relevant morphological observations of the skull and the anatomy characteristics from the eyeballs of this species. Additionally, normal values and patterns for selected ophthalmic diagnostic tests, such as: Schirmer Tear Test (STT), normal conjunctival bacterial microbiota, esthesiometry, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness (CCT), horizontal palpebral fissure length, horizontal, corneal diameter and funduscopy were determined.

Key words: ophthalmology, comparative ophthalmology, ophthalmic inherited disease, ocular histopathology, ophthalmic tests, retina, dogs, birds of prey.

## LISTA DE FIGURAS

**Figure 1 (Capítulo 1)** - (A) Desenho esquemático da retina, representando as principais células da retina componentes da retina sensorial e da EPR, e os discos membranosos empilhados tanto nos cones quanto nos bastonetes. Fonte: Rodarte-Almeida, ACV. (B) Imagem histológica da retina, evidencia-se as camadas da retina sensorial e epitélio pigmentar da retina. Fonte: Dr Dubielzig, R., COPLOW ..... 23

**Figura 2 (Capítulo 1)** – Imagem fotográfica da retina normal de um cão, Pit Bull Terrier de 1 ano de idade. Observa-se o fundo não tapetal (marrom-avermelhado), o fundo tapetal (amarelado), o sistema vascular composto por veias e arteríolas e o nervo óptico (NO)..... 23

**Figura 1 (Capítulo 2)** – Heredrograma da colônia de cães, estabelecida por meio de uma cadela probanda (1.03) (cabeça de flecha). Note que a ninhada (cães 3.1 e 3.3) produzida pelo cruzamento entre dois membros da mesma ninhada F1 (2.13 e 2.14) produziram tanto cães afetados como não afetados. Os cruzamentos entre cães da raça Pit Bull Terrier com cães SRD (macho 1.2 e fêmeas 2.15 e 2.30) resultaram em animais portadores da DR. Avaliando estes resultados, nos sugere herança autossômica dominante. Os quadrados representam os cães machos, os círculos as cadelas; os símbolos pretos identificam os cães afetados pela displasia de retina; os símbolos brancos representam cães não afetados; a cabeça de flecha aponta a probanda deste estudo; e os círculos e quadrados com traços representam animais que vieram a óbito..... 39

**Figura 2 (Capítulo 2)** – Imagens do fundo de olho, evidenciando exemplos das formas multifocal e geográfica de displasia de retina. A e B - Olho direito do cão 3.3 aos 45 dias de idade e aos 5 meses de idade respectivamente. Observe dobras múltiplas da retina na área tapetal e não tapetal. Note ainda, a região opaca sobre o DO (seta preta), que progrediu para área com hiperrefletida na região dorsal DO. C - Olho esquerdo do cão 2.27 aos três meses de idade. Note área extensa de lesões de displasia de retina geográfica, dorsais ao DO, apresentando algumas regiões hiperrefletidas e áreas hipo refletidas ao centro da região hiperrefletida (cabeça de seta branca). D - Olho direito do cão 3.7 aos sete meses de idade. Observe a forma multifocal da displasia de retina, envolvendo áreas da retina entre os vasos retinianos em sua região dorsal. E - Olho direito do cão 3.2 aos quatro meses de idade. Note lesões da displasia de retina geográfica (cabeça de seta branca) e descolamento parcial de retina dorsal ao DO. F - Olho esquerdo do cão 3.8 aos sete meses de idade. Observe lesões geográficas da displasia de retina (cabeça de seta branca) com região hiperrefletida , descolamento parcial de retina (seta preta) dorsalmente ao DO, e ainda note as dobras na retina localizadas na região tapetal. .... 42

**Figura 3 (Capítulo 2)** – Imagens fotográficas do fundo de olho de diferentes cães, evidenciando exemplos da forma anormal da mielina, envolvendo a cabeça do disco óptico. Imagens obtidas de cadelas Pit Bull Terriers. A – Olho direito da cadela 2.28,

B - Olho direito da cadela 2.26, C – Olho esquerdo da cadela 3.07 e D - Olho direito da cadela 2.13 sendo que ambas são cadelas Sem Raça Definida (SRD) oriundas de uma cruz de um cão SRD com uma cadela Pit Bull Terrier. As cadelas 2.28, 2.26, 3.07 apresentavam sete meses de idade e a cadela de 2.13 três anos de idade no momento da captação da imagem. E e F- Fotos do fundo do olho direito da cadela 2.27 aos 45 dias de vida (E) e aos 2 anos de idade (F). Note a forma geográfica da DR nas diferentes idades deste animal demonstrando a evolução das lesões, onde é possível observar diminuição de mielina na cabeça do disco óptico.44

**Figura 4 (Capítulo 2)** – Imagens coloridas do fundo do olho agrupadas com imagens da retina obtidas pelo exame de tomografia de coerência óptica de domínio espectral (TCO-DE). Observe os diferentes tipos de lesões de displasia de retina (DR) e as anormalidades na forma da cabeça do disco óptico em dois cães da raça Pit Bull Terrier afetados pela DR. A e B - Olho esquerdo da cadela 3.07 aos seis meses de idade acometida com a forma multifocal da DR na região tapetal da retina. A - Duas dobras envolveram o segmento interno (SI) e o segmento externo (SE) da camada dos fotorreceptores, sendo estes indiferenciáveis (setas brancas). A camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), a camada nuclear interna (CNI) e a camada plexiforme interna (CPI) estavam desorganizadas (setas brancas). Uma pequena área hiporreflexiva foi visível entre os SE e o epitélio pigmentar da retina (EPR) – coroide (CO) (cabeças de setas pretas). B – Note a intensa redução do padrão de mielina na cabeça do DO (seta vermelha), circundada por segmentos normais da retina. C, D e E - Cão 3.03 aos seis meses de idade apresentando lesões da forma geográfica da DR. Observe nas imagens de TCO-DE a grande quantidade de dobras na retina, em forma tubular, iniciando na camada SI/SE dos fotorreceptores (setas brancas), onde as CNE, CPE, CNI e CPI estavam desorganizadas e frequentemente finas nas áreas sob as dobras. Note ainda, estruturas hiperecóticas circulares ou amorfas, em sua maioria não estando em contato com as camadas SI/SE dos fotorreceptores caracterizando as rosetas (setas azuis). C – Observe a intensa desorganização das camadas da retina, impossibilitando a identificação das camadas e abaixo desta região é possível observar área hiporreflexiva visível entre os SE e o epitélio pigmentar da retina (EPR) – coroide (CO), sugerindo descolamento de retina nesta região. D – Note a desorganização do tecido da retina ao redor no nervo óptico (NO) com elevação da cabeça do nervo óptico sugerindo a alteração do padrão normal de mielinização. E – Imagem evidenciando rosetas hiperecóticas circulares ou amorfas, com excesso de tecido retiniano, e algumas em formato circular com centro hipoecótico. Nestes casos é impossível identificar as camadas da retina nas regiões acometidas pelas lesões geográficas da DR (seta azul). C e D - Olho esquerdo do cão 3.03 e E – Olho direito do mesmo animal. .... 48

**Figura 5 (Capítulo 2)** – Imagens A,B,C,D e H são de uma cadela Pit Bull Terrier (2.10) de quatro meses de idade, acometida com a forma geográfica da displasia de retina (DR). A. Aspecto macroscópico do bulbo ocular seccionado ao longo do seu eixo axial. Na região do nervo óptico a retina apresenta uma projeção em direção à câmara vítrea. B. Fotomicrografia da retina apresentando invaginação focal dos SE/SI dos fotorreceptores e descolamento verdadeiro com hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR), formando um tubo incompleto, caracterizando as dobras. Coloração Tricrômico de Gomori. C. Fotomicrografia da retina mostrando tubos completamente fechados (rosetas) (seta preta). O lúmen é delimitado pela

membrana limitante externa (MLE) rodeada pela camada nuclear externa (CNE) desorganizada e pela degeneração dos fotorreceptores. Tricrômico de Gomori. D. Fotomicrografia da retina contento dobra retiniana larga com presença de rosetas múltiplas (seta preta) acompanhadas pelo descolamento de retina verdadeiro. Note a desorganização da camada de células ganglionares e nas camadas nucleares. As camadas plexiformes por sua vez são indistinguíveis. Tricrômico de Gomori. E. Fotomicrografia da retina da cadela Pit Bull Terrier (2.28), de 23 dias de vida, afetada com a forma geográfica da DR. Observe a presença de rosetas múltiplas com uma importante desorganização das camadas retinianas. Hematoxilina e Eosina de Harris. F. Fotomicrografia da retina de um cão Pit Bull Terrier (2.9), de 23 dias de vida. Note a grande quantidade de rosetas pequenas e uma roseta grande, acompanhadas de intensa desorganização das camadas externas na retina e descolamento de retina verdadeiro. Hematoxilina e Eosina de Harris. G. Fotomicrografia do segmento posterior do bulbo ocular de um cão Pit Bull Terrier (2.19) de um dia de vida. Note a retina primitiva com presença de proeminência da camada de fibras nervosas ao nível do nervo óptico (cabeça de seta preta), provavelmente representando a retina sensorial. O NO aparentemente encontrava-se levemente escavado, provavelmente em decorrência da redução da quantidade de mielina. Hematoxilina e Eosina de Harris. H. Fotomicrografia do seguimento posterior do bulbo ocular (cão 2.10), evidenciando a presença de algumas dobras, bem como de rosetas de diferentes tamanhos, levando a desorganização das camadas da retina ao redor do NO. Tricrômico de Gomori. .... 52

**Figura 1 (Capítulo 3)-** Aspecto macroscópico de bulbos oculares seccionados ao longo do eixo axial de dois cães da raça Pit Bull Terrier com displasia de retina. A – Olho esquerdo de um cão com 24 horas de idade (animal 3.2) apresentando projeções retinianas internas na base do disco óptico (seta). B – Olho esquerdo de uma cadela de sete anos de idade (animal 1.1) apresentando descolamento total de retina (aspecto em forma de asa de gaivota), catarata madura, aumento da câmara vítrea e aumento do diâmetro axial do bulbo ocular (indicativo de buftálmia) e coloração alaranjada sugestiva de hemorragia intraocular. .... 73

**Figura 2 (Capítulo 3) -** Fotomicrografias da retina de cães da raça Pit Bull Terrier com displasia de retina. A – Cão de 24 horas de idade (animal 3.2). Note a desorganização da camada neuroblástica externa com a formação de uma dobra (estrela). Observe descontinuidade da membrana limitante externa (seta) com descolamento parcial da retina na base da dobra (Hematoxilina e Eosina - H.E.) B – Cão de 24 horas de idade (animal 3.1). Note a intensa desorganização da retina primitiva (estrela), a qual apresenta diversas rosetas compostas por uma camada espessa de células neuroblásticas circundando um lúmen central delimitado pela membrana limitante externa (ponta de seta) (H.E.). C – Cão de 21 dias de idade (animal 2.4) com duas rosetas na retina displásica. Observe as camadas diferenciadas com desorganização das camadas nuclear e plexiforme internas formando as rosetas (estrela). No seu interior, está a membrana limitante externa envolta pela camada nuclear externa (asterisco) (H.E.). D – Cadela de quatro meses de idade (animal 2.3). Observe a desorganização das camadas retinianas com formação de dobras e rosetas complexas de três camadas (Tricrômico de Gomori). E – Mesmo animal que na Figura 2D, evidenciando uma dobra na retina com células no interior da dobra e adelgaçamento focal da camada nuclear externa, membrana plexiforme externa e camada nuclear interna. Note a hipertrofia segmentar do

epitélio pigmentar da retina (seta) indicando descolamento localizado da retina sensorial (Tricrômico de Gomori). F – Cadela probanda de sete anos de idade (animal 1.1) com a forma crônica de displasia de retina. Note a atrofia e gliose reativa marcada da retina com a presença de estruturas semelhantes a rosetas (pontas de seta) próximas ao disco óptico (não visível na imagem) (H.E.). ..... 76

**Figura 3 (Capítulo 3)**- Fotomicrografia da retina do bulbo ocular direito de uma cadela da raça Pit Bull Terrier de sete anos (animal 1.1) com a forma crônica de displasia de retina. A – Note depósitos de colágeno (áreas de fibrose; estrela), que também pode ser encontrado ao redor de vasos sem provocar redução do diâmetro luminal vascular (seta). Observe ainda a intensa desorganização tecidual da retina e no canto inferior esquerdo note área extensa de corpo vítreo condensado rico em colágeno (*Hashtag*) (Tricrômico de Massom). B – Margem arredondada da retina indicativo de ruptura retiniana, com presença de vasos esclerosados (seta). C – Observe o espessamento anormal da parede vascular, corado levemente positivo para Alcian Blue e sem provocar redução do diâmetro luminal vascular (seta) (PAS Alcian Blue). D – Note a grande desorganização das camadas da retina, com presença de fendas sugestivas de retinosquize (cabeça de seta)..... 77

**Figura 4 (Capítulo 3)** - Fotomicrografia da retina do bulbo ocular esquerdo de uma cadela da raça Pit Bull Terrier de sete anos (animal 1.1) com a forma crônica de displasia de retina. Note o descolamento da retina em forma de asa de gaivota e numerosos vasos esclerosados proeminentes (setas) na retina atrofiada com gliose difusa evidenciada pela imunomarcção difusa marcada para *Proteína Ácida Fibrilar Glial* (Cromógeno Vector Nova Red, Contracoloração Hematoxilina). ..... 78

**Figura 5 (Capítulo 3)** - Fotomicrografia da retina de uma cadela da raça Pit Bull Terrier de um ano e meio de idade (animal 4.2). A – Área central da retina evidenciando imunomarcção para *Proteína Ácida Fibrilar Glial* (GFAP) levemente aumentada (seta). B – Região periférica apresentando imunomarcção mais intensa para GFAP (seta) indicativa de gliose reativa e, conseqüentemente, de degeneração retiniana mais avançada (Cromógeno Vector Nova Red, Contracoloração Hematoxilina). ..... 78

**Figura 1 (Capítulo 4)** - Os testes oculares realizados nos olhos das corujas-orelhudas. (A) Teste lacrimal de Schirmer. (B) Coleta de amostra da microbiota da conjuntiva e córnea. (C) Análise estesiométrica da córnea central. (D) Mensuração da PIO. .... 97

**Figura 2 (Capítulo 4)** - Os testes oculares realizados nos olhos de corujas-orelhudas. (A) Mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral. (B) Mensuração do diâmetro horizontal da córnea. (C) Paquimetria de córnea. (D) Oftalmoscopia indireta com lente de 20 dioptrias. .... 99

**Figura 3 (Capítulo 4)** - Elementos ósseos do esqueleto da cabeça de uma coruja-orelhuda (*Asio clamator*) adulta. (A) Aspecto dorsal. (B) Aspecto lateral direito. (C) Aspecto rostrolateral direito. A mandíbula e o anel de ossículos esclerais foram removidos. (D) Aspecto ventral do bulbo ocular direito após remoção dos tecidos moles. Notar a forma tubular do anel de ossículos esclerais (estrela) e como os

ossículos laterais são mais longos em comparação aos mediais; o sesamoide da esclera (cabeça de seta) localizado anterior e medialmente, próximo à margem anterior do anel de ossículos esclerais, margem que correspondente à região do limbo da córnea no vivente; e a lâmina cartilaginosa da esclera (asterisco), fixa à margem posterior do anel de ossículos, em forma de cúpula. Legenda: aoe, anel de ossículos esclerais esquerdo; osso frontal (F); osso lacrimal (L); margem supraorbital (mso); zona flexora craniofacial (zfcf); processo supraorbital (pso); incisura do ducto nasolacrimal (idn); osso jugal (J); lâmina cartilaginosa da esclera (lce); processo do osso ectetmoide (pe); processo palatino da maxila (ppm); processo pós-orbital (ppo); processo zigomático (pz); osso sesamoide da esclera (se). (E) osso ectetmoide; forame comum para os nervos oculomotor III (fc), troclear IV e abducente VI; forame óptico (fo); forame do nervo trigêmeo V (ft); maxila (M); osso palatino (P); processo orbital do osso quadrado (po); osso pterigoide (Pt); osso quadrado (Q); septo interorbital, osso mesetmoide (si); sulco do nervo olfatório (sno). Barra = 1cm. .... 103

**Figura 4 (Capítulo 4)** - Imagem lateral do olho de uma coruja *Asio clamator*, evidenciando filoplumas em ambas as pálpebras, superior quanto inferior (setas), margem palpebral inferior mais extensa que a superior, margem palpebral irregular, demonstrando um desnível em “degrau” entre os limbos palpebrais anterior e posterior (asterisco), despigmentação na extremidade lateral da margem da terceira pálpebra e câmara anterior do olho profunda (DTP)..... 104

**Figura 5 (Capítulo 4)** - Olho esquerdo de uma coruja-orelhuda adulta, evidenciando a terceira pálpebra, de coloração esbranquiçada e margem pigmentada, que está localizada dorsomedialmente (asterisco). Notar a superfície irregular das margens palpebrais de ambas as pálpebras (setas). ..... 105

**Figura 6 (Capítulo 4)** - Íris de olhos de corujas-orelhudas em diferentes faixas etárias, evidenciando as diferentes colorações, os ligamentos pectinados e os espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana) observáveis sobre na superfície da íris. (A) Ligamentos pectinados do olho direito de uma coruja de aproximadamente um mês de idade. Observar a grande extensão dos ligamentos pectinados e o espaçamento entre eles, e a coloração marrom clara. (B) Ângulo iridocorneano do olho direito de uma coruja jovem evidenciando espaços menores entre os ligamentos pectinados e coloração mais amarelada. (C, D) Ângulo iridocorneano do olho esquerdo de uma coruja idosa; notar os ligamentos pectinados ainda aparentes, mas curtos e com espaçamento pequeno entre si e ambos apresentam coloração marrom escura..... 107

**Figura 7 (Capítulo 4)** - Face de duas aves em diferentes faixas etárias. (A) Coruja jovem de aproximadamente um mês, é possível notar a opacidade da lente em ambos os olhos. (B) Coruja adulta, apresentando translucidez da lente bilateralmente..... 108

**Figura 8 (Capítulo 4)** - Fundo de olho de uma coruja-orelhuda adulta capturada por oftalmoscopia indireta. Observar a intensa vascularização coroidal, com vasos em disposição radial a partir de uma faixa central imaginária na qual tais vasos, por vezes, se entrelaçam, e a presença do pécten ocular (seta)..... 111

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 (Capítulo 2)**- Sexo, idade em que foi realizado o diagnóstico, formas da displasia de retina, anormalidades morfológicas do disco óptico (DO) e outras alterações oftálmicas observadas em cães da raça Pit Bull Terriers, que foram submetidos ao exame oftálmico e diagnosticados portadores da displasia de retina (DR)..... 41
- Tabela 2 (Capítulo 2)** – Achados histológicos oculares dos olhos de Pit Bulls Terriers decorrentes de uma mesma colônia de cães, afetados e não afetados pela DR, que foram diagnosticados pelo exame histopatológico após seu óbito e da enucleação de seus olhos..... 49
- Tabela 1 (Capítulo 3)**– Tabela correlacionando a geração de cada animal demonstrando o grau de parentesco entre eles, o sexo, a idade no momento da morte, a causa da morte e grau de gravidade das lesões retinianas em cães da raça Pit Bull Terrier com Displasia de Retina..... 72
- Tabela 1 (Capítulo 4)**- Quantidade de animais e olhos avaliados com os respectivos resultados estatísticos, obtidos para os diferentes testes de diagnóstico oftalmológicos em olho de corujas (*Asio clamator*)..... 100
- Tabela 2 (Capítulo 4)** - Gêneros bacterianos e frequência de bactérias encontradas em olhos de corujas-orelhudas (*Asio clamator*) saudáveis..... 109

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARVO- *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

CBRO - Comitê Brasileiro de registros ornitológicos

CETAS, PUCPR/IBAMA - Centro de Triagem de Animais Silvestres

CEUA-SCA - Comissão de Ética referente ao Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias

CNE - camada nuclear externa

CNI - camada nuclear interna

CO – Coroide

COL9A2- gene do colágeno 9A2

COL9A3- gene do colágeno 9A3

CPE - camada plexiforme externa

CPI - camada plexiforme interna

CV - Coeficiente de variação

DesvPad - Desvio padrão

DP- Desvio Padrão

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DO- disco óptico

DOE – Displasia Oculo-esquelética

DR – Displasia de Retina

*drd- Dwarfism with retinal dysplasia*

*drd1- nanismo com displasia de retina tipo 1*

*drd2- nanismo com displasia de retina tipo 2*

ECC – espessura central da córnea

EPR - epitélio pigmentar da retina

F- Fêmea

GAPs- espaços, quebras

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial

H.E - Hematoxilina e Eosina –

HV-UFPR – Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná

ID- identidade

LABOC/UFPR - Laboratório de Oftalmologia Comparada da Universidade Federal do Paraná

LCD - *liquid crystal display*

M-Macho

MHZ-megahertz

MLE - membrana limitante externa

MLI - membrana limitante interna

NO- Nervo óptico

OCD- osteocondrite discecante

OD- olho direito

OE- olho esquerdo

PAS - Ácido Periódico-Schiff

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PDSE/CAPES - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

PÍO – pressão intra-ocular

RD/OSD – gene da displasia de retina associada a displasia oculoesquelética

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo

SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo

SE – segmentos externos

SI – segmentos internos

SRD- Sem Raça Definida

TCO-DE - tomografia de coerência óptica de domínio espectral

TETCIR- Técnica de endoscopia tópica para captação de imagens de retina

TLS – Teste Lacrimal de *Schirmer*

US – Ultrassonografia ocular

## LISTA DE SIGLAS

cm – centímetros

g – grama

IV- intravenoso

IM- intramuscular

Kg – quilograma

mg – miligramas

Mg/Kg- miligrama por kilo

min – minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm/min – milímetro/ minuto

mmHg – milímetros de mercúrio

m/s – metros por segundo

Nº - número

P – Valor de P

P.O.- *Per os*, via oral

SC- Subcutâneo

x-vezes

°C – Celsius

µm - micrometro

*µg/ML- Micrograma por mililitro*

*µ/L- Micrograma por litro*

® - Marca registrada

< - menor

> - maior

% percentagem

## SUMÁRIO

1	OBJETIVOS.....	21
2	CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	22
2.1	Referências.....	26
3	CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA DISPLASIA DE RETINA EM PIT BULLS TERRIERS.....	30
3.1	Resumo.....	30
3.1	Abstract.....	31
3.2	Introdução.....	32
3.3	Material e Métodos.....	34
3.3.1	Exames oftálmicos.....	34
3.3.2	Histopatologia.....	36
3.3.3	Exames não oculares.....	37
3.3.4	Testes laboratoriais.....	37
3.3.5	Análise estatística.....	37
3.4	Resultados.....	38
3.4.1	Análise do pedigree e achados oftálmicos clínicos.....	38
3.4.2	Exames não oculares.....	52
3.4.3	Testes laboratoriais.....	53
3.5	Discussão.....	53
3.6	Referências.....	61
4	CAPÍTULO 3 - ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA DISPLASIA DE RETINA HEREDITÁRIA EM CÃES DA RAÇA PIT BULL TERRIER.....	68
4.1	Resumo.....	68

4.1 Abstract.....	68
4.2 Introdução .....	69
4.3 Material e Métodos .....	70
4.4 Resultados .....	71
4.5 Discussão e Conclusão .....	79
4.6 Referências Bibliográficas .....	85
5 CAPÍTULO 4 - O OLHO DA CORUJA-ORELHUDA: OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS, BIOMÉTRICAS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTES DE DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO. ....	89
5.1 Resumo.....	89
5.2 Abstract.....	90
5.3 Introdução .....	90
5.4 Material e Métodos .....	93
5.4.1 Preparo das peças anatômicas .....	93
5.4.2 Procedimentos oftálmicos e animais vivos .....	94
5.4.3 Exames oftálmicos.....	94
5.5 Resultados .....	100
5.5.1 Aspectos morfológicos da órbita óssea e da túnica fibrosa do bulbo ocular .....	100
5.5.2 Observações gerais nos animais vivos.....	102
5.5.3 Observações da morfologia ocular externa em animais vivos.....	103
5.5.4 Exames oftálmicos.....	108
5.6 Discussão .....	111
5.7 Referências .....	121
6 ANEXOS .....	128

## 1 OBJETIVOS

Os objetivos da presente tese foram subdivididos em três partes distintas, ambas de natureza descritiva na área de oftalmologia comparada. A parte inicial (Capítulo 1) é uma breve introdução, a segunda parte (Capítulo 2 e 3) trata da caracterização de uma forma de displasia de retina (DR) diagnosticada em uma raça de cães na qual não havia relatos prévios na literatura científica. A terceira parte (Capítulo 4) caracterizou os parâmetros oculares normais em uma espécie de animal selvagem.

O Capítulo 1 objetiva esclarecer a importância das pesquisas científicas das doenças hereditárias para a oftalmologia comparada. Enfatiza o impacto gerado pelas pesquisas genéticas de doenças oculares em cães, nas doenças de retina de caráter hereditário, que repercurtem no tratamento das mesmas doenças oculares em seres humanos, buscando assim a cura para algumas causas cegueira.

O objetivo da segunda parte da tese, mais especificamente o Capítulo 2 foi, inicialmente, determinar se a displasia de retina diagnosticada no Hospital Veterinário da UFPR (HV-UFPR) em uma cadela Pit Bull Terrier seria ou não de caráter hereditário. Em seguida, estabelecer a condição de herdabilidade da doença nesta raça. Além disso, descrever os achados clínicos e principais achados histopatológicos correlacionando-os com o heredograma da família estudada, caracterizando o fenótipo da DR. Já o objetivo do Capítulo 3 foi descrever minuciosamente todos os achados histopatológico da DR hereditária em cães da raça Pit Bull Terrier, caracterizando histopatologicamente as lesões em seu estágio inicial até crônico.

A terceira parte e último capítulo da tese (Capítulo 4) objetivou estabelecer os parâmetros biométricos e morfológicos oculares da coruja *Asio clamator*, determinando ainda valores de referência para testes de diagnóstico selecionados comumente empregados na oftalmologia veterinária.

## 2 CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

A retina é o tecido nervoso do bulbo ocular, fotossensível, que reveste todo o segmento posterior do olho e é primariamente responsável pela visão (MAGGS et al., 2008; BEDFORD, 2008) A retina e o nervo óptico (NO) são derivados do prosencéfalo que se desenvolvem de duas camadas da neuroectoderma que constituem a cúpula óptica (MILLICHAMP, 1990; BEDFORD, 2008). A camada mais externa da cúpula óptica se torna o epitélio pigmentar retiniano (EPR) que limitasse com a coróide e a camada interna invaginada, gera a camada neuroblástica, que apresenta íntimo contato com o corpo vítreo. A retina continua a se desenvolver no período pós-natal, atingindo sua maturidade após 6-7 semanas pós nascimento dos cães (MILLICHAMP, 1990).

A retina pode ser dividida em apenas duas camadas, o EPR e a retina neurosensorial. O EPR é uma única camada de células cuboides (MILLICHAMP, 1990), responsáveis pela atividade normal da neuroretina, e dentre suas principais funções é fornecer metabólitos essenciais para as camadas mais externas da neuroretina e reciclar os fotorreceptores (MAGGS et al., 2008; BEDFORD, 2008). A retina é composta por 10 camadas distintas, sendo nove delas componentes da retina neurosensorial composta pelas camadas nucleares e as sinapses das células nervosas o EPR (figura 1) e ainda em algumas espécies é encontrado o *tapetum lucidum*, atuando como amplificador da luminosidade na câmara vítreo (figura 2). A neuroretina é composta pelos fotorreceptores (os cones e os bastonetes) que contem fotorreceptores responsáveis, tanto pela conversão da luz em impulso nervoso, ou seja, fototransdução, quanto pela subsequente modificação do impulso nervoso conforme seu deslocamento em direção ao NO (MAGGS et al., 2008). O NO é a única estrutura do sistema nervoso central que pode ser visualizada diretamente. Esta estrutura é formada pela convergência dos axônios das células ganglionares da retina que irão de mielinizar para formar as fibras do disco óptico (DO), que possui um tamanho e formato variáveis (figura 2) (CRISPIN, 2005, MAGGS et al., 2008).

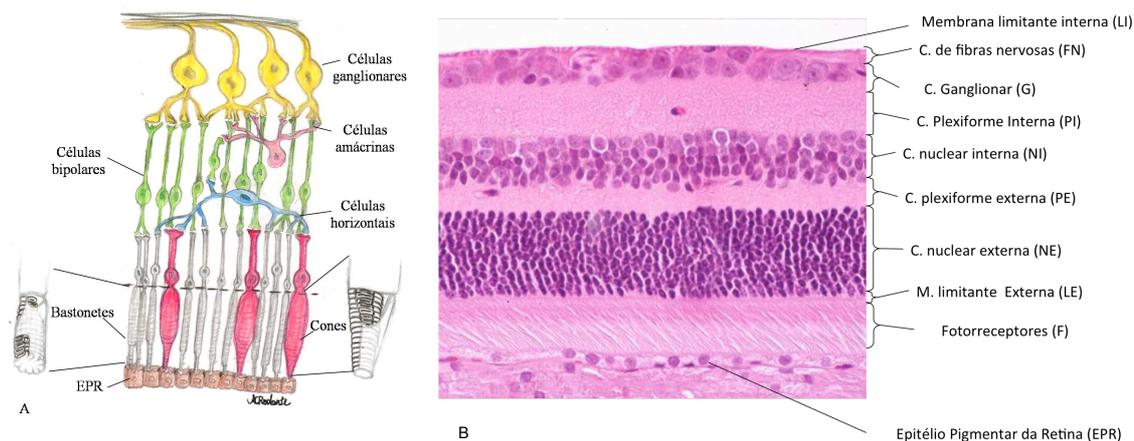


Figure 1- (A) Desenho esquemático da retina, representando as principais células da retina componentes da retina sensorial e da EPR, e os discos membranosos empilhados tanto nos cones quanto nos bastonetes. Fonte: Rodarte-Almeida, ACV. (B) Imagem histológica da retina, evidencia-se as camadas da retina sensorial e epitélio pigmentar da retina. Fonte: Dr Dubielzig, R., COPLOW



Figura 2 – Imagem fotográfica da retina normal de um cão, Pit Bull Terrier de 1 ano de idade. Observa-se o fundo não tapetal (marrom-avermelhado), o fundo tapetal (amarelado), o sistema vascular composto por veias e arteríolas e o nervo óptico (NO).

As doenças de retina estão entre as principais causas de cegueira em seres humanos e animais, particularmente as atrofia (APR), as distrofias retinianas e as displasias de retina (DR) (DIETZ, 1985; PETERSEN-JONES, 1998; GRAHN et al., 2004). As mutações genéticas são responsáveis por diversas doenças de cunho hereditário, sendo estas exaustivamente pesquisadas pela comunidade científica. Tais doenças hereditárias tanto em animais como nos seres humanos podem ser doenças específicas (acometendo apenas um tecido ou órgão) ou ainda se expressarem como síndromes, ou seja, apresentando alterações patológicas em

diferentes tecidos de um organismo. Algumas dessas doenças podem acometer, até onde se sabe, apenas algumas espécies animais. Entretanto, muitas delas são do ponto de vista genético exatamente as mesmas afecções que ocorrem nos seres humanos. Portanto, na oftalmologia comparada, as doenças hereditárias de retina que acometem os animais são modelos imponderáveis para estudo das doenças que acometem os seres humanos. Os cães ao longo dos anos se tornaram modelos biológicos de valor inestimável para o estudo de retinopatias hereditárias principalmente em virtude do fato de que neles várias destas ocorrem espontaneamente nas raças puras (PETERSEN-JONES et al., 2009). Outro fator que tornou os cães popularmente empregados para o estudo comparativo de retinopatias hereditárias foi o fácil manejo da espécie e o tamanho do bulbo ocular que nesta espécie é similar ao dos seres humanos. Seguindo este ponto de vista, a literatura chega até a se referir ao cão como espécie modelo biológico de grande porte (PETERSEN-JONES et al., 2009). Portanto, pesquisas direcionadas ao estudo fenotípico, genotípico e a terapias gênicas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos, visando encontrar os genes mutantes responsáveis por cada retinopatia canina (BAINBRIDGE et al., 2008; PETERSEN-JONES et al., 2009; BIBLIOWICZ; GROSS, 2011; PETERSEN-JONES 2012). A finalidade de todas estas pesquisas é de que no futuro seja encontrada nos cães a cura para as doenças oftálmicas equivalentes nos seres humanos. Portanto os cães têm desempenhado e continuam a desempenhar um papel importante como modelos animais para ensaios clínicos voltados a terapia gênica. Dentre as doenças retinianas pesquisadas encontram-se as distrofias de retinas, dentre elas as atrofia progressivas de retina nas várias raças de cães, que equivalem à retinose pigmentar nos seres humanos (PETERSEN-JONES 2012; WINKLER et al., 2013); a retinopatia multifocal canina como a distrofia macular de BEST em seres humanos (GUZIEWICZ et al., 2007, MIYADERA, 2012), a cegueira noturna estacionária congênita nos cães da raça Briard, equivale à amaurose congênita de Leber que é uma doença oftálmica que acomete crianças (BAINBRIDGE et al., 2008, MIYADERA, 2012) e a degeneração de cones em cães da raça Malamute do Alaska equivale à acromatopsia ou hemeropia (cegueira diurna) dos seres humanos (SIDJANIN, et al., 2002, MIYADERA, 2012).

A displasia de retina (DR) é uma alteração ocular decorrente de uma diferenciação anormal da retina em sua embriogênese (GODEL et al., 1981). Trata-se da proliferação desordenada da retina neurosensorial levando à formação de dobras, descolamento parcial ou total deste tecido (WHITELEY, 1991). A DR é na maioria das vezes uma condição hereditária e congênita (BERGSJØ et al., 1984; HOLLE et al., 1999), porém, a DR também pode ser ocasionalmente adquirida (ALBERT et al., 1976; SCHWEITZER et al., 1987). A DR vem sendo descrita em diversas raças de cães, contudo, já foi relatada em outras espécies animais também, tais como, seres humanos (KÖRKKÖ et al., 1993; RAVIA et al., 1993), peixes (BIBLIOWICZ; GROSS 2011), galinhas (MCKIBBIN et al., 2013), lontra (WILLIAMS et al., 2004) apresentando o fenótipo semelhante ao observado em cães. Nos seres humanos, a DR foi descrita nas síndromes de Norrie e de Stickler (RAVIA et al., 1993; KÖRKKÖ et al., 1993), sendo que as mesmas síndromes apresentam herdabilidades diferentes das observadas em cães. A principal forma na qual a DR é herdada em cães é autossômica recessiva (BERGSJØ et al., 1984; GRAHN et al., 2004; GELATT, 2007). Baseada nas aparências clínicas das lesões de retina, a DR é classificada em focal, multifocal, geográfica e descolamento total de retina sendo acompanhada de cegueira total (CRISPIN et al., 1999; HOLLE et al., 1999; GRAHN et al., 2004). Histologicamente, a DR é caracterizada pela presença de dobras, desorganização da arquitetura da retina, rosetas, gliose e descolamento acompanhado de hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR) (LAHAV et al., 1973; WHITELEY, 1991;). A forma sindrômica da doença também tem sido relatada em cães da raça Labrador Retriever e Samoiedas, sendo esta condição denominada displasia oculoesquelética (DOE) (MEYERS et al., 1983; CARRIG et al., 1988;). Os cães afetados pela DOE podem ou não apresentar displasia esquelética associada ao nanismo, porém sempre irão apresentar lesões oculares, podendo estas ser leves ou graves (CARRIG et al., 1977; MEYERS et al., 1983).

Para diagnosticar as doenças oftálmicas é necessário conhecer a anatomia ocular de cada espécie animal. Por isso, a oftalmologia veterinária vem se tornando uma importante especialidade médica e de pesquisa nos últimos anos, avançando tecnologicamente. Tornou-se de extrema importância no manejo dos animais domésticos e selvagens. De modo geral a literatura é escassa no que tange os

parâmetros anatômicos, fisiológicos e valores de referência para testes oftálmicos nas espécies selvagens, o que dificulta os avanços clínicos e cirúrgicos.

A coruja (*Asio clamator*), também conhecida como coruja-orelhuda (SICK, 1993), é uma ave de rapina noturna pertencente à ordem dos Strigiformes. Nas corujas em geral, os olhos são grandes localizados rostralmente, com campo visual limitado pela pouca mobilidade do bulbo ocular devido ao formato semitubular composto pelos ossículos esclerais (SICK, 1993; AGILLAR, 2003). Sabe-se que as córneas das corujas apresentam a lamina limitante anterior (lâmina de Bowman) visível à microscopia e as retinas das corujas de modo geral são anangióticas, possuindo apenas uma fóvea e o pecten ocular (MURPHY, 1993; MONTIANI-FERREIRA, 2001). Algumas investigações oftálmicas já foram realizadas em outras espécies de corujas (BAYÓN et al., 2006; JEONG et al., 2007; HARRIS et al., 2008). Contudo, na espécie *Asio clamator*, apenas avaliações dos aspectos ultrassonográficos dos olhos destes animais foram investigadas (SQUARZONI et al., 2010), sendo portanto, necessários ainda mais estudos, principalmente de outros parâmetros biométricos e morfológicos dos seus olhos e valores de referência para testes de diagnóstico oftálmico desta espécie.

## 2.1 REFERÊNCIAS

AGILLAR, R.F. 2003. Strigiformes (Owls), p.491–501. In: Fowler M.E. & Miller R.E. (Eds), **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5th ed. W.B. Saunders, St Louis, Missouri.

ALBERT, D.M.; LAHAV, M.; CARMICHAEL, L.E. et al. Canine herpes-induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. **Invest Ophthalmol**. 15(4):267–78, 1976.

BAINBRIDGE, J.W.; SMITH, A.J.; BARKER, S.S. et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. **N Engl J Med**. 358(21):2231-9, 2008.

BAYÓN, A.; VECINO, E.; ALBERT, A. et al. Evaluation of intraocular pressure obtained by two tonometers and their correlations with corneal thickness obtained by pachymetry in raptors [abstract]. **Vet. Ophthalmol**. 9(6):426-434, 2006.

BEDFORD, P.G.C. **Afeccões da retina**. In: HERRERA, D. Oftalmologia clínica em animais de companhia. 1ª. Ed. São Paulo: MetVet, 2008. Cap.12, p.205-234.

BERGSJØ, T.; ARNESEN, K.; HEIM, P. et al. Congenital blindness with ocular developmental anomalies, including retinal dysplasia, in Doberman Pinscher dogs. **J Am Vet Med Assoc**. 184(11):1383–6, 1984.

BIBLIOWICZ, J.; GROSS, J.M. Ectopic proliferation contributes to retinal dysplasia in the juvenile zebrafish patched2 mutant eye. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 17;52(12):8868-77, 2011.

CARRIG, C.B.; MACMILLAN, A.; BRUNDAGE, S. et al. Retinal dysplasia associated with skeletal abnormalities in Labrador Retrievers. **J Am Vet Med Assoc**. 170(1):49–57, 1977.

CARRIG, C.B.; SPONENBERG, D.P.; SCHMIDT, G.M. et al. Inheritance of associated ocular and skeletal dysplasia in Labrador retrievers. **J Am Vet Med Assoc**. 193(10):1269–72, 1988.

CRISPIN, S.M.; LONG, S.E.; WHEELER, C.A. Incidence and ocular manifestations of multifocal retinal dysplasia in the golden retriever in the UK. **Vet Rec**. 145(23):669–672, 1999.

CRISPIN, S.M. In:\_\_\_Notes on Veterinary Ophthalmology. Philadelphia: Blackwell Publishers; 2005, 371p.

DIETZ, H.H. Retinal dysplasia in dogs--a review. **Nord Vet Med**. 37(1):1-9, 1985.

GRAHN, B.H.; STOREY, E.S.; MCMILLAN, C. Inherited retinal dysplasia and persistent hyperplastic primary vitreous in Miniature Schnauzer dogs. **Vet Ophthalmol**. 7(3):151–8, 2004.

GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 4th ed. Philadelphia: Blackwell Publishers; 2007:1696

GODEL, V.; NEMET, P.; LAZAR, M. Retinal dysplasia. **Ophthalmol Doc**. 51(3):277–288, 1981.

GUZIEWICZ, K.E.; ZANGERL, B.; LINDAUER, S.J.; et al. Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2007;48:1959–1967.

HARRIS, M.C.; SCHORLING, J.J.; HERRING, I.P. et al. Ophthalmic examination findings in a colony of Screech owls (*Megascops asio*). **Vet. Ophthalmol.** 11(3):186-192, 2008.

HOLLE, D.M.; STANKOVICS, M.E.; SARNA, C.S. et al. The geographic form of retinal dysplasia in dogs is not always a congenital abnormality. **Vet Ophthalmol.** 2(1):61–66, 1999.

JEONG M.B.; KIM Y.J.; YI N.Y. et al. Comparison of the rebound tonometer (TonoVet) with the applanation tonometer (TonoPen XL) in normal Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*). **Vet. Ophthalmol.** 10(6):376-379, 2007.

KÖRKKÖ, J.; RITVANIEMI, P.; HAATAJA, L. et al. Mutation in type II procollagen (COL2A1) that substitutes aspartate for glycine alpha 1-67 and that causes cataracts and retinal detachment: evidence for molecular heterogeneity in the Wagner syndrome and the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy) **Am J Hum Genet.** Jul;53(1):55-61, 1993.

LAHAV, M.; ALBERT, D.M.; WYAND, S. Clinical and histopathologic classification of retinal dysplasia. **Am J Ophthalmol.** 75(4):648–67, 1973.

MAGGS, D.; MILLER, P.; OFRI, R. Slatter's Fundamentals Of Veterinary Ophthalmology, 4<sup>th</sup> ed. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2008. 496p.

MIYADERA, K.; ACLAND, G.M.; AGUIRRE, G.D. Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies. **Mamm Genome.** 2012 Feb;23(1-2):40-61. doi: 10.1007/s00335-011-9361-3. Epub 2011 Nov 8.

MCKIBBIN, M.; ALI, M.; INGLEHEARN, C. et al. Spectral domain optical coherence tomography imaging of the posterior segment of the eye in the retinal dysplasia and degeneration chicken, an animal model of inherited retinal degeneration. **Vet Ophthalmol.** 1–7, 2013.

MEYERS, V.N.; JEZYK, P.F.; AGUIRRE, G.D. et al. Short-limbed dwarfism and ocular defects in the Samoyed dog. **J Am Vet Med Assoc.** 183(9):975–9, 1983.

MILLICHAMP, N.J. Retinal degeneration in the dog and cat. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.** 20(3):799-835, 1990.

MONTIANI-FERREIRA, F. 2001. Ophthalmology, p.437-456. In: Fowler, M.E.; Cubas Z.S. (Eds), *Biology Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press, Ames.

MURPHY, C.J. 1993. Ocular lesions in birds of prey, p.211-221. In: Fowler, M.E. (Ed.), **Zoo and Wildlife Medicine**. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

PETERSEN-JONES, S.M.; BARTOE, J.T.; FISCHER, A.J. et al. AAV retinal transduction in a large animal model species: comparison of a self-complementary AAV2/5 with a single-stranded AAV2/5 vector. **Mol Vis**. Sep 11;15:1835-42, 2009.

PETERSEN-JONES, S.M. Viral vectors for targeting the canine retina: a review. **Vet Ophthalmol**. 2: 29-34, 2012.

PETERSEN-JONES, S.M. A review of research to elucidate the causes of the generalized progressive retinal atrophies. **Veterinary Journal** 155(1):5-18, 1998.

RAVIA, Y.; BRAIER-GOLDSTEIN, O.; BAT-MIRIAM, K.M. et al. X-linked recessive primary retinal dysplasia is linked to the Norrie disease locus. **Hum Mol Genet**. Aug;2(8):1295-7, 1993.

SCHWEITZER, D.J.; BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C. Retinal dysplasia and progressive atrophy in dogs irradiated during ocular development. **Radiat Res**. 111(2):340-53, 1987.

SICK, H. 1993. Order Strigiformes, p.286-298. In: *ibid.* (Ed.), **Birds in Brazil: A natural history**. Princeton University Press, Princeton, USA.

SIDJANIN, D.J.; LOWE, J.K.; MCELWEE, J.L. et al. Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. **Hum Mol Genet**. Aug 1;11(16):1823-33, 2002.

SQUARZONI, R.; PERLMANN, E.; ANTUNES, A. et al. Ultrasonographic aspects and biometry of Striped owl's eyes (*Rhinoptynx clamator*). **Vet. Ophthalmol**. 13(Suppl.):86-90, 2010.

WHITELEY, H.E. Dysplastic canine retinal morphogenesis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 32(5):1492-8, 1991.

WHITELEY, H.E.; YOUNG, S. The external limiting membrane in developing normal and dysplastic canine retina. **Tissue Cell**. 18(2):231-9, 1986.

WILLIAMS, D.L.; SIMPSON, V.R.; FLINDALL, A. Retinal dysplasia in wild otters (*Lutra lutra*). **Vet Rec**. Jul 10;155 (2):52-6, 2004.

WINKLER, P.A.; EKENSTEDT, K.J.; OCCELLI, L.M. et al. A large animal model for CNGB1 autosomal recessive retinitis pigmentosa. **PLoS One**. 8(8): 722-29, 2013;

### 3 CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA DISPLASIA DE RETINA EM PIT BULLS TERRIERS

#### *Phenotypic Characterization of Retinal Dysplasia in Pit Bull Terriers*

##### 3.1 RESUMO

A displasia de retina (DR) é uma alteração na diferenciação fisiológica da retina, podendo ser de caráter hereditário ou adquirido. O objetivo deste estudo foi investigar a herdabilidade e o fenótipo da DR detectada em Pit Bull Terriers. A partir do diagnóstico de DR em uma fêmea de Pit Bull Terrier, atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR), foi estabelecida uma colônia investigativa. Através desta colônia de cães foi possível investigar o tipo de herança genética e o fenótipo da doença nesta raça. O diagnóstico foi realizado através dos exames oftálmicos de rotina e captação de imagens de retina pela técnica de fundoscopia por endoscopia tópica para captação de imagens da retina (TETCIR), que foram obtidas durante três gerações. Adicionalmente alguns animais foram submetidos a exames ultrassonográficos periódicos e tomografia de coerência óptica (TCO) dos bulbos oculares. A medição das alturas dos animais adultos foram mensuradas e avaliados pelo teste *T*. Adicionalmente, exames radiográficos da pelve, ombros e cotovelos foram realizadas. Amostras de DNA foram submetidas a testes genéticos para mutação dos genes do colágeno canino COL9A3 e COL9A2, responsável pela displasia óculo esquelética (DOE) e para o Herpesvírus Canino Tipo 1 (CHV-1). A histopatologia ocular foi realizada em alguns animais da colônia que vieram acidentalmente a óbito. Cinquenta e sete animais foram criados por três gerações, advindos de uma cadela afetada pela DR. Vinte e cinco animais eram Pit Bulls Terriers puros e 32 eram cruzas entre Pit Bull Terriers com cães sem raça definida (SRD), dentre estes 26 eram fêmeas e 31 eram machos. A análise do heredograma sugeriu herança autossômica dominante como tipo de herdabilidade. Trinta e dois cães foram diagnosticados portadores da DR, apresentando lesões clinicamente de gravidades diferentes, sendo elas, multifocais, geográficas, multifocais associadas a geográficas e em alguns casos apresentaram descolamento de retina total. Na maioria dos animais afetados, foi observado uma alteração da morfologia do disco óptico (DO). O exame histológico revelou presença de dobras, rosetas, desorganização das camadas da retina e áreas de descolamento de retina, sendo estas alterações observadas na TCO, que também revelou alteração na mielinização do DO. Os animais afetados apresentaram estatura significativamente mais baixa que os animais não afetados, e alguns deles, apresentaram displasia coxofemoral e um animal osteocondrite dissecante do ombro. O teste de DNA dos animais afetados com RD, para o gene mutante da displasia óculo esquelética, bem como, para o CHV-1, foram negativos. O presente estudo permitiu a descrição de uma nova forma de herdabilidade da DR em cães Pit Bull Terriers com sua respectiva caracterização, sendo este o primeiro relato desta doença nesta raça.

Palavras-chave: Cães, Doença hereditária, herdabilidade, Displasia Oculo-Esquelética, histopatologia ocular, Tomografia de Coerência Ótica, retina

### 3.1 ABSTRACT

Retinal Dysplasia (RD) is an abnormality of the normal differentiation of the retina, which may be inherited or acquired. The purpose of this study was to investigate the inheritance and phenotype of retinal dysplasia (RD) in the Pit Bull Terrier. From diagnosis of RD in a single female Pit Bull Terrier dog in the Veterinary Hospital of Federal University of Paraná (HV-UFPR), Curitiba, Brazil, a breeding colony were established, through this breeding colony was possible to investigate the phenotype and established inheritance of the condition. The diagnoses were performed through the regular ophthalmic examinations and fundus photography by the topical endoscopy fundus imaging technique (TEFIT), which were obtained on three generations of offspring from the founder animal. Some animals were additionally studied by ocular ultrasound and optical coherence tomography (OCT). The height of the adult dogs was measured, and analyzed by student's *T*-test. Additionally, radiographs were taken of the hips, pelvic and thoracic limbs. DNA samples were submitted for genetic testing for the known canine colagene gene mutations COL9A3 e COL9A2, responsible for the dwarfism with retinal dysplasia (DRD) and to test for canine herpesvirus infection, by the real-time PCR-based assay for Canine Herpesvirus Type 1 (CHV-1). Ocular histopathology was performed on some animals from the colony that had a natural death. Fifty-seven offspring were produced in two generations from the affected founder female. Twenty-five were purebred Pit Bulls and 32 were Pit Bull crosses, of these Twenty-six were female and 31 male. Analysis of the pedigree suggests an autosomal dominant mode of inheritance. Thirty-two were diagnosed with RD and showed a spectrum of severity of lesions including multifocal, geographic, or multifocal combined with geographic lesions and some also developed retinal detachment. In many of the affected animals the morphology of the optic disc (OD) was also abnormal. Histologic examination demonstrated retinal folds, rosettes, completely disorganization of the retinal layers and areas of retinal detachment, these findings were observed in the OCT as well, which also showed alteration in myelination of the OD. The affected dogs was significantly lower in stature than the unaffected littermates, also some dogs which underwent radiographic examinations were diagnosed with hip dysplasia and one dog had osteochondritis dissecans of the shoulders. DNA testing showed that the affected dogs were negative for the known gene mutation for canine dwarfism with retinal dysplasia, and for CHV-1. This is a report of a new inherited form of RD in Pit Bull Terriers, been this the first report of this disease in the breed.

Key words: dogs, hereditary disease, herdability, ocular skeletal dysplasia, ocular histopathology, optical coherence tomography, retina disease.

### 3.2 INTRODUÇÃO

A displasia de retina (DR) é uma alteração na diferenciação normal da retina (AGUIRRE et al., 1972; GODEL et al., 1981; WHITELEY, 1991), resultando em lesões de gravidades diferentes. Variam desde uma dobra simples das camadas da retina, rosetas até o descolamento de retina (MACMILLAN, 1980; MILLICHAMP, 1985; WHITELEY, 1991; GELATT, 2007). A DR vem sendo relatada como alteração hereditária em muitas raças de cães como Bedlington Terriers, Sealyham Terrier, Retriever do Labrador, Pastor Australiano, Beagle, Springer Spaniel Inglês, Cocker Spaniel Americano, Yorkshire Terrier, Sheepdog Inglês, Rottweiler, Samoieda, Dobermann Pinscher, Akita, Chow Chow, Golden Retriever, Schnauzer miniatura, Pastor Alemão (RUBIN, 1963; ASHTON et al., 1968; RUBIN, 1968; BARNETT et al., 1969; GELATT; VEITH 1970; HEYWOOD; WELLS 1970; SCHIAVO; FIELD 1974; ALBERT et al., 1976; CARRIG et al., 1977; LAVACH et al., 1978; MACMILLAN; LIPTON, 1978; STADES, 1978; BARRIE et al., 1979; SCHMIDT et al., 1979; BEDFORD, 1982; MEYERS et al., 1983; NELSON; MAC MILLAN 1983; PEIFFER; FISCHER 1983; TOOLE et al., 1983; BERGSJØ et al., 1984; LARATTA et al., 1985; LEWIS et al., 1986; CARRIG et al., 1988; COLLINS et al., 1992; GIONFRIDDO; NIYO 1992; CRISPIN et al., 1999; HOLLE et al., 1999; LONG; CRISPIN 1999; GRAHN et al., 2004; BAUER et al., 2011). Todavia a DR pode também resultar de agressões ambientais durante o desenvolvimento da retina, como por exemplo, infecções por herpesvírus canino (ALBERT et al., 1976), toxicidade por ivermectina (Lowe & King 2004), deficiência de vitamina A (GRONDONA et al., 1996; SEE; CLAGETT-DAME 2009) e ainda exposição à radiação na vida intrauterina (SHIVELY et al., 1970; SCHWEITZER et al., 1987). Na maioria dos casos, as lesões presentes são observadas e diagnosticadas durante o exame oftálmico em filhotes com poucas semanas de idade. Entretanto uma pesquisa com cães relatou que as lesões podem desenvolver-se ou ainda tornarem-se evidentes apenas após a idade em que a retina apresenta seu completo desenvolvimento, ou seja, até aproximadamente seis meses de idade (TOOLE et al., 1983; GELATT, 2007), atingindo assim a sua maturidade (TOOLE et al., 1983; WHITELEY, 1991).

O diagnóstico é realizado pelo exame clínico oftálmico, principalmente pela fundoscopia (GELATT, 2007), ultrassonografia ocular pode auxiliar na observação do descolamento de retina (Spaulding 2008) e pela Tomografia de Coerência Óptica de Dominio Espectral (TCO-DE) que permite obter imagens de alta resolução de cortes transversais da retina e da cabeça do nervo óptico *in vivo*, permitindo alterações estruturais da microanatomia destas estruturas (MCLELLAN; RASMUSSEN, 2012; ROSOLEN et al., 2012; MCKIBBIN et al., 2013). Baseada na aparência clínica das lesões retinianas a DR é classificada em: 1) Focal (SCHIAVO; FIELD, 1974), ou Multifocal (MACMILLAN; LIPTON, 1978; PEIFFER; FISCHER, 1983; TOOLE et al., 1983; LARATTA et al., 1985; CRISPIN et al., 1999; GRAHN et al., 2004), podendo apresentar dobras de retina únicas ou múltiplas; 2) Geográfica, que compreende lesões geográficas largas que podem representar ou resultar de regiões com descolamento parcial da retina; 3) Total, que advém do descolamento de retina total ou a não aderência da retina (HOLLE et al., 1999; GRAHN et al., 2002; GRAHN et al., 2004).

Outras anormalidades como hiperplasia primária do vítreo (PEIFFER; FISCHER, 1983; GRAHN et al., 2004), catarata congênita (ASHTON et al., 1968; LARATTA et al., 1985; COLLINS et al., 1992), microftalmia (PEIFFER; FISCHER, 1983; BERGSJØ et al., 1984; LARATTA et al., 1985; LEWIS et al., 1986), ou coloboma (GELATT; VEITH, 1970; GELATT; MCGILL, 1973; SEE; CLAGETT-DAME, 2009) podem estar associados à DR. Formas sindrômicas da doença também tem sido relatadas, como a displasia oculo-esquelética (DOE), conhecida também como *dwarfism with retinal dysplasia* (drd) na qual os cães afetados comumente apresentam lesões oculares com diferentes gravidades e que podem ou não estar acompanhadas de nanismo associado à alterações características de displasia esquelética (CARRIG et al., 1977; MEYERS et al., 1983; BLAIR et al., 1985; CARRIG et al., 1988; GIONFRIDDO; NIYO, 1992). O genótipo da DOE foi pesquisado com detalhes nas raças Retriever do Labrador e Samoiedas e foi demonstrado que nestas raças as mutações responsáveis pela doença estão nos genes do colágeno, COL9A3 e COL9A2, respectivamente (GOLDSTEIN et al., 2010; DU et al., 2000). Os animais que são heterozigotos para o gene mutante apresentam a forma leve do fenótipo ocular e alguns casos nem apresentam lesões esqueléticas. Em contrapartida, os animais homozigotos apresentam a forma grave da doença ocular, caracterizada pela displasia de vítreo, descolamento de retina e catarata,

sendo que apresentam também a forma esquelética grave composta pelo nanismo associado à displasia esquelética (CARRIG et al., 1977; MEYERS et al., 1983; BLAIR et al., 1985; CARRIG et al., 1988; GIONFRIDDO; NIYO, 1992; GOLDSTEIN et al., 2010). A mutação do gene da DR hereditária não foi relatada em outras raças de cães. O objetivo deste estudo foi caracterizar o fenótipo da forma hereditária da displasia de retina em cães da raça Pit Bull Terrier.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Uma cadela Pit Bull Terrier (Figura 1. Animal 1.3), probanda deste estudo e progenitora de uma colônia de cães desta raça, provenientes do mesmo criador, residente na cidade de Curitiba, PR, foi atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR) para exame oftálmico, onde foi diagnosticada a displasia de retina (RD). O fenótipo da doença e o modo da herança genética dos animais desta colônia foram estudados durante o período de sete anos. A colônia foi dividida em um grupo de animais que permanecia com o criador, proprietário da probanda, e em outro, que permanecia no canil das dependências do HV-UFPR. A cadela foi submetida a cruzamentos com quatro machos aleatórios sem parentesco, oftalmoscopicamente normais, estabelecendo uma colônia de cães. Para a confecção do heredograma desta colônia foi utilizado o software de computador Progeny (<http://www.progenygenetics.com/online-pedigree/>). Todos os procedimentos foram conduzidos segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) da UFPR e de acordo às normas para experimentação animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

#### 3.3.1 Exames oftálmicos

Os cães foram examinados mensalmente com auxílio do biomicroscópio de lâmpada de fenda (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, França), tonômetro de rebote (TonoVet, Tiolat, Helsinki, Finlândia), oftalmoscópio indireto (Heine Omega 180

Headworn Binocular Indirect Ophthalmoscope, Dover, NH, Estados Unidos) e em alguns animais foi realizado a captação de imagens do fundo ocular.

#### 3.3.1.1 Pressão intraocular (PIO)

A pressão intraocular foi aferida tanto nos animais afetados pela DR quanto nos animais normais, valendo-se do tonômetro de rebote (TonoVet, Tiolat, Helsinki, Finlândia).

#### 3.3.1.2 Fundoscopia

O estudo de fundoscopia deu-se por meio da captação de imagens da retina, realizado em 29 animais, usando a técnica de fundoscopia por endoscopia tópica para captação de imagens da retina (TETCIR), como previamente descrita (PAQUES et al., 2007; GUYOMARD et al., 2008). As imagens foram obtidas de filhotes de 30 e 45 dias de idade, utilizando uma probe de artroscópio rígido de 4 mm de diâmetro (Karl Storz™, Tuttlingen, Alemanha). Adicionalmente, um laparoscópio rígido de 8 mm de diâmetro com 0 graus de angulação, com uma ponta de iluminação com forma crescente, (Weck™, Canadá) foi utilizada em animais de 3, 5, 7, 12, 24, 48, 72 meses de idade. Tanto a probe do artroscópio rígido quanto o laparoscópio, foram conectadas, através de um adaptador, a uma câmera digital de 7,2 megapixels, com lente Carl Zeiss™ de 12 x de zoom óptico (DSC-H5, Sony™, New Jersey, Estados Unidos). A fonte de luz era composta pela luz de xênon 175 Watts (Karl Storz™, Tuttlingen, Alemanha) acoplada à probe do artroscópio e do laparoscópio rígido por um cabo flexível de fibra óptica. Em alguns animais uma câmera digital para fundoscopia foi utilizada (ClearView™ Optical Imaging System, Optibrand, Ft Collins, Colorado, Estados Unidos). Para a realização da fundoscopia, todas as pupilas de todos os animais examinados foram adequadamente dilatadas, por meio da instilação de colírio de tropicamida a 1% (Midriacil, Alcon™, São Paulo, SP, Brasil), alternado com o colírio de felinefrina 10% (Frumtost, São Paulo, SP, Brasil) a cada 10 minutos. Visando a anestesia tópica do bulbo ocular, foi instilado gotas de anestésico tópico estéril (Tetracaína 1% e Fenilefrina 0,1%, Laboratório Allergan, Guarulhos, São Paulo, SP, Brasil). Todos os animais submetidos à TETCIR foram anestesiados com acepromazina gotas (Acepran gotas®, Vetnil, Louveira, SP,

Brasil) (2 mg/Kg PO) associada à zolazepan e tiletamina (Zoletil®, Virbac, São Paulo, SP, Brasil) (na dose de 5 mg/Kg da combinação IM).

#### 3.3.1.3 Ultrassonografia ocular

A ultrassonografia ocular (US) de modo B foi realizada nos bulbos oculares de 36 animais da colônia de Pit Bull Terriers deste estudo, valendo-se do equipamento Ultrasonix (Sonix OP Smart Ultrasound System, Richmond, Canadá). Um transdutor linear de 14-MHz foi gentilmente acondicionado sobre a superfície corneana, perpendicular ao centro da córnea e como interface foi utilizado gel ultrassônico de transmissão estéril (Aquasonic-100; Parker Laboratories Inc., Fairfield, NJ, Estados Unidos). Anteriormente a este procedimento, uma gota de anestésico tópico foi instilada sobre a superfície corneana dos bulbos oculares de cada animal examinado (tetracaína 1% e fenilefrina 0,1%, Laboratório Allergan, Guarulhos, São Paulo, Brasil).

#### 3.3.1.4 Tomografia de coerência óptica

A tomografia de coerência óptica de domínio espectral (TCO-DE) (SD-OCT, Spectralis® HRA+OCT, Heidelberg Engineering Inc., Heidelberg, Alemanha) foi utilizada para investigação da retina e da microanatomia da cabeça do nervo óptico (NO). Dois animais afetados (animais 3.3 e 3.7) foram avaliados aos seis meses de idade. A TCO-DE foi realizada sob anestesia geral com injeção intravenosa de cetamina (3 mg/Kg), xilazina (0,3 mg/Kg) e midazolam (0,5 mg/Kg).

#### 3.3.2 *Histopatologia*

A histopatologia ocular foi realizada em 27 alhos provenientes de 13 animais. Um animal adicional (1.3) teve seu bulbo ocular esquerdo enucleado após desenvolver glaucoma secundário à uveíte. Neste estudo 14 animais vieram a óbito natural por diversas causas, não tendo sido realizada nenhuma eutanásia (Figura 1). Destes, oito tinham um dia de vida, dois tinham 21 dias de vida, um dos cães apresentava quatro meses de idade e três encontravam-se entre um ano e sete anos de idade. Contudo, apesar do cão 2.07, ter vindo a óbito, seus bulbos oculares não foram submetidos à histopatologia ocular devido ao fato do bulbo ocular ter

sofrido autólise. Após a coleta das amostras, com intervalo de tempo variando entre 2 a 8 horas pós-óbito, foram injetados 0,3 mL da solução de fixação (formol a 10%) na câmara vítrea de 20 bulbos oculares que posteriormente foram imersos em formol a 10%. Por sua vez, nos outros sete bulbos oculares foram injetados com 0,3 mL de solução de formol 10% misturado com glutaraldeído 6%, sendo posteriormente acondicionados nesta mesma solução. As colorações utilizadas na análise destes bulbos oculares foram Hematoxilina e Eosina de Harris e Tricrômico de Gomori.

### 3.3.3 Exames não oculares

A altura de 23 animais (1.3, 2.8, 2.9, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, 2.24-2.28, 3.1-3.11) da colônia estudada foi mensurada através de uma fita métrica estendida do chão ao cume entre os ossos da escápula (cernelha) de cada animal. Complementarmente, exame radiográfico da pelve, quadris e membros torácicos foram realizados em seis dos animais afetados (1.3, 2.13, 2.14, 2.27, 3.2, 3.3).

### 3.3.4 Testes laboratoriais

As amostras de DNA de dois animais afetados que apresentavam sinais de semelhantes a nanismo e alteração articular (3.2 e 3.3, respectivamente), foram submetidas ao teste genético para averiguar possível mutação dos genes responsáveis pela formação de dois tipos de colágeno canino COL9A3 e COL9A2, comercialmente intitulado RD/OSD (OptiGen®, LLC Cornell Business & Technology Park, Nova York, Ithaca, Estados Unidos ([http://www.optigen.com/opt9\\_rdosd.html](http://www.optigen.com/opt9_rdosd.html))). Adicionalmente, amostras conjuntivais e de faringe profunda de três cães afetados (1.3, 2.14, 3.3), foram coletados com auxílio de zaragatoa estéril e foram testadas para Herpesvírus Canino Tipo 1 (CHV-1 RealPCR™ Test code 2520, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, Estados Unidos).

### 3.3.5 Análise estatística

A altura e a pressão intraocular foram analisadas pelo teste de  $T$ , comparando a altura e a idade dos animais afetados com os não afetados. Para realização do teste foi utilizado um software de computador (JMP, versão 5.0.1, SAS Institute Inc.,

Cary, NC, Estados Unidos). Os dados analisados foram expressos pela média  $\pm$  DP sendo considerados estatisticamente significantes quando o  $P < 0,05$ .

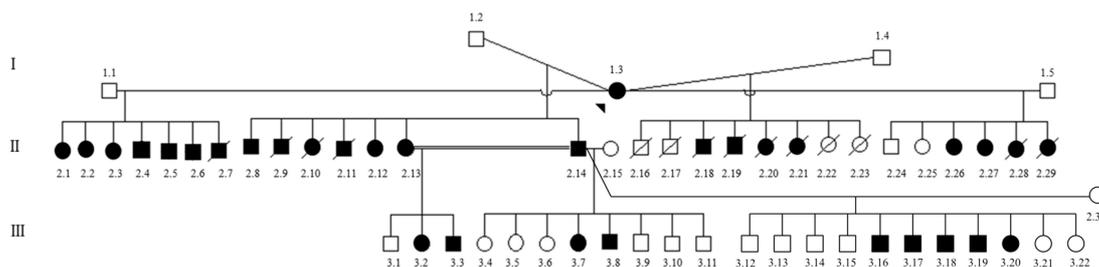
### 3.4 RESULTADOS

Uma colônia de 57 Pit Bull Terriers foi estabelecida. Destes cães, 25 eram de raça pura (Pit Bull Terrier) e 32 eram Sem Raça Definida (SRD) advindos do cruzamento de animais SRD com Pit Bull Terriers. Vinte e seis cães eram fêmeas e 31 eram machos.

#### 3.4.1 *Análise do pedigree e achados oftálmicos clínicos*

A análise observacional do heredograma da colônia de Pit Bull Terrier afetada com displasia de retina (DR), durante três gerações, sugere herança autossômica dominante (Figura 1).

Baseado nos achados do exame de fundoscopia de 26 animais (sendo estes 13 cadelas e 13 cães) e nas análises histopatológicas dos olhos de seis Pit Bulls Terriers fêmeas e quatro machos, averiguou-se que estes animais eram afetados pela DR bilateral (Figura 1). Vale ressaltar, que os cães 1.3, 2.9, 2.10, 2.28 tiveram seus bulbos oculares submetidos tanto ao exame clínico oftálmico quanto ao histopatológico. As lesões retinianas apresentaram aparências variadas nos diferentes cães afetados (2.13, 2.14, 2.26, 3.2, 3.16, 3.19, 3.20). Dos cães afetados, seis deles apresentavam a forma multifocal da DR (animais 2.8, 2.9, 2.12, 3.7, 3.16, 3.19), nove animais tinham lesões com a forma multifocal/geográfica (2.2, 2.5, 2.6, 3.3, 3.8, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20) e dez cães apresentavam DR geográfica (cães 2.1, 2.3, 2.4, 2.13, 2.14, 2.26, 2.27, 3.16), quatro animais apresentaram lesões geográficas com presença de descolamento parcial da retina (2.7, 2.10, 2.26, 3.2) sendo que em quatro destes animais, as lesões progrediram para o descolamento total da retina no olho esquerdo (cães 2.13, 3.2, 2.14, 3.20). Adicionalmente um cão (1.3) que apresentava displasia de retina na forma geográfica grave desenvolveu descolamento de retina total em ambos os bulbos oculares após cinco anos de idade (Tabela 1).



**Figura 1** – Heredrograma da colônia de cães, estabelecida por meio de uma cadela probanda (1.03) (cabeça de flecha). Note que a ninhada (cães 3.1 e 3.3) produzida pelo cruzamento entre dois membros da mesma ninhada F1 (2.13 e 2.14) produziram tanto cães afetados como não afetados. Os cruzamentos entre cães da raça Pit Bull Terrier com cães SRD (macho 1.2 e fêmeas 2.15 e 2.30) resultaram em animais portadores da DR. Avaliando estes resultados, nos sugere herança autossômica dominante. Os quadrados representam os cães machos, os círculos as cadelas; os símbolos pretos identificam os cães afetados pela displasia de retina; os símbolos brancos representam cães não afetados; a cabeça de flecha aponta a probanda deste estudo; e os círculos e quadrados com traços representam animais que vieram a óbito.

#### 3.4.1.1 Pressão intraocular (PIO)

A media da pressão intraocular (PIO) mensurada nos animais normais foi de  $18,31 \pm 2,62$  mmHg e nos cães afetados  $16,83 \pm 3,86$  mmHg . Não houve diferença significativa entre as PIOs comparando os animais afetados com os não afetados ( $P= 0,09$ ).

#### 3.4.1.2 Fundoscopia

A fundoscopia foi realizada em 46 cães, pois os outros animais (11 cães) vieram a óbito nos primeiros dias de vida, não sendo possível realizar o exame clínico oftálmico destes animais. A melhor opção de captação de imagens do fundo ocular foi a técnica de TETCIR. Os cães afetados (que eram 25 animais no total) apresentaram lesões de DR típicas com padrões variáveis de distribuição, gravidade e progressão. Seguindo a classificação prévia da DR, as lesões dos cães desta colônia foram classificadas em multifocais, geográficas, geográficas associadas a lesões multifocais e descolamento total da retina.

Aos 30 dias de idade foi difícil de examinar e fotografar a retina dos filhotes, devida a opacidade corneana e a opacificação da lente. Apesar das dificuldades em examinar estas retinas, em quatro animais foi possível observar anormalidades neste tecido. Aos 45 dias de idade a retina pode ser melhor avaliada, sendo

evidenciadas algumas áreas de lesões hiper-refletidas, dobras e descolamentos de retina (Figura 2A). Aos três meses de idade, foi possível observar as lesões com maior acurácia (Figura 2C). Aos cinco meses de idade, os animais apresentaram alteração na reflectividade do tapete lúcido, nos permitindo observar melhor a progressão das lesões (Figura 2B, D, E e F). Um caso em particular, de uma cadela Pit Bull Terrier (3.2), foi observado aos 45 dias de idade, o padrão geográfico da DR em ambos os olhos, contudo as lesões do olho esquerdo, aos 60 dias de idade, progrediram para o descolamento total de retina. Outros animais apresentaram progressão da reflectividade da retina, apresentando mais áreas hiper-refletidas após um ano de idade.

Foi observado que à medida que o bulbo ocular crescia acompanhando o desenvolvimento normal do animal, as lesões de DR mais leves (multifocais) se tornavam hiporefléticas com coloração escura na região tapetal e hiper-refletidas na região não tapetal, podendo apresentar diminuição do tamanho das dobras, sem alteração significativa na visão do paciente. Por sua vez, nos animais que apresentaram a DR em sua forma geográfica mais leve, foi observada alteração na reflectividade da região tapetal afetada, se tornando cada vez mais hiper-refletido no local da lesão, sugerindo atrofia retiniana nestas regiões. Já nos cães com a forma geográfica grave da DR, com presença de descolamento parcial da retina, e sobreposição do tecido retiniano, houve progressão das lesões para descolamento total da retina com posterior cegueira do animal afetado.

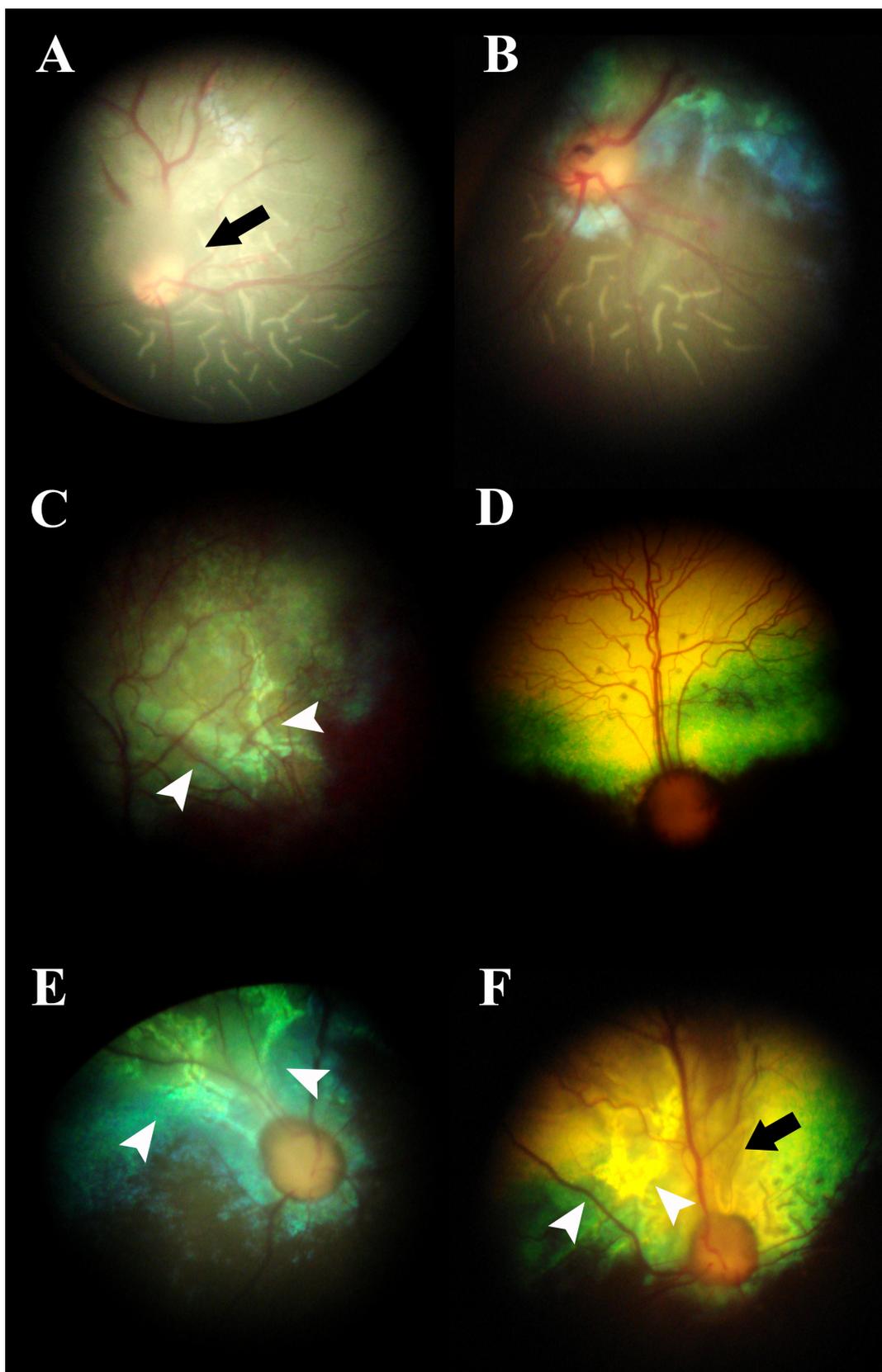
A maioria dos animais afetados apresentaram lesões de DR dorsalmente ao disco óptico (DO), muitas delas próximas aos vasos dorsais da retina. Contudo, alguns cães também tiveram algumas dobras localizadas na região não tapetal (Figura 2). As lesões do padrão multifocal da DR se distribuíram em ambas as regiões tapetal e não tapetal. Na região tapetal, as lesões foram pequenas, lineares ou pontuais, espessas, hipo-refletidas, e hiperpigmentadas ou escuras, orientadas ao redor dos vasos retinianos. Em contrapartida, na região não tapetal as dobras de retina eram claras, vermiformes ou em formato de Y, localizadas ao redor do DO. Quanto aos cães acometidos com a forma geográfica da doença, as dobras normalmente eram localizadas na região tapetal e apresentavam-se hiper-refletidas com diferentes formas, como Y, H, ou apenas grandes áreas hiper-refletidas com algumas regiões opacas sugerindo descolamento de retina parcial nestas regiões (Figura 2).

**Tabela 1-** Sexo, idade em que foi realizado o diagnóstico, formas da displasia de retina, anormalidades morfológicas do disco óptico (DO) e outras alterações oftálmicas observadas em cães da raça Pit Bull Terriers, que foram submetidos ao exame oftálmico e diagnosticados portadores da displasia de retina (DR).

ANIMAL ID	SEXO	IDADE	FORMAS DA DISPLASIA DE RETINA		ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA DO NO		CATARATA	OUTRAS ALTERAÇÕES
			OE	OD	OE	OD		
1.3	F	36 m	Geográfica/ Descolamento total	Geográfica/ Descolamento total	*	*	Bilateral	Glaucoma Secundário Uveíte
2.1	F	4 m	Geográfica	Geográfica	N	N		
2.2	F	4 m	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	A	A		
2.3	F	4 m	Geográfica	Geográfica	N	N		
2.4	M	4 m	Geográfica	Geográfica	A	A		
2.5	M	4 m	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	A	A		
2.6	M	4 m	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	A	A		
2.7	M	4 m	Geográfica, Descolamento parcial	Geográfica, Descolamento parcial	*	*		
2.8	M	3 m	Multifocal linear	Multifocal linear	N	N		
2.9	M	3 m	Multifocal linear	Multifocal	N	N		
2.10	F	45 d	Geográfica, Descolamento parcial	Geográfica, Descolamento parcial	N	N		
2.12	F	3 m	Multifocal linear	Multifocal linear	N	N		
2.13	F	45 d	Descolamento total	Geográfica	A	A	Bilateral	Uveíte
2.14	M	45 d	Descolamento total	Geográfica	*	N	Bilateral	Uveíte
2.26	F	45 d	Geográfica	Geográfica, Descolamento parcial	A	A		
2.27	F	45 d	Geográfica	Geográfica	A	A		
2.28	F	3 m	Opacidade ao redor dos vasos superiores	Opacidade ao redor dos vasos superiores	A	A		
3.2	F	45 d	Descolamento total	Geográfica, Descolamento parcial	*	N	Bilateral	Uveíte
3.3	M	45 d	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	N	N		Uveíte
3.7	F	3 m	Multifocal linear	Multifocal linear	A	A		
3.8	M	45 d	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	A	A		
3.16	M	3 m	Multifocal linear	Geográfica	N	A		
3.17	M	3 m	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	A	A		
3.18	M	3 m	Multifocal/Geográfica	Multifocal/Geográfica	N	A		
3.19	M	3 m	Multifocal/Geográfica	Multifocal linear	N	A		
3.20	F	45 dias	Descolamento total	Multifocal/Geográfica	*	N		

A – Apresentação anormal na morfologia do nervo óptico; N- Apresentação normal

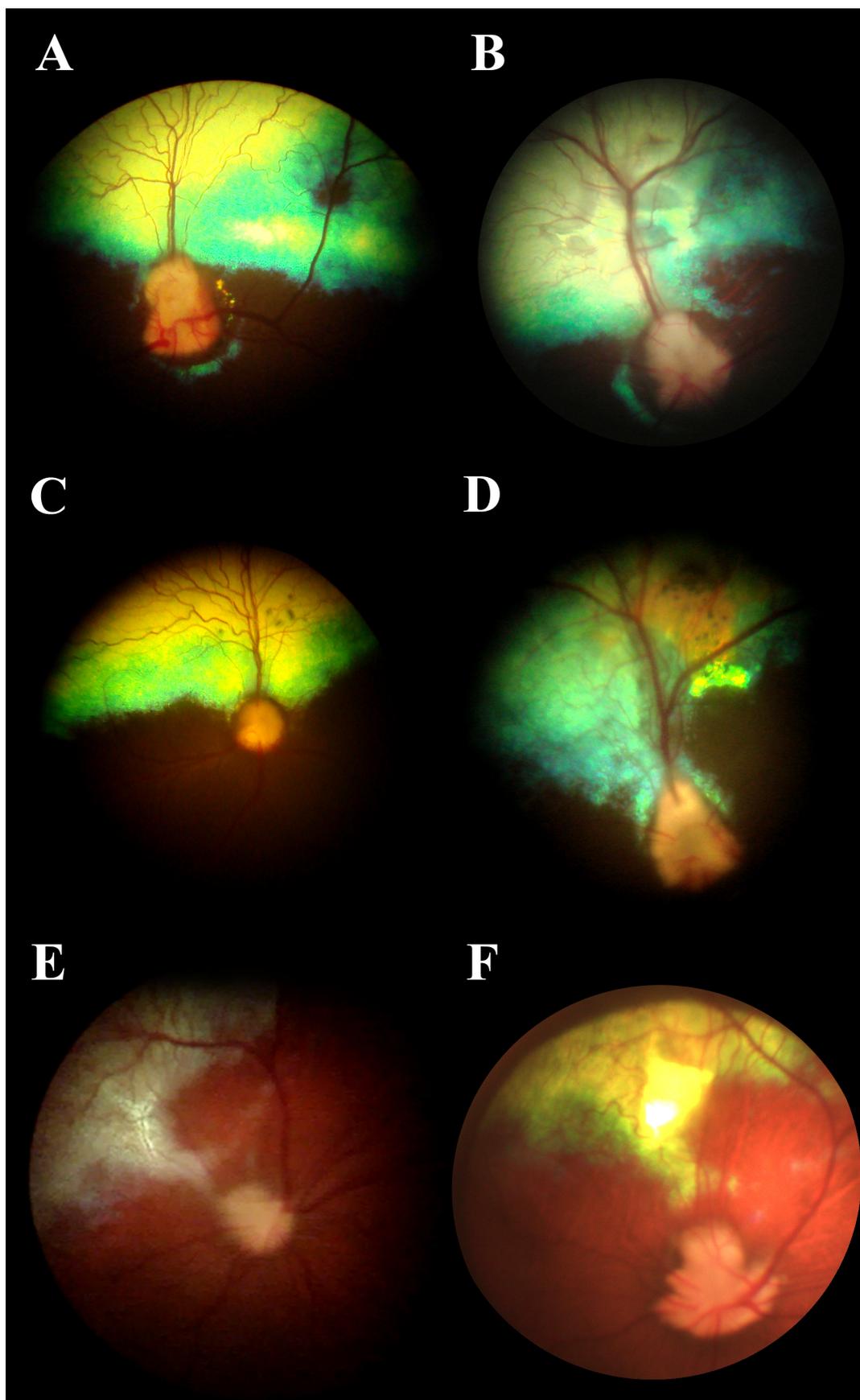
\* Não foi possível identificar alterações



**Figura 2** – Imagens do fundo de olho, evidenciando exemplos das formas multifocal e geográfica de displasia de retina. A e B - Olho direito do cão 3.3 aos 45 dias de idade e aos 5 meses de idade respectivamente. Observe dobras múltiplas da retina na área tapetal e não tapetal. Note ainda, a região opaca sobre o DO (seta preta), que progrediu para área com hiperrefletida na região dorsal DO. C - Olho esquerdo do cão 2.27 aos três meses de idade. Note área extensa de lesões de displasia de retina geográfica, dorsais ao DO, apresentando algumas regiões hiperrefletidas e áreas

hipo refletidas ao centro da região hiperrefletida (cabeça de seta branca). D - Olho direito do cão 3.7 aos sete meses de idade. Observe a forma multifocal da displasia de retina, envolvendo áreas da retina entre os vasos retinianos em sua região dorsal. E - Olho direito do cão 3.2 aos quatro meses de idade. Note lesões da displasia de retina geográfica (cabeça de seta branca) e descolamento parcial de retina dorsal ao DO. F - Olho esquerdo do cão 3.8 aos sete meses de idade. Observe lesões geográficas da displasia de retina (cabeça de seta branca) com região hiperrefletida, descolamento parcial de retina (seta preta) dorsalmente ao DO, e ainda note as dobras na retina localizadas na região tapetal.

Em uma cadela afetada (2.28), que ao exame oftalmoscópico não apresentou lesões características de displasia de retina, foi observado apenas uma opacidade sutil nos vasos retinianos superiores e uma anormalidade na morfologia do disco óptico em ambos os olhos (Figura 3A), característica esta, também observada em outros animais afetados da colônia (Figura 3B-F) (Tabela 1). A medida que os animais foram envelhecendo, o formato dos DOs foram se tornando cada vez mais anormal (Figura 3C e D). O exame histológico dos animais afetados descartou presença de coloboma de DO e confirmou que estes animais eram afetados, pois apresentavam diferentes graus de descolamento de retina verdadeiro, com presença de hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR) adjacente ao DO. Portanto, o animal 2.28 não foi considerado afetado apenas com a avaliação das imagens fundoscópicas, mais sim após analisar os achados histopatológicos dos seus bulbos oculares.



**Figura 3** – Imagens fotográficas do fundo de olho de diferentes cães, evidenciando exemplos da forma anormal da mielina, envolvendo a cabeça do disco óptico. Imagens obtidas de cadelas Pit Bull Terriers. A – Olho direito da cadela 2.28, B - Olho direito da cadela 2.26, C – Olho esquerdo da cadela

3.07 e D - Olho direto da cadela 2.13 sendo que ambas são cadelas Sem Raça Definida (SRD) oriundos de uma cruz de um cão SRD com uma cadela Pit Bull Terrier. As cadelas 2.28, 2.26, 3.07 apresentavam sete meses de idade e a cadela de 2.13 três anos de idade no momento da captação da imagem. E e F- Fotos do fundo do olho direito da cadela 2.27 aos 45 dias de vida (E) e aos 2 anos de idade (F). Note a forma geográfica da DR nas diferentes idades deste animal demonstrando a evolução das lesões, onde é possível observar diminuição de mielina na cabeça do disco óptico.

#### 3.4.1.3 Ultrassonografia ocular

O exame de ultrassonografia ocular revelou a presença de alterações retinianas, tais como áreas hiperecóticas com aparência de “asa de gaivota”, nos cães com a forma grave da doença (animais 3.2, 3.3, 3.17, 3.18, 3.19 e 3.20).

#### 3.4.1.4 Tomografia de Coerência Óptica

Ambos os cães (3.3, 3.7) que foram submetidos ao exame de TCO-DE mostraram em suas imagens varias lesões rodeada por estruturas normais da retina. A secção transversal de alta resolução da retina do animal 3.7 mostrou DR multifocal com presença de dobras envolvendo os segmentos internos (SI) e os segmentos externos (SE) da camada de fotorreceptores (Figura 4A).

Nas áreas afetadas, não foi possível distinguir os SI/SE dos fotorreceptores, a camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), a camada nuclear interna (CNI) e a camada plexiforme interna (CPI), pois se encontravam desorganizadas. Adicionalmente a CNE e a CNI apresentavam-se mais fina nas áreas acometidas com as dobras de retina. Algumas áreas hipocóticas foram visíveis entre os SE dos fotorreceptores e a EPR/coróide (CO), sugerindo descolamento de retina associado às dobras daquela região retiniana (Figura 4A, C e E).

As imagens de TCO-DE da retina do animal 3.3, que apresentava a forma geográfica da DR, também mostrou presença de dobras retinianas, porem em maior quantidade (Figura 4C, D e E). Como previamente descrito as CNE, CPE, CNI e CPI, nas áreas com dobras, apresentavam-se desorganizadas e na maioria dos casos afinadas. Não obstante, algumas lesões circulares com o centro hipocótico, caracterizadas histopatologicamente como rosetas, foram observadas (Figura 4E). O revestimento interior das lesões parece ser proveniente dos SI e SE da camada dos fotorreceptores rodeadas pela CNE desorganizada. Como consequências destas lesões, os restantes das camadas de retina, nas localizações acometidas, apresentaram-se desorganizadas e afinadas (Figuras 4C). Adicionalmente, em

algumas imagens de TCO-DE do animal 3.3, foi observada desorganização estrutural completa da retina, sendo impossível identificar as camadas da retina em varias destas áreas, principalmente ao redor no nervo óptico (Figura 4 C, D e E).

Foi observada ainda no animal 3.7 intensa redução do padrão de mielina na cabeça do DO circundada por segmentos normais da retina (Figura 4B). Em contra partida, o cão 3.3 apresentou intensa desorganização do tecido da retina ao redor no nervo óptico (ON), acompanhada de dobras e rosetas. Foi observado ainda, elevação da cabeça do NO, sugerindo a alteração do padrão normal de mielinização (Figura 4D).



**Figura 4** – Imagens coloridas do fundo do olho agrupadas com imagens da retina obtidas pelo exame de tomografia de coerência óptica de domínio espectral (TCO-DE). Observe os diferentes tipos de lesões de displasia de retina (DR) e as anormalidades na forma da cabeça do disco óptico em dois cães da raça Pit Bull Terrier afetados pela DR. A e B - Olho esquerdo da cadela 3.07 aos seis meses de idade acometida com a forma multifocal da DR na região tapetal da retina. A - Duas dobras envolveram o segmento interno (SI) e o segmento externo (SE) da camada dos fotorreceptores, sendo estes indiferenciáveis (setas brancas). A camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), a camada nuclear interna (CNI) e a camada plexiforme interna (CPI) estavam desorganizadas (setas brancas). Uma pequena área hiporreflexiva foi visível entre os SE e o epitélio pigmentar da retina (EPR) – coróide (CO) (cabeças de setas pretas). B – Note a intensa redução do padrão de mielina na cabeça do DO (seta vermelha), circundada por segmentos normais da retina. C, D e E - Cão 3.03 aos seis meses de idade apresentando lesões da forma geográfica da DR. Observe nas imagens de TCO-DE a grande quantidade de dobras na retina, em forma tubular, iniciando na camada SI/SE dos fotorreceptores (setas brancas), onde as CNE, CPE, CNI e CPI estavam desorganizadas e frequentemente finas nas áreas sob as dobras. Note ainda, estruturas hipercóicas circulares ou amorfas, em sua maioria não estando em contato com as camadas SI/SE dos fotorreceptores caracterizando as rosetas (setas azuis). C – Observe a intensa desorganização das camadas da retina, impossibilitando a identificação das camadas e abaixo desta região é possível observar área hiporreflexiva visível entre os SE e o epitélio pigmentar da retina (EPR) – coróide (CO), sugerindo descolamento de retina nesta região. D – Note a desorganização do tecido da retina ao redor no nervo óptico (NO) com elevação da cabeça do nervo óptico sugerindo a alteração do padrão normal de mielinização. E – Imagem evidenciando rosetas hipercóicas circulares ou amorfas, com excesso de tecido retiniano, e algumas em formato circular com centro hipocóico. Nestes casos é impossível identificar as camadas da retina nas regiões acometidas pelas lesões geográficas da DR (seta azul). C e D - Olho esquerdo do cão 3.03 e E – Olho direito do mesmo animal.

#### 3.4.1.5 Outras anormalidades

Outras anormalidades oculares também foram observadas nos animais afetados da colônia estudada, sendo elas cataratas em ambos os olhos com presença de uveítes facogênicas (animais 1.3, 2.13, 3.2, 3.3, 2.14) e glaucoma secundário (animal 1.3).

#### 3.4.1.6 Histopatologia

A avaliação histológica indicou que dos 14 animais examinados em diferentes idades, 10 eram afetados e quatro não eram afetados. As principais lesões observadas foram dobras na retina, rosetas e/ou descolamento parcial ou total com áreas de hipertrofia da EPR. As lesões histopatológicas de cada animal estão listadas na Tabela 2. Dos oito animais de um dia de vida (cães 2.16 a 2.23), quatro eram afetados e quatro eram normais (Figura 1). Ao exame macroscópico de cada bulbo ocular dos animais afetados de um dia de vida, foram observadas projeções da retina em direção ao corpo vítreo ao nível do DO (Figura 5A). Enquanto os animais não afetados apresentavam retina primitiva demonstrando o desenvolvimento normal. Os filhotes afetados (2.18, 2.19, 2.20 e 2.21) apresentaram como primeira anormalidade detectada, áreas de dobras para o interior da camada

de neuroblástica com descontinuidade da membrana limitante externa (MLE) e descolamento de retina parcial formando tubos incompletos. Em alguns casos áreas desprovidas com hipertrofias da camada do EPR subjacente as dobras de retina e a desorganização das células da camada neuroblástica externa também foi observada. Um animal (2.19) apresentou proeminência da camada de fibras nervosas (Figura 5G) próximo ao DO. Dois filhotes de um dia de vida (2.18 e 2.19) apresentaram rosetas e vítreo secundário.

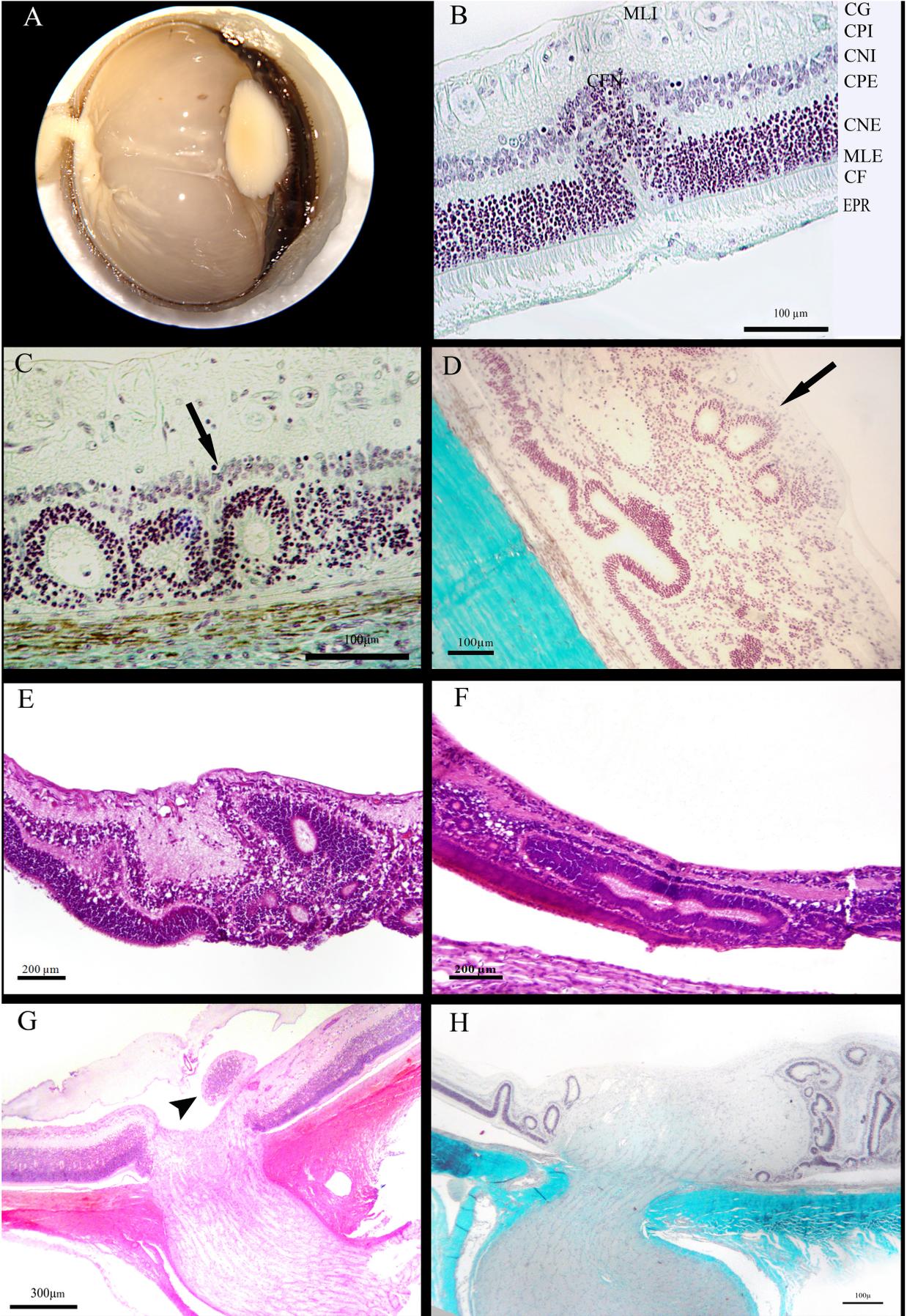
**Tabela 2** – Achados histológicos oculares dos olhos de Pit Bulls Terriers decorrentes de uma mesma colônia de cães, afetados e não afetados pela DR, que foram diagnosticados pelo exame histopatológico após seu óbito e da enucleação de seus olhos.

ANIMAL ID	SEXO	IDADE AO EXAME	ACHADOS HISTOLÓGICOS	
			OD	OE
1,3	F	84 m	Descolamento de retina total, hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR) atrofia/displasia e hielinização vascular (esclerose), gliose na retina, estruturas semelhantes a rosetas, “estágio final da degeneração de retina”, catarata, hemorragia intraocular (susp.), degeneração de vítreo, membrana fibrovascular pré-iridiana (MFPI), inflamação linfoplasmocítica na íris com presença de <i>entropion uveae</i> .	Não foi examinado
2,9	M	24 m	Descolamento de retina artefactual (secções com muitos artefatos o que comprometem uma avaliação mais crítica e precisa)	Descolamento de retina artefactual (secções com muitos artefatos o que compromete uma avaliação mais crítica e precisa)
2,10	F	4 m	Muitas dobras e rosetas, descolamento de retina, hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR), atrofia da retina periférica	Ocasionais áreas de desorganização/dobras/ displasia primariamente nas camadas externas da retina.
2,11	M	21 d	Displasia de retina com múltiplas rosetas e descontinuidade da membrana limitante externa (MLE)	Displasia de retina com múltiplas rosetas e descontinuidade da MLE
2,18	M	1 d	Sem anormalidades; retina primitiva	Rosetas/ dobras na retina, descontinuidade da MLE, túnica vascular <i>lentis</i> .
2,19	M	1 d	*	Hipertrofia da EPR, rosetas, dobras, descontinuidade da MLE, hiperplasia da membrana de fibras nervosas da retina ao redor da camada de fotorreceptores, alteração da morfologia do nervo óptico.
2,20	F	1 d	Dobras e descontinuidade da MLE.	*
2,21	F	1 d	Rosetas, descolamento de retina verdadeiro.	Rosetas, descolamento de retina, hipertrofia da EPR, e descolamento de retina artefactual.
2,28	F	18 m	Descolamento de retina multifocal com raros <i>tombstoning</i> no EPR e desorganização nuclear individual dos fotorreceptores, cistos retinianos periféricos, atrofia da camada plexiforme externa (CPE), anormalidade nuclear nas camadas celulares próximas ao NO	Descolamento de retina com hipertrofia do EPR, perda da EPR, apesar de que ocorreu aderência da retina externa atrofiada na coroide, com hielinização vascular coroidal focal (talvez pela hipertensão), atrofia da CPE, anormalidade nas células ganglionares próximas ao NO
2,29	F	21 d	Sem anormalidades;	Displasia de retina, com múltiplas rosetas, descolamento foca da retina com hipertrofia da EPR na região afetada, “read-dead” (necrose) das células ganglionares e hifema (possivelmente associado ao trauma).

\*não foi avaliado.

Um animal de quatro meses de idade (2.10) e outro de 21 dias de vida (2.29) foram acometidos com a forma geográfica da DR, observando-se, em ambos, extensas áreas de desorganização retiniana, dobras e rosetas (Figuras 5H e 5E, respectivamente). Outro filhote de 21 dias de vida (2.11) também manifestou a forma multifocal da displasia de retina (Figura 5F). Todos os três animais apresentaram completa diferenciação das camadas da retina, porém com presença de dobras da retina caracterizada como invaginações focais da camada de fotorreceptores, MLE e CNE formando tubos incompletos (Figuras 5B e 5D). Nos cães 2.29 e 2.10 estas alterações estavam acompanhadas do afinamento da CNI e abaixo das dobras por descolamento de retina verdadeiro caracterizada pela presença de hipertrofia do EPR. Adicionalmente, foram observados tubos completamente fechados caracterizados como rosetas, com o lúmen revestido pela MLE e rodeada pela CNE (Figura 5C, 5D, 5E e 5H).

Três animais adultos (2.28, 2.9 e 1.3) também apresentaram descolamento de retina verdadeiro. O cão de um ano de idade (2.28) teve descolamento de retina multifocal, incluindo na região ao redor do DO, atrofia da CPE, anormalidades das células ganglionares ao redor do DO e uma pequena quantidade de cistos na periferia da retina. O cão de dois anos de idade (2.9) tinha atrofia na região periférica da retina com presença de dobras e descolamento de retina verdadeiro. No bulbo ocular, enucleado, da cadela de sete anos de idade (1.3), o animal mais velho e a probanda da colônia estudada, observou-se descolamento total da retina em forma de “asa de gaivota”. A retina deste animal se apresentava completamente atrofiada, caracterizando o estágio final da degeneração com esclerose do segmento vascular e foram observadas ainda, estruturas semelhantes a rosetas próximo ao disco óptico. Adicionalmente, este cão tinha formação de drusas, catarata madura, *entropion uveae*, e uma pequena quantidade de linfócitos e infiltrados de células plasmáticas na íris.



**Figura 5** – Imagens A,B,C,D e H são de uma cadela Pit Bull Terrier (2.10) de quatro meses de idade, acometida com a forma geográfica da displasia de retina (DR). A. Aspecto macroscópico do bulbo ocular seccionado ao longo do seu eixo axial. Na região do nervo óptico a retina apresenta uma projeção em direção à câmara vítrea. B. Fotomicrografia da retina apresentando invaginação focal dos SE/SI dos fotorreceptores e descolamento verdadeiro com hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR), formando um tubo incompleto, caracterizando as dobras. Coloração Tricrômico de Gomori. C. Fotomicrografia da retina mostrando tubos completamente fechados (rosetas) (seta preta). O lúmen é delimitado pela membrana limitante externa (MLE) rodeada pela camada nuclear externa (CNE) desorganizada e pela degeneração dos fotorreceptores. Tricrômico de Gomori. D. Fotomicrografia da retina contento dobra retiniana larga com presença de rosetas múltiplas (seta preta) acompanhadas pelo descolamento de retina verdadeiro. Note a desorganização da camada de células ganglionares e nas camadas nucleares. As camadas plexiformes por sua vez são indistinguíveis. Tricrômico de Gomori. E. Fotomicrografia da retina da cadela Pit Bull Terrier (2.28), de 23 dias de vida, afetada com a forma geográfica da DR. Observe a presença de rosetas múltiplas com uma importante desorganização das camadas retinianas. Hematoxilina e Eosina de Harris. F. Fotomicrografia da retina de um cão Pit Bull Terrier (2.9), de 23 dias de vida. Note a grande quantidade de rosetas pequenas e uma roseta grande, acompanhadas de intensa desorganização das camadas externas na retina e descolamento de retina verdadeiro. Hematoxilina e Eosina de Harris. G. Fotomicrografia do segmento posterior do bulbo ocular de um cão Pit Bull Terrier (2.19) de um dia de vida. Note a retina primitiva com presença de proeminência da camada de fibras nervosas ao nível do nervo óptico (cabeça de seta preta), provavelmente representando a retina sensorial. O NO aparentemente encontrava-se levemente escavado, provavelmente em decorrência da redução da quantidade de mielina. Hematoxilina e Eosina de Harris. H. Fotomicrografia do seguimento posterior do bulbo ocular (cão 2.10), evidenciando a presença de algumas dobras, bem como de rosetas de diferentes tamanhos, levando a desorganização das camadas da retina ao redor do NO. Tricrômico de Gomori.

### 3.4.2 Exames não oculares

De acordo com as alturas mensuradas dos 23 animais adultos (1.3, 2.8, 2.9, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, 2.24-2.28, 3.1-3.11), comparando animais afetados com os não afetados a média  $\pm$  desvio padrão das alturas dos cães Pit Bull Terriers afetados foi  $0,47 \pm 0,038$  m comparando e os cães não afetados foi de  $0,54 \pm 0,024$  m. Comparando a altura entre eles, os cães afetados foram significativamente mais baixos que os cães não afetados ( $P = 0,00002$ ).

Dos seis animais submetidos ao exame radiográfico da pelve, quadris e membros torácicos (1.3, 2.13, 2.14, 2.27, 3.2 e 3.3), cindo animais eram acometidos pela displasia coxo-femural (1.3, 2.13, 2.14, 3.2 e 3.3). Destes, um animal (3.3) apresentou osteocondrite dissecante (OCD) em ambos os ombros, e outro animal (3.2), possuía estatura extremamente baixa semelhante à aparência de um portador de nanismo quando comparado com os outros cães da ninhada. Contudo, nenhum deles apresentou sinais radiográficos completos de nanismo e displasia de esquelética (ossificação central delgada, fises irregulares ou alargadas, displasia epifiseal e crescimento assíncrono). Todavia, não podemos afirmar que tanto a OCD ou a displasia coxo-femoral observadas nos animais deste estudo estão associadas ou não com o gene mutante responsável pela DOE.

### 3.4.3 Testes laboratoriais

Os dois animais submetidos à genotipagem do RD/OSD, foram negativos para a presença da mutação nos genes do colágeno 9A2 e 9A3, demonstrando que ambos os cães apresentavam alelos normais para ambos os *locis* (*drd1* e *drd2*).

Os três animais que foram testados para o herpesvírus canino tipo 1 também foram negativos para este patógeno.

## 3.5 DISCUSSÃO

A displasia de retina (DR) vem sendo descrita em várias raças de cães (ASHTON et al., 1968; RUBIN, 1968; GELATT; VEITH, 1970; SCHIAVO; FIELD, 1974; MACMILLAN; LIPTON, 1978; STADES, 1978; BEDFORD, 1982; MEYERS ET AL., 1983; PEIFFER; FISCHER, 1983; TOOLE et al., 1983; LARATTA et al., 1985; HOLLE et al., 1999; GRAHN et al., 2004). Contudo, este é o primeiro relato investigativo caracterizando esta doença na raça Pit Bull Terriers. Foi descartada a possibilidade de que os animais deste estudo adquiriram a DR, como resultado de alterações infecciosas durante o desenvolvimento e diferenciação da retina. Isto porque, os animais testados para o herpesvírus canino foram negativos para este agente, sendo um dos animais a cadela probanda deste estudo. Igualmente não foi observada nenhuma lesão histopatológica nos animais afetados que sugira lesões em decorrência do herpesvírus canino (SHIVELY et al., 1970; ALBERT et al., 1977).

A análise do heredograma nos sugeriu que o modo de herdabilidade da DR em Pit Bull Terriers é uma condição autossômica dominante. Pois, nesta colônia após cruzamentos, ambos os sexos foram igualmente afetados pela DR. Portanto, acreditamos que não seja ligada ao sexo. Adicionalmente o cruzamento de um macho afetado com duas fêmeas normais sem parentesco, resultou em cães afetados nesta prole, sustentando o modo de herança proposto. O cruzamento de dois cães afetados resultou tanto em cães normais como afetados pela DR, confirmando a ocorrência de um modo de herança dominante totalmente penetrante. Como já citado anteriormente, as formas mais comuns de herdabilidade da DR descrita nas diferentes raças é o modo autossômico recessivo (Rubin, 1968; Barnet,

1970; GELATT; VEITH, 1970; MACMILLAN; LIPTON, 1978; SCHMIDT et al., 1979; BERGSJØ et al., 1984; LONG, 1999; GRAHN et al., 2004; ; GELATT, 2007; GOLDSTEIN et al., 2010), e o modo dominante com penetrância incompleta (CARRIG et al. 1988; NELSON; MACMILLAN,1983).

A displasia de retina em Retrievers do Labrador e Samoiedas, vêm sendo descritas como displasia oculo-esquelética, a qual é herdada pelo modo dominante com penetrância incompleta. Nesta doença os animais heterozigotos podem parecer clinicamente saudáveis apresentando lesões oculares leves (lesões multifocais da DR), podendo não apresentar alterações esqueléticas e os animais homozigotos para o alelo mutante apresentam lesões oculares graves (displasia vitreoretiniana completa) acompanhadas de nanismo com displasia esquelética (CARRIG et al., 1988).

A DR pode ter diferentes classificações clínicas e ser dividida de acordo com o padrão de distribuição e gravidade das lesões. Seguindo este raciocínio a maioria dos Pit Bull Terriers da nossa colônia apresentaram lesões multifocais, geográficas e descolamento total da retina, como previamente descrito pela literatura (BARNETT et al., 1969; MACMILLAN; LIPTON, 1978; LAVACH et al., 1978; BEDFORD, 1982; NELSON; MAC MILLAN,1983; BERGSJØ et al., 1984; CRISPIN et al., 1999; HOLLE et al., 1999; LONG, 1999; GRAHN et al., 2004). Contudo, a forma focal da doença não foi diagnosticada nesta colônia. Além disso, dois cães apresentaram a forma multifocal da DR associada a uma extensa lesão geográfica, que se estendia dorsalmente ao disco óptico (DO), acompanhada de deficit visual grave. Este padrão de lesão, até o presente momento, não foi observado nas outras raças previamente descritas com esta doença. Entretanto, exceto nos casos de DR generalizada em Schnauzers Miniaturas, as lesões de DR foram interpretadas como extensas áreas de descolamento de retina ou, provavelmente áreas de não aderência da retina (GRAHN et al., 2004).

Tipicamente, as lesões da DR, especialmente o padrão geográfico, foram previamente consideradas não visíveis em cães antes das 10 semanas de idade (HOLLE et al., 1999). No entanto, na colônia de cães deste estudo, a primeira visualização das lesões ao exame de fundoscopia, ocorreu em torno dos primeiros 30 dias de idade, sendo visualizadas dobras de coloração cinza clara e opacificações ao redor do DO. Contudo, não foi possível captar imagens previamente aos 30 dias de vida, pois, todos os filhotes apresentavam uma

opacificação difusa da córnea e da lente. O que é de certa forma, esperado pois, como previamente descrito em investigações em filhotes de Retrievers do Labrador, (BARNETT, 1969; MONTIANI-FERREIRA et al., 2003), Dobermann Pinschers e Beagles, que demonstra que a opacidade corneana pós natal reduz após os 30 dias de vida (MONTIANI-FERREIRA et al., 2003). Normalmente verifica-se a redução da opacidade corneana até aproximadamente 42 dias após a abertura palpebral (MONTIANI-FERREIRA et al., 2003), provavelmente é decorrente do amadurecimento fisiológico do endotélio corneano (MONTIANI-FERREIRA et al., 2003). Segundo Holle et al. (1999) o exame oftálmico inicial entre 5 a 9 semanas de idade possibilita determinar a presença das dobras e a gravidade das mesmas, contudo, afirmou não ser possível classificar o padrão da DR. Em contrapartida, um estudo histopatológico avaliando os olhos de fetos de cães da raça Spring Spaniel Inglês aos 50 a 55 dias de gestação e de neonatos de 1 a 7 dias de vida, os autores observaram nas análises histológicas a presença de dobras, rosetas e descolamento de retina verdadeiro (WHITELEY, 1991).

As lesões observadas na maioria dos animais afetados da nossa colônia estavam localizadas dorsalmente ao DO e ao redor dos vasos, à similitude do observado nas diferentes formas de DR (MACMILLAN, 1980; NELSON; MAC MILLAN, 1983; HOLLE et al., 1999; GRAHN et al., 2004;). Porém, em alguns dos nossos animais, muitas destas dobras foram encontradas na retina não tapetal (no fundo pigmentado), fato este pouco observado nos relatos prévios de DR (HOLLE et al., 1999; MCLELLAN, 2002). Alguns animais apresentaram lesões bilaterais assimétricas de DR, corroborando com a literatura (MACMILLAN, 1980; NELSON; MAC MILLAN, 1983; HOLLE et al., 1999). Em três cães foram observados diferentes padrões das lesões de DR em cada olho. Em um olho foi visualizado a forma geográfica e no olho contralateral o descolamento total da retina, como previamente relatado na raça Spring Spaniel Inglês (GRAHN et al., 2004). Nos nossos cães da raça Pit Bull Terriers afetados com a forma geográfica foi possível observar diferentes apresentações da displasia, dentre elas a forma em H,Y e linear, a forma circular e a de “ferradura”, relatadas em Golden Retriever e Pastor Alemão (CRISPIN et al., 1999; HOLLE et al., 1999) não foram encontrados neste estudo. Ainda não foi determinada a razão pela qual os cães deste estudo, que possuem a mesma condição genética, apresentaram diferentes apresentações clínicas das lesões de DR. Não há evidência clínica que suporte a razão pelo qual, tanto alguns animais

heterozigotos quanto homozigotos apresentaram lesões graves da DR, sendo que outros cães heterozigotos expressaram a forma branda da doença. Discordando dos achados observado nos outros tipos de herança genética da DR, que afirmam que os animais homozigotos apresentam a forma grave da doença e os heterozigotos a forma branda (Schmidt et al., 1979).

Uma característica curiosa observada em muitos dos cães afetados foi o formato do disco óptico, que na medida em que os cães foram crescendo os seus DO se tornaram cada vez mais anormais. Ao exame clínico de fundoscopia, nesses animais houve redução visível de mielina próximo a sua região central, resultando em uma forma semelhante à ampulheta. Sugerindo macroscopicamente a perda de mielina no DO ou presença de algum certo grau de coloboma. Os cães da raça Cocker Spaniel Americano que apresentaram displasia de retina multifocal, apresentaram histologicamente escavação do DO e as camadas ectópicas da retina se estenderam para o nervo óptico. Contudo, anormalidades macroscópicas no formato do DO não foram relatadas nesta raça (MACMILLAN; LIPTON, 1978). O coloboma na região do NO é uma anomalia hereditária que pode estar acompanhando a displasia de retina e outras anormalidades congênitas (GELATT; VEITH, 1970; GELATT; MCGILL, 1973; TOOLE et al., 1983; GELATT, 2007). Entretanto, até o presente momento, não foi diagnosticado nenhum caso desta alteração nos nossos cães submetidos ao exame histopatológico.

A ultrassonografia ocular (US) possibilitou diagnosticar as grandes proeminências hiperecóticas e acompanhar sua evolução para alterações com aparência de “asa de gaivota,” o que foi observado no primeiro mês de idade de alguns dos cães afetados pela DR. O primeiro caso de descolamento de retina dos cães desse estudo, com a típica aparência de “asa de gaivota”, foi observado em um filhote com 21 dias de idade. Conforme relato em cães Springer Spaniels Inglês, o descolamento de retina ocorre durante os primeiros seis meses de vida, resultado do crescimento e diferenciação da retina (TOOLE et al., 1983).

A Tomografia de Coerência Óptica de Dominio Espectral (TCO-DE) é uma técnica não invasiva, de não contato, de alta resolução e análoga a ultrassonografia de modo-B, que permite estudar as alterações estruturais da retina e da cabeça do nervo óptico (MCLELLAN; RASMUSSEN, 2012; ROSOLEN et al., 2012; MCKIBBIN et al., 2013). Estudos utilizando esta técnica para caracterizar a anatomia normal dos segmentos anterior e posterior do bulbo ocular, têm sido realizados em diferentes

espécies (HUANG et al., 1998; GEKELER et al., 2007;MCLELLAN; RASMUSSEN, 2012; ROSOLEN et al., 2012; MCKIBBIN et al., 2013). Este é o primeiro relato de cães afetados pela displasia de retina que foram submetidos ao exame de TCO-DE. Utilizando esta técnica, foi possível visualizar e avaliar as camadas saudáveis da retina e acometidas pela DR, podendo avaliar as dobras e as rosetas na retina. Nós observamos que o segmento interno (SI) e o segmento externo (SE) da camada de fotorreceptores, não foram distinguíveis. A camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), a camada nuclear interna (CNI) e a camada plexiforme interna (CPI), encontravam-se afinadas. Como previamente relatado, baseado no exame histológico ocular, as dobras e rosetas na retina podem levar a degeneração e atrofia destas camadas (TOOLE et al. 1983). Uma pequena área hipercócica foi visível entre o SE e o epitélio pigmentar da retina (EPR), logo abaixo da dobra, provavelmente resultante da progressão da dobra para o descolamento focal acompanhado da hipertrofia do EPR. (TOOLE et al. 1983; WHITELEY 1991) Na forma geográfica da DR não foi impossível identificar as camadas da retina, em decorrência da desorganização das estruturas deste tecido. Nesta forma, nas áreas afetadas, a retina se encontrava afinada, com presença de muitas dobras e rosetas, caracterizadas, muitas vezes, por lesões circulares com o centro hipocócico. Estas lesões circulares (rosetas) geralmente são compostas por um espaço circular revestido por células fotorreceptoras e delimitado pela membrana limitante externa (TOOLE et al., 1983). A forma multifocal, por sua vez, possuiu algumas dobras retinianas circundada por extensas áreas composta pela estrutura normal da retina. Com esta técnica diagnóstica, também foi possível observar dois tipos diferentes de NO. Onde, na forma geográfica da DR, o NO aparentemente apresentou excesso de mielina. E em contrapartida, na displasia multifocal, pareceu ter ocorrido redução da mielinização do NO, com presença de escavação do DO, como foi observado em prévios relatos em outras raças de cães acometidas pela DR (MACMILLAN; LIPTON, 1978).

A avaliação histológica dos animais de um dia de vida (4 animais) deste estudo revelou presença de anormalidades como dobras e rosetas na camada neuroblástica com descontinuidade da membrana limitante externa (MLE), o mesmo foi observado nos cães da raça Springer Spaniel Inglês. Nestes cães os autores afirmaram que a MLE apresentou uma forma irregular e era composta por zonas aderentes que apresentavam regiões com aposições focais da membrana. Nestas

junções locais os GAPs ou junções comunicantes não são visíveis nos cães adultos (WHITELEY; YOUNG 1986; WHITELEY, 1991). Adicionalmente, foram observados GAPs com hipertrofia do EPR subjacente e desorganização das células da camada neuroblástica externa. Alterações similares foram previamente relatadas, com separação da retina sensorial do EPR, o qual nem sempre se apresentava apenas hipertrofiado, mas em alguns casos também hiperplásico (TOOLE et al., 1983; WHITELEY, 1991). A desorganização, a proliferação da camada neuroblástica e a perda das junções formando a MLE sem anormalidades no EPR, sugere uma anormalidade intrínseca na diferenciação da retina. Isto pode estar associada a alterações na adesão das células na região neuroblástica externa (WHITELEY, 1991). Em um dos nossos casos, próximo à cabeça do DO uma proeminente proliferação da camada de fibras nervosas foi observada. Este evento pode ser desde uma simples à uma altamente complexa invaginação da retina sensorial, como foi relatada nos cães da raça Springer Spaniel Inglês de um dia de vida (TOOLE et al., 1983). Este processo displásico normalmente é mais proeminente dorsalmente a região tapetal e envolve apenas a retina sensorial (WHITELEY, 1991) como foi observado na Figura 5G deste estudo. Foi notado ainda, vítreo secundário em dois animais de 24 horas de vida. Apesar da possibilidade desta estrutura ser um achado normal nos filhotes de até 10 dias de idade, esta estrutura pode predispor com a formação da DR (MANN, 1935; PEIFFER; FISCHER, 1983). A presença da adesão do vítreo primário e do vítreo secundário, que normalmente está ausente, também pode auxiliar na formação da DR. Secundariamente ao envolvimento destas duas estruturas na formação da DR, a retina se torna desorganizada, e a camada interna pode descolar da cúpula óptica (MANN, 1935; DUBIELZIG et al., 2010).

As lesões observadas nos cães jovens consistiam em extensas áreas de desorganização da retina, dobras e rosetas. Algumas vezes estas alterações apareceram como complexos que são compostos por uma, duas ou mais camadas de dobras e rosetas. As rosetas são resultados do exagero de desenvolvimento da retina em seu processo normal de diferenciação, com presença de crescimento exacerbado das células da camada interna da cúpula óptica (LAHAV et al., 1973). Lahav et al. (1973) classificaram essa distribuição das rosetas de acordo com o número de camadas diferenciadas da retina envolvidas em sua dobragem anormal. As rosetas de três camadas são sugestivas que a retina madura, que sofreu descolamento se sobrepôs e formou várias dobras. As rosetas de duas camadas

consistem rosetas cujo interior do seu lúmen contem células neurais indiferenciadas rodeadas por células fotorreceptoras e uma camada periférica de células do tipo bipolar (LAVACH et al., 1978) provenientes da CNE (LAHAV et al., 1973). As rosetas de uma camada são compostas apenas por células neurais moderadamente bem diferenciadas e a MLE que circunda o lúmen (LAVACH et al., 1978) , que advém da CNE (LAHAV et al., 1973) ). Além disso, estas rosetas de uma camada podem ser acompanhadas por um descolamento verdadeiro de retina com presença de hipertrofia do EPR, o que poderia representar a resposta normal ao descolamento da retina sensorial (MACHEMER; LAQUA 1975; TOOLE et al., 1983).

O cão de um ano de idade não apresentou nenhum sinal de displasia à oftalmoscopia indireta em vida, apenas foi observada uma forma anormal do disco óptico. Contudo, ao exame histopatológico algumas áreas apresentaram descolamento de retina parcial, com presença de cistos na retina periférica, atrofia da CPE e anormalidade nas células ganglionares próximas ao nervo óptico. A atrofia de retina é rara em cães jovens e pode estar associada à displasia de retina prévia com uma ou diversas rosetas (TOOLE et al., 1983). Este animal pode ter apresentado uma dobra de retina quando o mesmo era jovem, porém quando começou a envelhecer a retina pode ter esticado e como consequência a dobra desapareceu. Este fenômeno pode ocorrer por volta dos seis meses de idade do cão (MCLELLAN, 2002; GELATT, 2007; DUBIELZIG et al., 2010).

As lesões oculares crônicas que foram observadas no animal mais velho da colônia (sete anos de idade) foram caracterizadas pelo descolamento total da retina e pelo estágio final da degeneração da retina, com a presença de algumas estruturas semelhantes a rosetas próximas ao DO. Apesar da maioria das rosetas serem provavelmente apenas dobras da retina que foram seccionadas transversalmente e poderem também ser observadas em lesões degenerativas, (LAHAV et al., 1973) neste cão, as lesões se encontravam próximas ao DO, onde normalmente as lesões displásicas são predominantemente encontradas nos cães afetados pela DR. Adicionalmente, os cães apresentaram lesões geográficas da DR, previamente observadas ao exame de fundoscopia, que progrediram para o descolamento total de retina.

Outra anormalidade diagnosticada na colônia de cães afetados pela DR foi na altura media dos animais, que foi significativamente menor nos animais afetados, quando comparado com os cães não afetados. A síndrome da displasia oculo-

esquelética (DOE) é caracterizada por anormalidade oculares e esqueléticas acompanhada pelo nanismo. A DOE tem sido relatada nos Retrievers dos Labradores no *loci drd1* (nanismo com displasia de retina do tipo 1) (CARRIG et al., 1977; CARRIG et al., 1988; GIONFRIDDO; NIYO, 1992) e Samoiedas no *loci drd2* (nanismo com displasia de retina do tipo 2) (MEYERS et al., 1983). Apesar do fato de que a maioria dos nossos cães afetados serem baixos, e um (3.2) ter estatura extremamente baixa semelhante a aparência de anão quando comparado com os outros cães da ninhada, nenhum dos animais apresentou sinais radiográficos completos proporcionais ou não de nanismo e displasia de esquelética (ossificação central delgada, fises irregulares ou alargadas, displasia epifiseal, crescimento assíncrono). Por sua vez, alguns animais desta colônia apresentaram displasia coxo-femural e um cão foi diagnosticado com osteocondrite dissecante (OCD) em ambas articulações do ombro, o que pode até estar correlacionado com a displasia de retina ou ser apenas uma displasia hereditária não relacionada com a DR, sendo assim resultado de uma mutação em um gene diferente da RD (SKAGEN et al., 2011; PFAHLER; DISTL, 2012). Um estudo encontrou uma mutação insercional no gene COL9A3 no cromossomo 24, que cosegregou com o *drd1* e uma mutação de deleção no gene COL9A2 no cromossomo 15, que cosegregou com o *drd2* (GOLDSTEIN et al., 2010). Apesar dos animais apresentarem alterações oculares incluindo a catarata, a displasia de retina multifocal e a geográfica e o descolamento total da retina associada com a estatura baixa (MEYERS et al., 1983; CARRIG et al., 1988), estes cães foram negativos para o teste genético da DOE. Acreditamos que possa existir uma expressão diferente do gene mutante responsável pela displasia de retina nesta colônia de cães.

Esta é o primeiro relato e caracterização clínica da forma hereditária comprovada da displasia de retina em Pit Bull Terriers. A análise do heredograma desta colônia mostrou a presença da forma hereditária da displasia de retina, sendo o modo de herdabilidade uma condição autossômica dominante. As lesões retinianas apresentaram diferentes graus de dobras e descolamento de retina, seguindo as apresentações clássicas das formas multifocal, multifocal/geográfica e geográfica, associadas a morfologia anormal do disco óptico, e estatura baixa. Esta doença não é causada pelas mutações genéticas conhecidas da DOE. Complementarmente, estudos investigando diferentes genes candidatos, como possível responsável por esta doença, vêm sendo desenvolvidos.

### 3.6 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, G.D.; RUBIN, L.F.; BISTNER, S.I. Development of the canine eye. **Am. J. Vet. Res**, 33(12), pp.2399–2414, 1972.
- ALBERT, D.M.; LAHAV, M.; CARMICHAEL, L.E.; et al. Canine herpes-induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. **Investigative ophthalmology**, 15(4), pp.267–78, 1976..
- ALBERT, D.M. LAHAV, M.; COLBY, E.D. et al. Retinal neoplasia and dysplasia. I. Induction by feline leukemia virus. **Investigative ophthalmology & visual science**, 16(4), pp.325–37, 1977.
- ASHTON, N.; BARNETT, K.C.; SACHS, D.D. Retinal dysplasia in the Sealyham terrier. **The Journal of pathology and bacteriology**, 96(2), pp.269–72, 1968.
- BARNETT, K.C.; BJORCK, G.R.; KOCK, E. Hereditary Retinal Dysplasia in the Labrador Retriever in England and Sweden. **Journal of Small Animal Practice**, 10 (12), pp.755–759, 1969.
- BARRIE, K.P.; PEIFFER, R.L.; GELATT, K.N.; et al. Posterior lenticonus, microphthalmia, congenital cataracts, and retinal folds in an Old English Sheepdog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 15(6), pp.715–717, 1979..
- BAUER, B.S.; FORSYTH, G.W.; SANDMEYER, L.S.; et al. Mitochondrial transcription factor A (Tfam) gene sequencing and mitochondrial evaluation in inherited retinal dysplasia in miniature schnauzer dogs. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire**, 75(2), pp.134–40, 2011.
- BEDFORD, P. Multifocal retinal dysplasia in the rottweiler. **Veterinary Record**, 111(13), pp.304–305, 1982.

- BERGSJØ, T.; ARNESEN, K. HEIM, P.; et al. Congenital blindness with ocular developmental anomalies, including retinal dysplasia, in Doberman Pinscher dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 184(11), pp.1383–6, 1984.
- BLAIR, N.P., DODGE, J.T.; SCHMIDT, G.M. Rhegmatogenous retinal detachment in Labrador retrievers. I. Development of retinal tears and detachment. **Archives of ophthalmology**, 103(6), pp.842–7, 1985.
- CARRIG, C.B.; MACMILLAN, A.; BRUNDAGE, S.; et al. Retinal dysplasia associated with skeletal abnormalities in Labrador Retrievers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 170(1), pp.49–57, 1977.
- CARRIG, C.B.; SPONENBERG, D.P.; SCHMIDT, G.M.; et al. Inheritance of associated ocular and skeletal dysplasia in Labrador retrievers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 193(10), pp.1269–72, 1988.
- COLLINS, B.K. Familial cataracts and concurrent ocular anomalies in chow chows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 200(10), pp.1485–91, 1992.
- CRISPIN, S.M., LONG, S.E.; WHEELER, C.A. Incidence and ocular manifestations of multifocal retinal dysplasia in the golden retriever in the UK. **Veterinary Record**, 145(23), pp.669–672, 1999.
- DU, F., ACLAND, G.M.; RAY, J. Cloning and expression of type II collagen mRNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. **Gene**, 255(2), pp.307–16, 2000.
- DUBIELZIG, R.R.; KETRING, K.L.; MCLELLAN, G.J.; ET al. 2010. **Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review**. In Philadelphia: Saunders, pp. 29–53.
- GEKELER, F.; GMEINER, H.; VÖLKER, M.; et al. Assessment of the posterior segment of the cat eye by optical coherence tomography (OCT). **Veterinary Ophthalmology**, 10(3), pp.173–8, 2007.

- GELATT, K.N., 2007. **Veterinary Ophthalmology** 4th ed., Philadelphia: Blackwell Publishers.
- GELATT, K.N.; MCGILL, L.D. Clinical characteristics of microphthalmia with colobomas of the Australian Shepherd Dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 162(5), pp.393–6, 1973..
- GELATT, K.N.; VEITH, L.A. Hereditary multiple ocular anomalies in Australian shepherd dogs. (preliminary report). **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, 65(1), pp.39–42, 1970.
- GIONFRIDDO, J.R.; NIYO, Y. Retinal and skeletal dysplasia in a field trial Labrador Retriever puppy. **Canine practice**, 17(2), pp.25–29, 1992.
- GODEL, V., NEMET, P.; LAZAR, M. Retinal dysplasia. **Ophthalmologica, Documenta**, 51(3), pp.277–288, 1981.
- GOLDSTEIN, O.; GUYON, R.; KUKEKOVA, A.; et al. COL9A2 and COL9A3 mutations in canine autosomal recessive oculoskeletal dysplasia. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, 21(7-8), pp.398–408, 2010.
- GRAHN, B.H., STOREY, E.S.; CULLEN, C.L. Diagnostic ophthalmology. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, 43(11), pp.889–90, 2002.
- GRAHN, B.H., STOREY, E.S.; MCMILLAN, C. Inherited retinal dysplasia and persistent hyperplastic primary vitreous in Miniature Schnauzer dogs. **Veterinary ophthalmology**, 7(3), pp.151–8, 2004.
- GRONDONA, J.M.; KASTNER, P.; GANSMULLER, A.; et al. Retinal dysplasia and degeneration in RARbeta2/RARgamma2 compound mutant mice. **Development (Cambridge, England)**, 122(7), pp.2173–88, 1996.
- GUYOMARD, J.L.; ROSOLEN, S.G.; PAQUES, M.; et al. A low-cost and simple imaging technique of the anterior and posterior segments: eye fundus, ciliary

bodies, iridocorneal angle. **Investigative ophthalmology & visual science**, 49(11), pp.5168–74, 2008.

HEYWOOD, R.; WELLS, G. a, A retinal dysplasia in the Beagle dog. **The Veterinary record**, 87(7), pp.178–80, 1970.

HOLLE, D.M.; STANKOVICS, M.E.; SARNA, C.S.; et al. The geographic form of retinal dysplasia in dogs is not always a congenital abnormality. **Veterinary ophthalmology**, 2(1), pp.61–66, 1999.

HUANG, Y.; CIDECIYAN, A.V.; PAPASTERGIOU, G.I.; et al. Relation of optical coherence tomography to microanatomy in normal and rd chickens. **Investigative ophthalmology & visual science**, 39(12), pp.2405–16, 1998.

LAHAV, M., ALBERT, D.M.; WYAND, S. Clinical and histopathologic classification of retinal dysplasia. **American journal of ophthalmology**, 75(4), pp.648–67, 1973.

LARATTA, L.J.; RIIS, R.C.; KERN, T.J.; et al. Multiple congenital ocular defects in the Akita dog. **The Cornell veterinarian**, 75(3), pp.381–92, 1985.

LAVACH, D.J., MURPHY, J.M.; SEVERIN, G.A. Retinal Dysplasia in the English Springer Spaniel. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 14, pp.192–199, 1978

LEWIS, D.G., KELLY, D.F.; SANSOM, J. Congenital microphthalmia and other developmental ocular anomalies in the Dobermann. **Journal of Small Animal Practice**, 27(9), pp.559–566, 1986.

LONG, S.E.; CRISPIN, S.M. Inheritance of multifocal retinal dysplasia in the golden retriever in the UK. **The Veterinary record**, 145(24), pp.702–4, 1999.

LOWE, R.C.; KING, M.C.A. Electroretinogram findings and retinal appearance in a confirmed case of ivermectin toxicity in a Lakeland Terrier, 2004. Disponível em: <<http://www.bravo.org.uk/secure/bravo%20abstracts%20luton%202004.pdf>>

Acesso em: 02/12/2012

- MACHEMER, R.; LAQUA, H. Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). 1975.
- MACMILLAN, A. Retinal Dysplasia in the Dog and **Cat. Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, 10(2), pp.411–5, 1980.
- MACMILLAN, A.D.; Lipton, D.E. Heritability of multifocal retinal dysplasia in American Cocker Spaniels. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(5), pp.568–72, 1978.
- MANN, I.C. Congenital retinal fold. **British Journal of Ophthalmology.**, 19(12), pp.641–58, 1935.
- MCKIBBIN, M.; ALI, M.; INGLEHEARN, C.; et al. Spectral domain optical coherence tomography imaging of the posterior segment of the eye in the retinal dysplasia and degeneration chicken, an animal model of inherited retinal degeneration. **Veterinary ophthalmology**, pp.1–7, 2013.
- MCLELLAN, G. In: PETERSEN-JONES, S.; CRISPIN, S. 2002. The canine fundus. In BSAVA, ed. **Manual of Small Animal Ophthalmology**. pp. 227–247.
- MCLELLAN, G.J.; RASMUSSEN, C. Optical coherence tomography for the evaluation of retinal and optic nerve morphology in animal subjects: practical considerations. **Veterinary ophthalmology**, 15 Suppl 2, pp.13–28, 2012.
- MEYERS, V.N.; JEZYK, P.F.; AGUIRRE, G.D. et al. Short-limbed dwarfism and ocular defects in the Samoyed dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 183(9), pp.975–9, 1983.
- MILLICHAMP, N.J. Retinal Dysplasia in the Dog. pp.1–3, 1985.
- MONTIANI-FERREIRA, F.; PETERSEN-JONES, S.; CASSOTIS, N. et al. Early postnatal development of central corneal thickness in dogs. **Veterinary ophthalmology**, 6(1), pp.19–22, 2003.

- NELSON, D.L.; MAC MILLAN, A.D. Multifocal retinal dysplasia in field trial Labrador Retrievers. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 19(3), pp.388–392, 1983.
- PAQUES, M.; GUYOMARD, J.L.; SIMONUTTI, M.; et al. Panretinal, high-resolution color photography of the mouse fundus. **Investigative ophthalmology & visual science**, 48(6), pp.2769–74, 2007.
- PEIFFER, R.L.L.; FISCHER, C.A. Microphthalmia, retinal dysplasia, and anterior segment dysgenesis in a litter of Doberman Pinschers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 183(8), pp.875–8, 1983.
- PFAHLER, S.; DISTL, O. Identification of quantitative trait loci (QTL) for canine hip dysplasia and canine elbow dysplasia in Bernese mountain dogs. **PloS one**, 7(11), p.e497-82, 2012.
- ROSOLEN, S.G.; RIVIÈRE, M.L.; LAVILLEGRAND, S. et al. Use of a combined slit-lamp SD-OCT to obtain anterior and posterior segment images in selected animal species. **Veterinary ophthalmology**, 15 Suppl 2, pp.105–15, 2012.
- RUBIN, L.F. Hereditary Retinal Detachment in Bedlington Terriers. **Small Animal Clinician**, 3, pp.387–389, 1963.
- RUBIN, L.F. Heredity of Retinal Dysplasia in Bedlington Terriers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 152(3), pp.260–282, 1968.
- SCHIAVO, D.M.; Field, W.E. Unilateral focal retinal dysplasia in beagle dogs. **Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC**, 69(1), pp.33–4, .., 1974.
- SCHMIDT, G.M.; ELLERSIECK, M.R.; WHEELER, C.A. et. al. Inheritance of retinal dysplasia in the English Spring Spaniel. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 174(10), pp.1089–90, 1979.
- SCHWEITZER, D.J., BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C. Retinal dysplasia and progressive atrophy in dogs irradiated during ocular development. **Radiation research**, 111(2), pp.340–53, 1987.

- SEE, A.W.-M.; CLAGETT-DAME, M. The temporal requirement for vitamin A in the developing eye: mechanism of action in optic fissure closure and new roles for the vitamin in regulating cell proliferation and adhesion in the embryonic retina. **Developmental biology**, 325(1), pp.94–105, 2009.
- SHIVELY, J.N. PHEMISTER, R.D.; EPLING, G.P. et al. Pathogenesis of radiation-induced retinal dysplasia. **Investigative ophthalmology**, 9(11), pp.888–900, 1970.
- SKAGEN, P.S.; HORN, T.; KRUSE, H.A, et al. Osteochondritis dissecans (OCD), an endoplasmic reticulum storage disease?: a morphological and molecular study of OCD fragments. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 21(6), pp.e17–33, 2011.
- STADES, F.C. Hereditary retinal dysplasia (RD) in a family of Yorkshire terriers. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, 103(20), pp.1087–90, 1978.
- TOOLE, D.O.; YOUNG, S.; SEVERIN, G.A. et al. Retinal Dysplasia of English Springer Spaniel Dogs: Light Microscopy of the Postnatal Lesions. **Veterinary Pathology**, 20(3), pp.298–311, 1983.
- WHITELEY, H.E. Dysplastic canine retinal morphogenesis. **Investigative ophthalmology & visual science**, 32(5), pp.1492–8, 1991.
- WHITELEY, H.E.; YOUNG, S. The external limiting membrane in developing normal and dysplastic canine retina. **Tissue & cell**, 18(2), pp.231–9, 1986.

## 4 CAPÍTULO 3 - ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA DISPLASIA DE RETINA HEREDITÁRIA EM CÃES DA RAÇA PIT BULL TERRIER

### *Histopathologic study of hereditary retinal dysplasia in Pit Bull Terriers*

#### 4.1 RESUMO

A displasia de retina (DR) é definida como a diferenciação anormal da retina em sua fase embrionária, sendo, portanto, uma doença congênita de origem hereditária ou adquirida. Histologicamente é caracterizada pela formação de dobras, rosetas e descolamento da retina. A histopatologia da DR já foi relatada em diversas raças de cães; contudo, este é o primeiro relato na raça Pit Bull Terrier. Este estudo objetivou descrever detalhadamente os achados histopatológicos da DR congênita hereditária em 11 cães da raça Pit Bull Terrier de diferentes idades afetados pela DR, diagnosticados pelo exame histopatológico, provenientes do plantel de um único criador. Após enucleação dos bulbos oculares, foi injetada solução de fixação em suas câmaras vítreas, sendo imersos em solução de fixação. Posteriormente, procedeu-se a secção dos mesmos, sendo encaminhados para processamento histotécnico de rotina, com inclusão do material em blocos de parafina, seguido da realização de cortes histológicos e colorações especiais para posterior avaliação em microscópio óptico. As principais lesões histológicas observadas foram dobras retinianas com padrão variável de desorganização da arquitetura da retina, rosetas de uma ou mais camadas, gliose e descolamento de retina. Os cães da raça Pit Bull Terrier com displasia de retina hereditária congênita apresentaram lesões oculares histológicas semelhantes àquelas previamente relatadas em outras raças caninas afetadas, com variações das alterações no mesmo cruzamento de cães. A natureza e a gravidade das alterações histológicas da DR variaram de acordo com a evolução da idade dos animais, evidenciando a importância da avaliação oftalmológica seriada de cães com suspeita de DR.

Palavras-chave: cães; doença congênita; dobras na retina; rosetas na retina; descolamento de retina

#### 4.1 ABSTRACT

Retinal Dysplasia (RD) is an abnormal differentiation of the retina during embryonal development. The disease is therefore congenital and can be either inherited or acquired. Histologically, it is characterized by folds, rosettes, and detachment of the retina. The histological findings of RD have been reported in various canine breeds; however, this is the first such report in Pit Bull Terriers. This study aimed to describe in detail the ocular histopathology of 11 Pit Bull Terriers at

different ages, affected by RD, diagnosed by the histopathologic exam. All of the dogs were from the same colony. After the enucleation of the ocular bulbs, was injected fixation solution in the vitreous camera, and after that eyeballs were immersed in the fixation solution. Posteriorly, were done the section of the eyeballs, being forwarded to a routine histotechnical process with inclusion of the material in paraffin blocks, following by histological cut of the samples and than special colorations were done for posterior evaluation in the optical microscopy. The main lesions observed were disorganization of the retinal architecture associated with retinal folds, rosettes of one or more layers, gliosis, and retinal detachment. The Pit Bull Terriers affected by congenital inherited RD had histological lesions similar to those described previously in other breeds affected by this disease, with variable lesions in the same crossbreed of dogs. The nature and severity of the histological findings of RD varied with advancing age, indicating the importance of serial ophthalmological evaluation of dogs suspected of being affected by RD.

Key words: dogs; congenital disease; retina folds; retinal rosettes; retinal detachment

#### 4.2 INTRODUÇÃO

A displasia de retina (DR) é a diferenciação anormal deste tecido com presença de proliferação celular desorganizada durante o seu desenvolvimento embrionário (AGUIRRE, 1973; GODEL; NEMET; LAZAR, 1981; WHITELEY, 1991, NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999; COOK, 1999). Trata-se de uma alteração congênita, podendo ser adquirida ou hereditária (BARNETT; BJORCK; KOCK, 1970; ALBERT et al., 1976; SCHWEITZER; BENJAMIN; LEE, 1987; WHITELEY, 1991; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999; GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004). Histologicamente, as características da DR variam com o estágio embriológico na qual ocorre a alteração, com a intensidade, gravidade e localização das lesões (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973). Em geral, DR é caracterizada por uma combinação de alterações morfológicas como formação de dobras e rosetas, gliose e descolamento parcial ou total da retina (BARNETT; BJORCK; KOCK, 1970; LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; O'TOOLE et al., 1983, SCHWEITZER; BENJAMIN; LEE, 1987; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999). Inicialmente as áreas displásicas se apresentam espessas, podendo progredir para atrofia focal da região acometida (MCLELLAN, 2002; GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004). As lesões podem ser bilaterais (GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004) ou unilaterais (HOLLE et al., 1999), sendo clinicamente classificadas como lesões focais, multifocais, geográficas ou totais (MACMILLAN; LIPTON, 1978; LAVACH; MURPHY; SEVERIN,

1978; O'TOOLE et al., 1983; COOK, 1999; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999; GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004; HOLLE et al., 1999). DR normalmente acomete as áreas temporais e nasais e comumente as lesões estão localizadas dorsalmente ao disco óptico. Contudo, a DR pode ser encontrada tanto na área tapetal como na não tapetal, bem como na periferia da retina (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; MACMILLAN; 1980; MCLELLAN, 2002; GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004).

A descrição de DR na raça Pit Bull Terrier é inédita. Devido à falta de informações sobre esta doença na literatura, objetivou-se neste estudo descrever os achados histopatológicos de DR em cães da raça Pit Bull Terrier em diferentes idades, provenientes de uma mesma colônia de cães. As características de hereditariedade, fenótipo e genótipo da DR nesta raça foram abordadas no Capítulo 2 desta tese.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados histologicamente 11 casos de displasia de retina (DR) do arquivo do Laboratório de Oftalmologia Comparada da Universidade Federal do Paraná (LABOC-UFPR), Curitiba, PR. Analizaram-se os bulbos oculares provenientes de cães da raça Pit Bull Terrier, pertencentes a diferentes ninhadas de uma mesma família, provenientes do mesmo criador residente na cidade de Curitiba, PR. O material avaliado foi coletado ao longo de seis anos de estudo, totalizando 22 bulbos oculares. Destes, 20 olhos foram obtidos de dez animais após óbito natural por diversas causas, não tendo sido realizada nenhuma eutanásia neste estudo. Adicionalmente, dois olhos foram obtidos de uma cadela afetada por DR que teve seus bulbos oculares esquerdo e direito enucleados em decorrência, à crise de glaucoma crônico secundário à uveíte facogênica e à atrofia do bulbo ocular.

As coletas dos bulbos oculares e o processamento do material histológico foram conduzidos segundo as normas da Comissão de Ética referente ao Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) da UFPR e de acordo às normas para experimentação animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

Os bulbos oculares foram coletados com intervalo de tempo variando entre 2 e 8 horas pós-óbito. Após coleta, em 16 olhos (animais 2.1-2.4 e 3.1-3.4) injetou-se 0,3 mL de formal a 10% na câmara vítrea, ao passo que em seis bulbos oculares (animais 1.1, 4.1, 4.2) foram injetados com 0,3 mL de solução de formol 10% misturado com glutaraldeído 6%. Em seguida, os bulbos oculares foram imersos nas soluções correspondentes. Após fixação, procedeu-se a secção dos mesmos, para então serem encaminhados para processamento histotécnico de rotina, com inclusão do material em blocos de parafina, realização de cortes histológicos e coloração para posterior avaliação em microscópio óptico. As colorações utilizadas foram Hematoxilina e Eosina de Harris, Tricrômico de Gomori, Tricrômico de Masson, Ácido Periódico-Schiff (PAS), Alcian Blue e PAS-Alcian Blue (PROPHET et al., 1992). Adicionalmente, em dois animais também se efetuou coloração imunoistoquímica para a *Proteína Ácida Fibrilar Glial* (GFAP) (Z0334; Dako Corporation, Carpinteria, CA, Estados Unidos) com o equipamento automatizado Leica Bond-Max™ (KONDO et al., 2012).

#### 4.4 RESULTADOS

Dos 11 cães afetados por DR incluídos neste estudo, quatro morreram com 24 horas de idade, dois com 21 dias de idade, um com quatro meses, e três entre um e três anos de idade. O animal probando não foi a óbito, porém teve seus bulbos oculares direito e esquerdo enucleados aos sete anos de idade, três anos após ter desenvolvido catarata bilateral e sete meses após ter sido submetido à facectomia unilateral direita. As causas das mortes foram gastroenterite hemorrágica por parvovirus canino, cinomose, insuficiência renal crônica e trauma. Todos os cães pertenciam à mesma colônia de cães, incluindo quatro da mesma ninhada (3.1-3.4). Cinco animais eram machos e seis eram fêmeas (Tabela 1). A colônia estudada era afetada por DR, apresentando a forma congênita e hereditária da doença, sendo a mesma condição e colônia estudada no Capítulo 2.

Na avaliação macroscópica dos bulbos oculares dos animais foram observadas alterações morfológicas predominantemente no segmento posterior do olho. Entre estas se destacaram projeções retinianas internas localizadas próximo

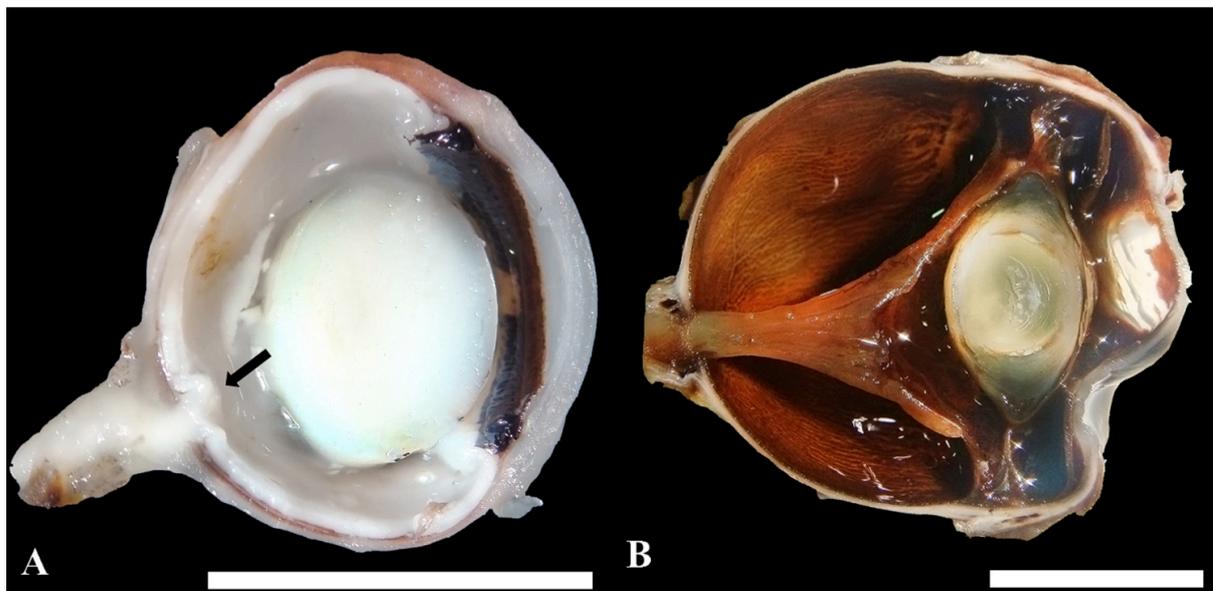
ao disco óptico (animais 2.3, 3.1, 3.2, 3.4) (Figura 1A) e resquício da artéria hialoide no olho esquerdo (animais 3.1 a 3.4). Descolamento total de retina em ambos os bulbos oculares, catarata madura bilateral, aumento do diâmetro axial do bulbo ocular esquerdo, aumento de volume da sua câmara vítrea e coloração alaranjada sugestiva de hemorragia intraocular, foram observados na cadela probanda de sete anos (1.1) (Figura 1B). O bulbo ocular direito do mesmo animal (1.1) apresentou, por sua vez, diminuição do diâmetro axial e de volume da câmara vítrea.

**Tabela 1** – Tabela correlacionando a geração de cada animal demonstrando o grau de parentesco entre eles, o sexo, a idade no momento da morte, a causa da morte e grau de gravidade das lesões retinianas em cães da raça Pit Bull Terrier com Displasia de Retina.

Animal	Geração	Sexo	Idade da morte	Causa da morte	Grau de displasia da retina
1.1	Mãe, probanda	F	--	--	Grave
2.1	1	M	2 anos	Cinomose	Grave
2.2	2	M	3 anos	Trauma*	Moderado
2.3	2	F	4 meses	Parvovirose	Grave
2.4	2	M	21 dias	Trauma**	Grave
3.1	3	M	24 horas	Trauma**	Grave
3.2	3	M	24 horas	Trauma**	Grave
3.3	3	F	24 horas	Trauma**	Leve
3.4	3	F	24 horas	Trauma**	Grave
4.1	4	F	21 dias	Trauma**	Moderado
4.2	4	F	1,5 ano	Insuficiência renal crônica	Leve

\*Trauma por briga com outro animal

\*\* Trauma por mordedura pela mãe



**Figura 1-** Aspecto macroscópico de bulbos oculares seccionados ao longo do eixo axial de dois cães da raça Pit Bull Terrier com displasia de retina. A – Olho esquerdo de um cão com 24 horas de idade (animal 3.2) apresentando projeções retinianas internas na base do disco óptico (seta). B – Olho esquerdo de uma cadela de sete anos de idade (animal 1.1) apresentando descolamento total de retina (aspecto em forma de asa de gaivota), catarata madura, aumento da câmara vítrea e aumento do diâmetro axial do bulbo ocular (indicativo de buphthalmia) e coloração alaranjada sugestiva de hemorragia intraocular.

Microscopicamente, os oito bulbos oculares dos animais com apenas 24 horas de idade apresentaram lesões restritas ao segmento posterior, sem evidência de alterações significativas nas estruturas do segmento anterior dos bulbos oculares. A retina encontrava-se na sua forma primitiva (embrionária), com dobras da camada neuroblástica externa, desorganização da porção externa da mesma, descontinuidade da membrana limitante externa (MLE) e descolamento parcial formando tubos incompletos com hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR) (Figura 2A). Em três casos (animais 3.1, 3.2, 3.4), as dobras apresentavam-se associadas a rosetas na camada neuroblástica externa da retina. Estas rosetas se caracterizavam por uma camada espessa de células neuroblásticas acondicionadas ao redor de um lúmen central (Figura 2B).

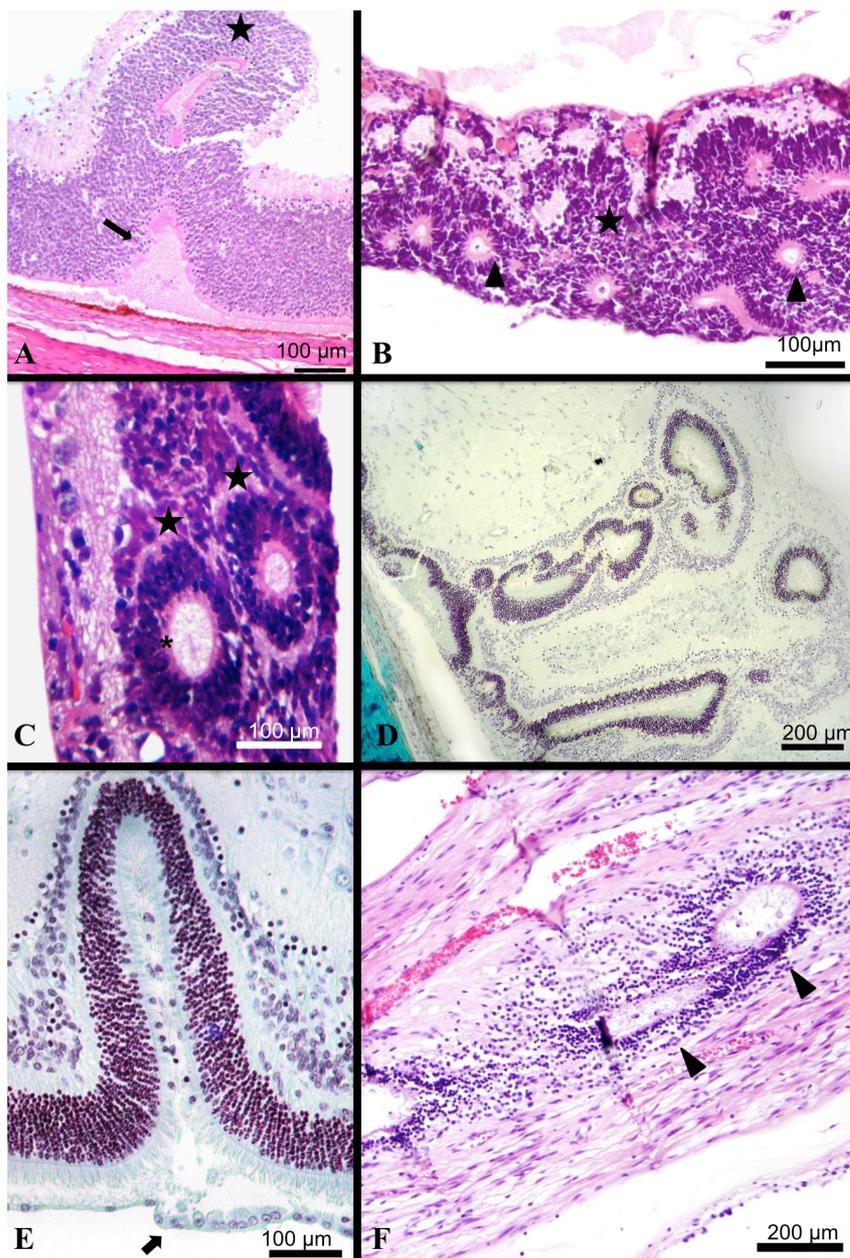
As principais formas clínicas de DR observadas foram a multifocal e a geográfica e a maioria das lesões observadas se encontrava nas regiões temporal e nasal da retina, dorsalmente ao disco óptico. Com exceção dos quatro neonatos com 24 horas de idade (animais 3.1 a 3.4), os cães deste estudo apresentavam diferenciação mais ou menos avançada das camadas da retina. Um cão com quatro meses (animal 2.3) e dois com 21 dias de idade (animais 2.4 e 4.1) apresentaram áreas com extensa desorganização da arquitetura da retina, associada a rosetas de

duas a três camadas, dobras e descolamento parcial de retina (Figuras 2C-E). No interior das rosetas foi possível observar a MLE envolta pela camada nuclear externa (CNE) (Figuras 2E). As dobras da retina estavam associadas à hipertrofia do EPR, indicando descolamento localizado da retina que eventualmente progrediu para descolamento da retina mais extenso (cl clinicamente evidente como descolamento focal).

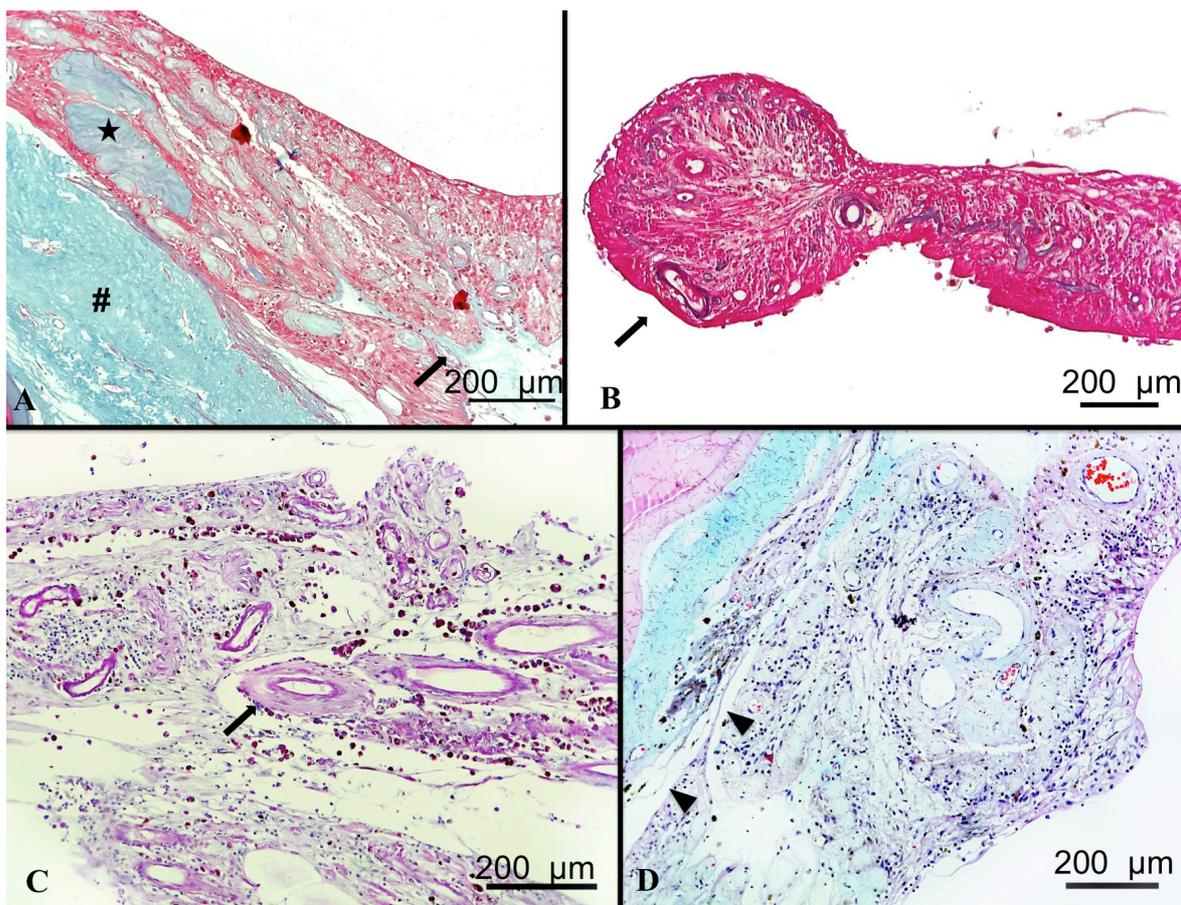
Nos oito bulbos oculares dos quatro animais adultos (animais 1.1, 2.1, 2.2, 4.2) foi possível observar descolamento multifocal de retina, com áreas de atrofia da camada plexiforme externa (CPE), e aparente fusão das camadas nucleares externa e interna. No animal 4.2, o descolamento localizava-se imediatamente adjacente ao disco óptico. Neste animal também se observou vasculopatia hipertensiva discreta na coróide, caracterizada por hialinização discreta da parede de alguns vasos da coróide conforme evidenciado pela coloração de PAS. O exame de necropsia revelou gastropatia urêmica associada à doença renal crônica caracterizada por glomerulonefrite proliferativa global difusa; mineralização da membrana basal de glomérulos, túbulos e artérias renais; proteinose tubular; e nefrite intersticial linfoplasmocitária. Além disto, o cão também apresentava pancreatite aguda discreta, pneumonia fibrinossupurativa e hemorrágica aguda (presumivelmente de origem bacteriana) e atrofia das glândulas da tireóide.

A cadela probanda de sete anos de idade (1.1) apresentou, em ambos os bulbos oculares, degeneração avançada da retina caracterizada por descolamento total e alterações vasculares, mais extensas no bulbo ocular direito. Os vasos retinianos alterados mantiveram seu diâmetro luminal e a sua parede espessada não corou com PAS, ao contrário do que se observa com vasculopatia hipertensiva. A matriz extracelular que causou o espessamento dos vasos retinianos esclerosados ficou melhor evidenciada pela coloração de Tricrômico de Masson. No olho direito esta coloração indicou deposição de colágeno também no corpo vítreo condensado entre a retina descolada e o cristalino degenerado (Figura 3A). A matriz perivascular extracelular na retina também corou fracamente com Alcian Blue, o que sugere que este espessamento decorreu, pelo menos em parte, pela infiltração do corpo vítreo no espaço perivascular (R. Dubielzig e L. Teixeira, comunicação pessoal) (Figura 3C). Uma das margens da retina descolada do olho direito se apresentava arredondada, indicando a ocorrência de ruptura (Figura 3B). Também havia algumas fendas na retina sugestivas de retinosquize (Figura 3D). Na retina do olho esquerdo havia,

ainda, estruturas retinianas semelhantes a rosetas próximo ao disco óptico (Figuras 2F), bem como infiltrado perivascular linfoplasmocitária mínimo na íris e entrópio focal da íris (*entropium uveae*), membrana fibrovascular pré-iridiana no olho esquerdo, descolamento total da retina com atrofia e gliose difusa grave em ambos os bulbos oculares, infiltrado perivascular e áreas de esclerose vascular, caracterizando o estágio avançado de degeneração da retina (Figura 4). Dispersos pelas estruturas internas de ambos os olhos havia alguns macrófagos ou com pigmento marrom-dourado globular característico de hemossiderina ou com eritrócitos fagocitados, indicando a ocorrência de hemorragia intraocular crônica contínua. Além disto, ambos os bulbos oculares apresentaram alterações degenerativas do cristalino (catarata) caracterizadas por metaplasia fibrosa e migração posterior das células epiteliais. No olho direito, o cristalino degenerado estava colapsado, consistindo, sobretudo, de cápsula envolta por material vítreo condensado rico em colágeno. A diminuição do diâmetro axial e de volume do bulbo ocular direito, ainda mais evidente histologicamente por um aspecto enrugado da membrana de Descemet, veio desacompanhada de desorganização e distorções consideráveis das estruturas intraoculares, caracterizando um quadro de *atrophia bulbi*.

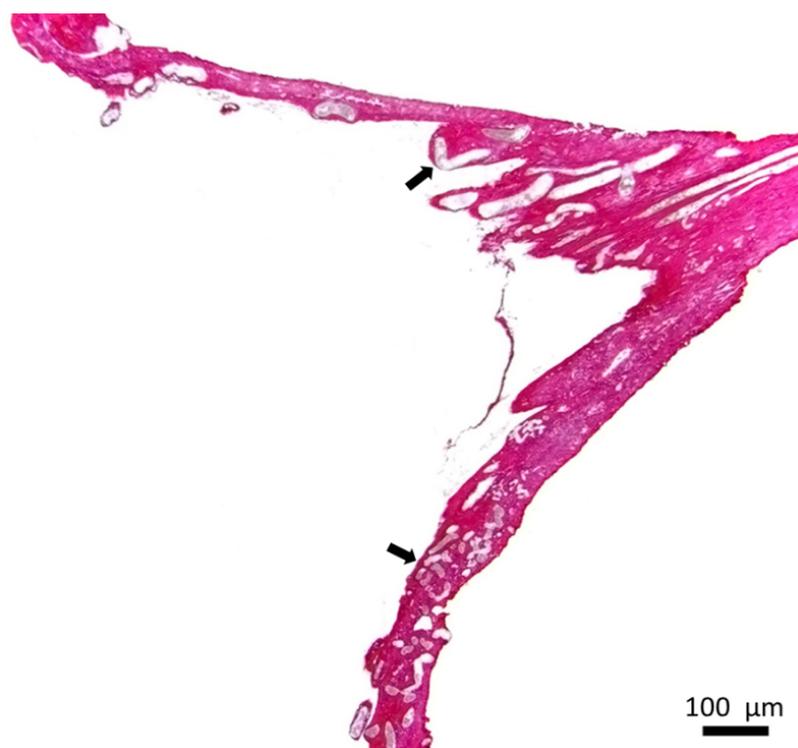


**Figura 2** - Fotomicrografias da retina de cães da raça Pit Bull Terrier com displasia de retina. A – Cão de 24 horas de idade (animal 3.2). Note a desorganização da camada neuroblástica externa com a formação de uma dobra (estrela). Observe descontinuidade da membrana limitante externa (seta) com descolamento parcial da retina na base da dobra (Hematoxilina e Eosina - H.E.) B – Cão de 24 horas de idade (animal 3.1). Note a intensa desorganização da retina primitiva (estrela), a qual apresenta diversas rosetas compostas por uma camada espessa de células neuroblásticas circundando um lúmen central delimitado pela membrana limitante externa (ponta de seta) (H.E.). C – Cão de 21 dias de idade (animal 2.4) com duas rosetas na retina displásica. Observe as camadas diferenciadas com desorganização das camadas nuclear e plexiforme internas formando as rosetas (estrela). No seu interior, está a membrana limitante externa envolta pela camada nuclear externa (asterisco) (H.E.). D – Cadela de quatro meses de idade (animal 2.3). Observe a desorganização das camadas retinianas com formação de dobras e rosetas complexas de três camadas (Tricrômico de Gomori). E – Mesmo animal que na Figura 2D, evidenciando uma dobra na retina com células no interior da dobra e adelgaçamento focal da camada nuclear externa, membrana plexiforme externa e camada nuclear interna. Note a hipertrofia segmentar do epitélio pigmentar da retina (seta) indicando descolamento localizado da retina sensorial (Tricrômico de Gomori). F – Cadela probanda de sete anos de idade (animal 1.1) com a forma crônica de displasia de retina. Note a atrofia e gliose reativa marcada da retina com a presença de estruturas semelhantes a rosetas (pontas de seta) próximas ao disco óptico (não visível na imagem) (H.E.).

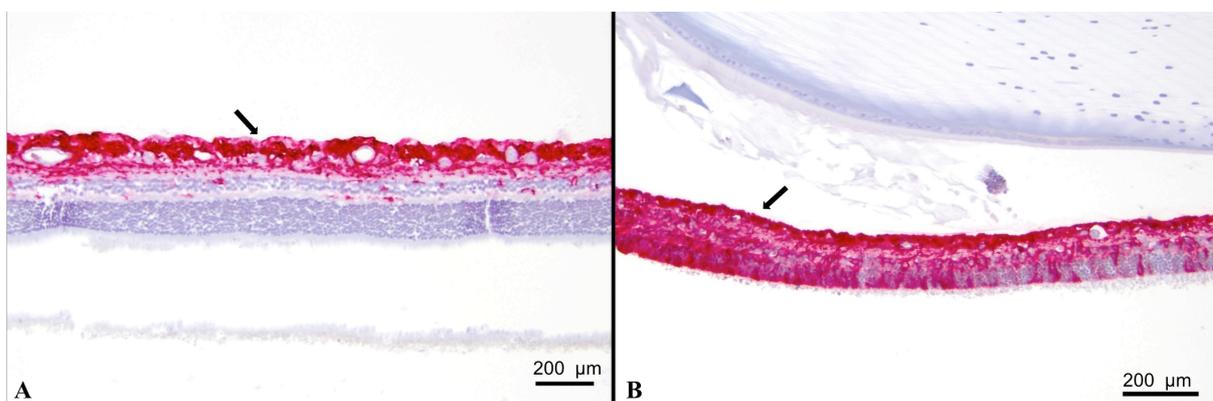


**Figura 3-** Fotomicrografia da retina do bulbo ocular direito de uma cadela da raça Pit Bull Terrier de sete anos (animal 1.1) com a forma crônica de displasia de retina. A – Note depósitos de colágeno (áreas de fibrose; estrela), que também pode ser encontrado ao redor de vasos sem provocar redução do diâmetro luminal vascular (seta). Observe ainda a intensa desorganização tecidual da retina e no canto inferior esquerdo note área extensa de corpo vítreo condensado rico em colágeno (*Hashtag*) (Tricrômico de Massom). B – Margem arredondada da retina indicativo de ruptura retiniana, com presença de vasos esclerosados (seta). C – Observe o espessamento anormal da parede vascular, corado levemente positivo para Alcian Blue e sem provocar redução do diâmetro luminal vascular (seta) (PAS Alcian Blue). D – Note a grande desorganização das camadas da retina, com presença de fendas sugestivas de retinosquize (cabeça de seta).

A coloração de GFAP realizada em dois cães da colônia (animais 1.1 e 4.2) revelou imunomarcção variavelmente aumentada indicando ativação das células de Müller (gliose) em decorrência da degeneração retiniana progressiva. No animal 1.1, a imunomarcção foi difusa e intensa em ambos os bulbos oculares (Figura 4). No animal 4.2, a periferia da retina, região mais afetada pela gliose (Figura 5), também continha alguns cistos.



**Figura 4** - Fotomicrografia da retina do bulbo ocular esquerdo de uma cadela da raça Pit Bull Terrier de sete anos (animal 1.1) com a forma crônica de displasia de retina. Note o descolamento da retina em forma de asa de gaivota e numerosos vasos esclerosados proeminentes (setas) na retina atrofiada com gliose difusa evidenciada pela imunomarcção difusa marcada para *Proteína Ácida Fibrilar Glial* (Cromógeno Vector Nova Red, Contracoloração Hematoxilina).



**Figura 5** - Fotomicrografia da retina de uma cadela da raça Pit Bull Terrier de um ano e meio de idade (animal 4.2). A – Área central da retina evidenciando imunomarcção para *Proteína Ácida Fibrilar Glial* (GFAP) levemente aumentada (seta). B – Região periférica apresentando imunomarcção mais intensa para GFAP (seta) indicativa de gliose reativa e, conseqüentemente, de degeneração retiniana mais avançada (Cromógeno Vector Nova Red, Contracoloração Hematoxilina).

#### 4.5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os cães da raça Pit Bull Terrier do presente estudo, afetados pela forma congênita da DR, eram decorrentes de diferentes cruzamentos provenientes da mesma colônia de cães. Isto sugere um possível caráter hereditário associado a esta doença. No capítulo 2 desta tese abrangemos o estudo fenotípico e o genotípico desta doença em Pit Bulls Terriers. Uma série de outros relatos de DR que descrevem as alterações histopatológicas em diversas espécies animais, em que esta doença está relacionada primariamente a alterações genéticas. (BARNETT; BJORCK; KOCK, 1970; WHITELEY, 1991; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999; GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004).

Nos cães, a diferenciação da região central da retina ocorre entre três a oito dias e a da região periférica da retina ocorre entre duas a três semanas após o nascimento, com continuação da diferenciação e maturação retiniana durante os primeiros 40 dias após o nascimento (MANN, 1927; MANN, 1928; AGUIRRE; RUBIN; BISTER, 1972; O'TOOLE et al., 1983; WHITELEY, 1991; COOK, 1999). Condizente com isso, nos animais que vieram a óbito após 24 horas do nascimento, observou-se uma retina primitiva, composta pelas camadas marginal e neuroblásticas externa e interna e pela membrana fibrosa de *Chievitz* (MANN, 1927; MANN, 1928; AGUIRRE; RUBIN; BISTER, 1972; O'TOOLE et al., 1983; WHITELEY, 1991; COOK, 1999). No entanto, apesar da imaturidade da retina nesta idade, já se notou claramente nos cães de 24 horas de idade diversas anormalidades na retina, como ao exame macroscópico as projeções retinianas na região do disco óptico e ao exame histopatológico a desorganização da arquitetura celular, com formação de tubos formando dobras e rosetas com o lúmen delineado por MLE parcialmente distinta e contínua. Tais alterações já haviam sido relatadas em neonatos da raça Springer Spaniel Inglês (O'TOOLE et al., 1983; WHITELEY, 1991).

Nos cães com menos de seis meses de idade, as lesões retinianas histológicas consistiram de extensas áreas de desorganização das camadas externas da retina, geralmente tanto com dobras quanto com rosetas. Contudo, alguns animais apresentaram apenas rosetas. Esta estrutura tem origem na retina primitiva e é resultante do crescimento exacerbado das células da camada interna da retina na cúpula óptica. (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973) Segundo Lahav et al.

(1973), a classificação das rosetas em DR varia histologicamente de acordo com o número de camadas envolvidas, sendo elas: 1) Rosetas de três camadas; 2) Rosetas de duas camadas; 3) Rosetas de uma única camada na retina madura e 4) Rosetas de uma única camada delgada de células da retina não diferenciadas. Nas rosetas classificadas como de três camadas, é possível observar a aparência madura da retina com completa diferenciação das várias camadas e formação subsequente de dobras. O lúmen destas rosetas é geralmente delimitado por uma estrutura que se assemelha à MLE (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999). Em rosetas de duas camadas, as células na camada mais interna se assemelham aos fotorreceptores com a MLE e na camada mais periférica as células ou são semelhantes às bipolares ou são células pouco diferenciadas. O interior do lúmen destas rosetas normalmente é amplo e contém células indiferenciadas (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; LAVACH; MURPHY; SEVERIN, 1978). A maioria dos casos deste estudo apresentava rosetas de três camadas associadas ao descolamento de retina. O descolamento de retina pode fazer com que as camadas da retina se dobrem, levando a sobreposição das mesmas. A formação de complexos de rosetas associados a dobras de retina corrobora com a classificação de Lahav et al. (1973). Contudo, em um bulbo ocular (animal 2.3), era possível observar a presença de células indiferenciadas no interior do lúmen de algumas rosetas. Rosetas de uma única camada na retina madura são, por sua vez, em um tipo, compostas por uma ou várias camadas de células neurais aglomeradas moderadamente diferenciadas. No interior do lúmen deste tipo de roseta é possível observar estrutura semelhante à MLE, células indiferenciadas e grânulos grandes de pigmento semelhantes aos do EPR (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; LAVACH; MURPHY; SEVERIN, 1978). Outro tipo de rosetas de uma única camada consiste ou de uma monocamada unicelular de células indiferenciadas em contato com o lúmen delineado por uma estrutura semelhante à MLE ou de um grupo de células arranjadas em círculo com fibrilas localizadas centralmente (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999). Nenhuma destas duas apresentações foi encontrada nos bulbos oculares avaliados neste estudo. Ao invés disto, nos animais que vieram à óbito após 24 horas de idade, observou-se rosetas localizadas na camada neuroblástica externa formadas por uma monocamada espessa de células neuroblásticas primitivas.

As dobras e as rosetas na retina dos animais deste estudo frequentemente se localizavam nas regiões temporal e nasal da retina, sendo também visualizadas dorsalmente ao disco óptico. Lesões também foram observadas em menor frequência na periferia da retina, como previamente descritas na literatura (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; SCHWEITZER; BENJAM MACMILLAN; 1980; MCLELLAN, 2002; GRAHN; STOREY; MCMILLAN, 2004). A atrofia retiniana observada nos animais adultos deste estudo pode estar associada à DR prévia (BARNETT; BJORCK; KOCK, 1970; O'TOOLE et al., 1983), pois ao longo do crescimento do animal e conseqüente crescimento fisiológico do bulbo ocular pode ocorrer o afinamento da retina nos locais das lesões (MACMILLAN; LIPTON, 1978; DUBIELZIG et al., 2010). A atrofia da camada plexiforme visualizada nos quatro animais adultos provavelmente foi resultado do descolamento focal da retina. Por sua vez, o deslocamento retiniano leva a diminuição abrupta do metabolismo da própria retina e comprometimento do suprimento sanguíneo da região, com gradual atrofia dos fotorreceptores (DUBIELZIG et al., 2010).

Nos casos com descolamento de retina se observou hipertrofia do EPR, confirmando o descolamento retiniano como patológico ao invés de simples artefato. A hipertrofia é uma resposta fisiológica do EPR ao descolamento da retina (MACHEMER; LAQUA, 1975; O'TOOLE et al., 1983; GELATT, 2007). O cão que apresentou descolamento de retina localizado imediatamente adjacente ao nervo óptico (animal 4.2) pode ter desenvolvido esta alteração ou em decorrência da DR hereditária, também observada nos demais integrantes da colônia de Pit Bull Terriers, ou em função da insuficiência renal crônica adquirida baseada na observação de vasculopatia hipertensiva discreta na coroide. Em nosso estudo, observamos que o cão de um ano e meio de idade (animal 4.2) apresentou gliose extensa, indicado pela marcação intensa e difusa para GFAP, principalmente na região periférica da retina. Complementarmente, em dois casos (animais 1.1 e 4.2) evidenciamos, por meio da coloração de Tricrômico de Masson, extensas áreas de fibrose e esclerose vascular na retina atrofiada. Estas alterações, mais graves na cadela de sete anos (animal 1.1), são características de lesões crônicas decorrentes da degeneração da retina após descolamento retiniano (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973; SCHWEITZER; BENJAMIN; LEE, 1987; LEWIS et al., 2010).

Em geral, a retina dos mamíferos contém diferentes tipos de células da glia: as células da macroglia (astrócitos e células de Müller) que dão suporte neural e as células da micróglia (LANGMANN, 2007). A formação de rosetas e a presença da displasia retiniana causam desorganização celular geral da retina (REESE E STRAATSMA, 1958; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999), além de diminuição da quantidade de células ganglionares e lesões das células da macroglia. A diminuição das células ganglionares e as lesões das células gliais levam a ativação difusa das células da retina podendo ser encontradas inclusive nas regiões retinianas não descoladas (JOACHIM et al., 2012). Em consequência disto ocorre ativação aumento da regulação dos fatores de transcrição das células da glia, em especial das células de Müller, resultando em sua proliferação e hipertrofia, levando a gliose e, por fim, cicatrização glial (LEWIS & FISHER, 2000; LEWIS et al., 2010). Esta resposta das células da glia é evidenciada pela imunomarcagem exacerbada da retina afetada para GFAP (BRINGMANN et al., 2006).

A esclerose vascular observada na retina em dois cães neste estudo (animais 1.1 e 4.2) se caracterizou pelo acúmulo de matriz extracelular na região perivascular, levando ao espessamento da parede vascular sem que tivesse havido alterações endoteliais nos vasos, que mantiveram sua patência. Esta matriz extracelular se corou pelas colorações de Tricrômico de Masson e PAS Alcian Blue, tal qual o corpo vítreo condensado em torno da retina atrofiada e descolada. Isto supostamente indica que o espessamento da parede vascular na retina possa ter sido consequência da infiltração do corpo vítreo no espaço perivascular em decorrência da menor resistência nesse local (R. Dubielzig e L. Teixeira, comunicação pessoal). Já em casos de hipertensão, ocorre variação do calibre dos vasos da retina e espessamento da parede das arteríolas com diminuição do seu diâmetro luminal. (DUBIELZIG et al., 2010) Observa-se ainda, nestes casos, depósitos sólidos e lamelares nas paredes dos vasos, os quais são positivos para PAS e associados com necrose fibrinoide, bem como destruição do EPR e hemorragia e proliferação neovascular retinianas (DUBIELZIG et al., 2010). Com exceção do cão 4.2, que apresentou alterações compatíveis com vasculopatia hipertensiva discreta na coroide, estas características de hipertensão não foram encontradas em nenhum dos outros casos de descolamento de retina. Portanto, consideramos improvável que a hipertensão tenha sido a etiologia dos descolamentos de retina geralmente observada neste estudo.

Na retina da cadela de sete anos de idade (animal 1.1) havia algumas fendas na retina sugestivas de retinosquize. Este achado comumente é consequência da aderência do corpo vítreo na retina que gera certa tração, culminando em ruptura das camadas externas da retina. A retinosquize pode apresentar duas diferentes formas: retinosquize tracional com e sem descolamento de retina (FAULBORN; ARDJOMAND, 2000; BYER, 2002). A retinosquize ocorre principalmente em animais senis, em animais portadores de diabetes e em pacientes que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos de pexias da retina, crioterapias e vitrectomias (FAULBORN; ARDJOMAND, 2000; BYER, 2002; DUBIELZIG et al., 2010). Acreditamos que as áreas suspeitas de retinosquize e rupturas observadas na retina em um animal em nosso estudo tenham se formado a partir da tração exercida na retina pelo corpo vítreo, que continha intensa degeneração e áreas de fibrose. Não foi possível determinar exatamente a camada retiniana acometida devido à intensa desorganização e degeneração da retina descolada. Contudo, normalmente a retinosquize envolve a camada plexiforme externa (FAULBORN; ARDJOMAND, 2000), mas pode eventualmente levar também a diminuição da quantidade de fotorreceptores e formação de cicatrizes glias subretiniais por células de Müller, o que pode afetar o tamanho da cavidade de esquize na retina (LUNA et al., 2009).

A DR está frequentemente associada a outras alterações oculares congênitas, tais como microftalmia (PEIFFER, 1983; BERGSJØ, 1984; LARATTA et al., 1985; LEWIS, 1986; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999), colobomas (GELATT, 1970), persistência do vítreo primário (PEIFFER, 1983; GRAHN, 2004) e catarata (ASHTON, 1968, COLLINS 1992; NARFSTRÖM; EKESTEN, 1999). Em nosso estudo não foram observadas nenhuma destas alterações, com exceção de um caso que apresentou catarata madura bilateral (animal 1.1). Esta alteração surgiu aos quatro anos de idade e culminou em uveíte facogênica, com posterior glaucoma secundário. Uma injúria e/ou lesões no tecido retiniano, como a DR, gera interrupção da reciclagem do retinol pelo EPR e alterações no metabolismo da retina, com liberação de citocinas levando a alteração no metabolismo lenticular e consequentemente a formação da catarata (LAHAV; ALBERT; WYAND, 1973, SCHWEITZER; BENJAMIN; LEE, 1987; DUBIELZIG et al., 2010). O glaucoma no olho esquerdo foi secundário a uveíte facogênica (PARK et al., 2009) e também ao descolamento de retina, ambos os quais podem ter levado a formação de uma membrana fibrovascular pré-iridiana resultando na obstrução do ângulo de

drenagem (PEIFFER; WILCOCK; YIN, 1990; DUBIELZIG et al., 2010; ZARFOSS et al., 2010). O desenvolvimento de *atrophia bulbi* no bulbo ocular contralateral do animal 1.1 é provável consequência da uveíte facogênica associada à uveíte pós operatória da facectomia realizada neste animal. As cirurgias de catarata comumente apresentam complicações como o aumento da pressão intraocular, uveítes, infecções intraoculares, hemorragia intraocular, descolamento de retina, glaucoma e cegueira (LEDBETTER; MILLICHAMP; DZIEZYC, 2004; PARK et al., 2009; KLEIN et al., 2011). A presença de um resquício da artéria hialóide em dois dos animais neonatos não deve ser considerada uma alteração patológica uma vez que esta artéria, cuja involução se inicia durante o período gestacional (aos 45 dias), ainda pode ser observada no primeiro dia de vida pós-natal até mesmo em animais completamente saudáveis (COOK, 1999).

A descrição do padrão de lesões da DR congênita hereditária na raça Pit Bull Terrier é inédita na literatura. Houve variação do padrão das lesões ao longo da vida dos animais afetados, o que demonstra a necessidade de avaliação oftalmológica seriada para que se compreenda melhor a evolução desta doença congênita. Portanto, este estudo fornece não apenas a caracterização macroscópica e histológica da displasia de retina em Pit Bull Terrier, mas também salienta a importância do acompanhamento do médico veterinário oftalmologista durante o processo de seleção e melhoramento animal.

### **Agradecimentos**

Aos estudantes de graduação e pós graduação (Gustavo Alburquerque, Camila Bollmann, Andreise Przydzimirski, Juliana Kravetz, Mariza Bortolini, Rafaelle Cristine Dea Gerez, Fernanda Cancelli, Christiane Montenegro, André Somma, Suelen Baldotto, Lucianne Leigue, Savia Caline, Leandro Lima) em medicina veterinária da UFPR que auxiliaram nos procedimentos e cuidados com os animais, ao Laboratório de Oftalmologia Comparada da *Michigan State University* pela parceria e auxílio na interpretação da histopatologia, e ao PDSE/CAPES pelo fomento concedido para realização desta pesquisa.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, G.D.; RUBIN, L.F.; BISTER, S.I. Development of the canine eye. **American Journal of Veterinary Research**. 33(12):2399-2414, 1972.

AGUIRRE G. Hereditary retinal diseases in small animals. **Veterinary Clinics of North America**. 3(3):515-528, 1973.

ALBERT, D.M.; LAHAV, M.; CARMICHAEL, L.E. et al. Canine herpes-induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. **Investigative Ophthalmology Vision and Science**. 15(4): p. 267-278, 1976.

ASHTON, N.; BARNETT, K.C.; SACHS, D.D. Retinal dysplasia in Sealyham Terrier. **Journal of Pathology & Bacteriology**. 96:269-272, 1968.

BARNETT, K.C.; BJORCK, G.R.; KOCK, E. Hereditary Retinal Dysplasia in the Labrador Retriever in England and Sweden. **J Small Anim Pract**. 10(12):755–759, 1969.

BERGSJØ, T.; ARNESEN, K.; HEIM, P. et al. Congenital blindness with ocular developmental anomalies, including retinal dysplasia, in Doberman Pinscher dogs. **J Am Vet Med Assoc**. 184(11):1383–6, 1984.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J. et al. A. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Prog Retin Eye Res**. 2006 Jul;25(4):397-424. Epub 2006 Jul 12.

COLLINS, B.K.; COLLIER, L.L.; JOHNSON, G.S. et al. Familial cataracts and concurrent ocular anomalies in chow chows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 200(10):485-91, 1992.

COOK, C.S. Ocular Embryology and Congenital Malformation. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Philadelphia: Blackwell Publishers, 1999.4 ed. cap 1.p. 3-30

DUBIELZIG, R.R.; KETRING, K.; MCLELLAN, G. et al. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review**. Philadelphia: Saunders; 2010. cap. 3, p. 29-53

FAULBORN J, ARDJOMAND N. Tractional retinoschisis in proliferative diabetic retinopathy: a histopathologic study. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. 238:40-44, 2000.

GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 4th ed. Philadelphia: Blackwell Publishers; 2007:1696

GODEL, V.; NEMET, P.; LAZAR, M. Retinal dysplasia. **Ophthalmol Doc.** 51(3):277–288, 1981.

GRAHN, B.H.; STOREY, E.S.; MCMILLAN, C. Inherited retinal dysplasia and persistent hyperplastic primary vitreous in Miniature Schnauzer dogs. **Veterinary Ophthalmology.** 7(3):51-158, 2004.

HOLLE, D.M.; STANKOVICS, M.E.; SARNA, C.S. et al. The geographic form of retinal dysplasia in dogs is not always a congenital abnormality. **Vet Ophthalmol.** 2(1):61–66, 1999.

JOACHIM, S.C.; GRAMLICH, O.W.; LASPAS, P. et al. Retinal ganglion cell loss is accompanied by antibody depositions and increased levels of microglia after immunization with retinal antigens. **PLoS One.** 7(7):406-16, 2012.

KLEIN, H.E.; KROHNE, S.G.; MOORE, G.E. et al. Postoperative complications and visual outcomes of phacoemulsification in 103\_dogs\_(179 eyes): 2006-2008. **Veterinary Ophthalmology.** 14(2):114-20, 2011.

KONDO, H.; LEONE, A.M.; ERLACHER-REID, C. et al. Medium-grade astrocytoma in a cougar (*Puma concolor*). **J Zoo Wildl Med.** 43(4):956-60, 2012.

LAHAV, M.; ALBERT, D.M.; WYAND, S. Clinical and histopathologic classification of retinal dysplasia. **Am J Ophthalmol.** 75(4):648–67, 1973.

LANGMANN. T. Microglia activation in retinal degeneration. **Journal of Leukocyte Biology.** 8, 1345–1351, 2007.

LARATTA, L.J.; RIIS, R.C.; KERN, T.J. et al. Multiple congenital ocular defects in the Akita dog. **Cornell Veterinary.** 75(3):381-92, 1985.

LAVACH, J.D.; MURPHY, J.M.; SEVERIN, G.A. Retinal Dysplasia in English Springer Spaniel. **Journal of the American Animal Hospital Association.** 14 (2):192-199, 1978.

LEDBETTER, E.C.; MILLICHAMP, N.J.; DZIEZYC, J. Microbial contamination of the anterior chamber during cataract\_phacoemulsification\_and intraocular lens implantation in dogs. **Veterinary Ophthalmology.** 7(5):327-34, 2004.

LEWIS, D.G.; KELLY, D.F.; SANSOM, J. Congenital microphthalmia and other developmental ocular anomalies in the Dobermann. **Journal of Small Animal Practice.** 27(9):559 – 566, 1986.

LEWIS, G.P.; FISHER, S.K. Müller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors. **Investigative Ophthalmology Vision Science.** 41(6):1542-5. 2000.

LEWIS, G.P.; CHAPIN, E.A.; LUNA, G. et al. The fate of Müller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation. **Mol Vis.** 15(16):1361-72, 2010.

LUNA, G.; KJELLSTROM, S.; VERARDO, M.R. et al. The effects of transient retinal detachment on cavity size and glial and neural remodeling in a mouse model of X-linked. **Investigative Ophthalmology Vision Science.** 50(8):3977-84, 2009.

MACHEMER, R., LAQUA, H. Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). **American Journal Ophthalmology**, 80(1):1-23, 1975.

MACMILLAN, A.D.; LIPTON, D.E. Heritability of multifocal retinal dysplasia in American Cocker Spaniels. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 172, (5):568-72, 1978.

MACMILLAN, A. Retinal Dysplasia in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, 10(2):411-415, 1980.

MANN, I.C. The Process of Retinal Differentiation in Man. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, 21(1):110, 1927.

MANN, I.C. The Process of Differentiation of the Retinal Layers in Vertebrates. **The British Journal of Ophthalmology**, 449-478, 1928.

MANN, I.C. Congenital Retinal Fold. **British Journal of Ophthalmology** 19(12): 641-58, 1935.

MCLELLAN, G. The canine fundus. In: \_\_\_\_\_. PETERSEN-JONES, S.; CRISPIN, S. **BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology**, 2002. 2ed., cap.14, 227-247,.

NARFSTRÖM, K.; EKESTEN, B. Disease of the Canine Ocular Fundus. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Philadelphia: Blackwell Publishers, 1999. 4 ed. cap 26, 869- 933

O'TOOLE, D.; YOUNG, S.; SEVERIN, G.A. et al. Retinal dysplasia of English springer spaniel dogs: light microscopy of the postnatal lesions. **Veterinary Pathology**, 20(3):298-31, 1983.

PARK, S.A.; YI, N.Y.; JEONG, M.B. et al. Clinical manifestations of cataracts in small breed dogs. **Veterinary Ophthalmology**. 12, (4)205-10, 2009.

PEIFFER, R.L.; JR, FISCHER, C.A. Microphthalmia, retinal dysplasia, and anterior segment dysgenesis in a litter of Doberman Pinschers. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 183(8):875-8, 1983.

PEIFFER, R.L. JR.; WILCOCK, B.P.; YIN, H. The pathogenesis and significance of pre-iridal fibrovascular membrane in domestic animals. **Veterinary Pathology**. 27(1):41-5, 1990.

PROPHET, E.B; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. In:\_\_\_\_. **Laboratory Methods in Histotechnology** (Armed Forces Institute of Pathology), 1992. p.279.

REESE, A.B; STRAATSMA, B.R. Retinal dysplasia. **American Journal Ophthalmology**. 45(4) Pt 2. 199-211, 1958.

SCHWEITZER, D.J.; BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C. Retinal dysplasia and progressive atrophy in dogs irradiated during ocular development. **Radiation Research**, 111, (2): 340-353, 1987.

ZARFOSS, M. K.; BREAUX, C. B.; WHITELEY, H. E. et al. Canine pre-iridal fibrovascular membranes: morphologic and immunohistochemical investigations. **Veterinary Ophthalmology**. 13(1):4-13, 2010.

WHITELEY, H.E. Dysplastic canine retinal morphogenesis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 32(5):1492-8, 1991.

## 5 CAPÍTULO 4 - O OLHO DA CORUJA-ORELHUDA: OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS, BIOMÉTRICAS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTES DE DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO.

### *The eye of the Striped owl: morphologic observations, biometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostics tests*

#### 5.1 RESUMO

Objetivou-se relatar características morfológicas do bulbo ocular e determinar valores de referência para testes oftálmicos selecionados em corujas-orelhudas (*Asio clamator*). Foram estudados 32 olhos de 16 corujas (*Asio clamator*), adultas e jovens, machos e fêmeas, de vida livre. Sendo compilados dados referentes a observações morfológicas do crânio, bulbo ocular e anexos, além de mensuração de testes oftálmicos, incluindo, Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), cultura da microbiota normal da conjuntiva, estesiometria, pressão intraocular (PIO), espessura de córnea central (ECC), diâmetro horizontal da rima palpebral, diâmetro horizontal da córnea e oftalmoscopia indireta. Vinte e dois tipos de bactérias foram identificadas em 12 corujas havendo predominância de microrganismos Gram-positivos. A média encontrada para o TLS foi de  $5,03 \pm 3,28$  mm/min, para o diâmetro horizontal da rima palpebral em 16 corujas foi  $21,24 \pm 1,17$  mm, e  $15,7 \pm 2,74$  mm para o diâmetro horizontal da córnea. O valor médio para o teste de estesiometria foi de  $0,80 \pm 0,59$  cm, a PIO média de  $13,81 \pm 5,62$  mmHg e ECC média de  $0,28 \pm 0,03$  cm. O estudo contribuiu para a caracterização da morfologia ocular e para o estabelecimento de valores de referências de testes diagnósticos oftálmicos em corujas-orelhudas, sendo necessário ainda o desenvolvimento de estudos complementares sobre histologia ocular desta espécie.

Palavras-chave: *Asio clamator*, teste lacrimal de Schirmer, espessura central da córnea, pressão intraocular, microbiota conjuntival normal, paquimetria ultrassônica, estesiometria, morfologia da órbita.

## 5.2 ABSTRACT

The investigation aimed to describe the most relevant morphological characteristics of the eyes of the striped owl (*Asio clamator*) and determine normal values for selected ophthalmic diagnostic tests. A total of 32 eyes of 16 young and adult free-ranging healthy striped owls, of both sexes, were investigated. Data of different morphological observations of the skull, eye globe and adnexa, clinical tests and parameters were collected, including: Schirmer Tear Test (STT), normal conjunctival bacterial microbiota, esthesiometry, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness (CCT), horizontal palpebral fissure length, horizontal, corneal diameter and funduscopy. Twenty two types of bacteria were identified in twelve owls; the most frequent bacteria were the Gram-positive. The mean value found for the STT was  $5.03 \pm 3.28$  mm/min; horizontal palpebral fissure lengths were  $21.24 \pm 1.17$  mm, and  $15.7 \pm 2.74$  mm for horizontal corneal diameter. The mean value for the esthesiometry was  $0.80 \pm 0.59$  cm, IOP was  $13.81 \pm 5.62$  mmHg and CCT was  $0.28 \pm 0.03$  cm. This study contributed to establish reference values for selected ophthalmic diagnostic tests in the striped owl, as well as, to morphologically characterize the eyeball of this species, in which it is still necessary to further characterize its histologic features.

Key words: *Asio clamator*, Schirmer tear test, normal microflora, esthesiometry, intraocular pressure, morphology of the skull, ultrasound pachymetry.

## 5.3 INTRODUÇÃO

A coruja (*Asio clamator*), também conhecida como coruja-orelhuda (SICK, 1993; NOVAES, 2011), é uma ave de rapina noturna pertencente à ordem dos Strigiformes que é subdividida em duas famílias: Titonidae (suindaras) e Estrigidae (corujas típicas) (AGILLAR, 2003; PEREIRA, 2007). A família Titonidae conta com um gênero composto por 16 espécies diferentes e 63 taxons. Por sua vez, a família

Estrigidae é composta por 25 gêneros com 189 espécies 548 taxons (AGILLAR, 2003).

As corujas estão distribuídas em diversos habitats no mundo (SANTOS, 1979; SICK, 1993; AGILLAR, 2003), exceto na Antártica, e são provavelmente originárias do Velho Mundo (SICK, 1993; AGUIAR; NAIFF, 2009). As corujas-orelhudas são encontradas na América do Sul, principalmente na Venezuela, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, tanto em áreas altamente arborizadas quanto em áreas urbanas (SICK, 1993; AGILLAR, 2003; SQUARZONI et al., 2010).

Os tamanhos das corujas de modo geral variam consideravelmente com a espécie (SICK, 1993), sendo que as corujas-orelhudas (*Asio clamator*) são relativamente grandes, apresentando aproximadamente 37 cm e pesando entre 320,00-546,00 g (SICK, 1993; SQUARZONI et al., 2010). Os indivíduos de ambos os sexos se parecem, sendo que às vezes as fêmeas são maiores que os machos. Uma peculiaridade das corujas é que a penugem natal destas aves é substituída por uma segunda geração de plumas assemelhando-se a uma lanugem (SICK, 1993).

As corujas-orelhudas (*Asio clamator*) se alimentam de roedores, marsupiais (gambás) e morcegos (SANTOS, 1979; SICK, 1993; AGILLAR, 2003), muitas vezes devorando a presa inteira sem limpá-la, e possuem ainda a capacidade de regurgitar alimentos inteiros, ou seja, pelotas de ossos de roedores maiores e de quirópteros. (SANTOS 1979; SICK, 1993; AGILLAR, 2003; PEREIRA, 2007). Sua maior atividade caçadora desenvolve-se no crepúsculo e no começo da noite até aproximadamente 21 horas, podendo haver alteração de acordo com a claridade da lua (SICK, 1993). Esta espécie animal apresenta um ouvido bem desenvolvido, com presença de um disco facial que possui a função de refletor sonoro, permitindo assim, que a coruja localize sua presa em movimento. Os ouvidos externos são assimétricos, fato este que parece colaborar, com a focalização, onde o lado esquerdo focaliza para baixo e o direito para cima. As penas que recobrem os ouvidos possuem uma estrutura rala peculiar, permitindo a penetração de som (SICK, 1993; AGILLAR, 2003). Nestas corujas, a capacidade visual aparentemente não é inferior à acústica destas aves (SICK, 1993).

Nas corujas em geral, os olhos apresentam características distintas, como olhos grandes localizados rostralmente, altamente expressivos, com campo visual limitado pela pouca mobilidade do bulbo ocular, fato este suprido pela alta mobilidade da cabeça, que pode girar em até aproximadamente 270°, para facilitar a visão, sendo ela uma cabeça larga e redonda (SANTOS 1979; SICK, 1993; AGILLAR, 2003). Os olhos destas aves apresentam formato semitubular devido à conformação do anel de ossículos esclerais, contínuo com a lâmina cartilaginosa da esclera. O olho da ave é relativamente grande em relação à cabeça do animal. Geralmente a coruja-orelhuda e as outras corujas apresentam excelente acomodação visual, em torno de 0,7-10 Dioptrias aproximadamente (GELATT, 1999), já que tanto a córnea quanto a lente podem modificar a curvatura ao focar. (KING, 1984; MURPHY, 1993; GELATT, 1999; MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2007). Sabe-se que as córneas das corujas apresentam a lamina limitante anterior (lâmina de Bowman) visível à microscopia. As retinas das corujas de modo geral são anangióticas, possuindo apenas uma fóvea e o pécten ocular, sendo capaz de responder a amplo espectro de cores, como o ultravioleta (KING, 1984; MURPHY, 1993; MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2007). Algumas investigações oftálmicas já foram realizadas em outras espécies de corujas como *Scheech-oriental (Megascops asio)* (HARRIS et al., 2008), macho galego (*Athene noctua*), bufo-real (*Bubo bubo*) (BAYÓN et al., 2006; JEONG et al., 2007). Na espécie *Asio clamator*, no entanto, apenas avaliações dos aspectos ultrassonográficos dos olhos destes animais foram realizadas (Squarzoni et al., 2010), sendo portando, necessários ainda mais estudos, principalmente de outros parâmetros biométricos e morfológicos dos seus olhos e valores de referência para testes de diagnóstico oftálmico desta espécie. Uma vez que a oftalmologia comparada tornou-se parte importante na oftalmologia veterinária, objetivou-se obter na presente investigação descritiva do órgão da visão, dados sobre as peculiaridades morfológicas, bem como fisiológicas do olho das corujas orelhudas, por meio de testes oftálmicos aqui selecionados, que poderão ajudar na interpretação e no diagnóstico de doenças oculares nessas aves.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

A nomenclatura utilizada nesta investigação, para a classificação da coruja-orelhuda (*Asio clamator*) e das outras espécies de aves mencionadas, foi a proposta pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) (NOVAES, 2011).

### 5.4.1 Preparo das peças anatômicas

Para o estudo morfológico da órbita óssea da espécie de coruja *Asio clamator*, objeto deste trabalho, foram utilizadas três cabeças de animais que vieram a óbito no Hospital Veterinário da Universidade do Contestado (UnC, Canoinhas, Brasil) e uma de um animal doado por um pesquisador (Dr. José Ricardo Pachaly, Unipar-PR). A técnica utilizada para o preparo dos ossos das cabeças foi maceração com larvas de moscas, a qual permite a completa remoção dos tecidos moles, preservando apenas as partes ósseas e as ranfotecas. Tal técnica é um método eficaz para a preservação de ossos delicados, pois evita danos que comumente ocorrem com o emprego de outras formas de osteotécnicas, como também em tentativas de dissecação com instrumental cirúrgico.

Após a remoção da pele e dos bulbos oculares, as cabeças foram colocadas em recipientes individuais e cobertas por tela de metal com aberturas hexagonais de cerca de 2 cm de diâmetro, em seguida, foram expostas ao tempo na intenção de haver a deposição de ovos de insetos dípteros, comumente atraídos por carcaças desprotegidas. O período de maceração variou de acordo com a quantidade de larvas que se desenvolveram e, neste estudo, variou de 5-7 dias. Após este período, as peças ósseas foram lavadas em água corrente e mergulhadas em peróxido de hidrogênio 50% para o seu clareamento, durante 24 horas. Em seguida as peças foram lavadas em água destilada, secas ao ar e montadas. Um adesivo comercial de éster de cianoacrilato foi utilizado para colar as partes ósseas, com exceção da mandíbula, a qual foi mantida livre. Os bulbos oculares foram preparados por dissecação com instrumental cirúrgico, a fim de se preservar a disposição natural dos ossículos esclerais. Logo após serem removidos da órbita, os bulbos foram minuciosamente dissecados para a remoção de tecidos moles como músculos extrínsecos oculares, fâscias, conjuntiva bulbar, camadas superficiais da esclera, córnea e componentes internos como íris, corpo ciliar, coroide, retina, corpo vítreo e

lente. Foram preservados apenas a lâmina cartilaginosa da esclera e o anel de ossículos esclerais. Especial atenção foi dada à preservação do osso sesamoide da esclera. Assim, a conformação óssea da órbita e os ossículos esclerais de quatro corujas adultas da espécie *Asio clamator* foi estudada a olho desarmado, como também sob magnificação de duas a quatro vezes por meio de lupa estereoscópica. Foram realizadas fotografias digitais do conjunto total dos ossos da cabeça, bem como de detalhes relativos à órbita e aos bulbos oculares.

#### 5.4.2 *Procedimentos oftálmicos e animais vivos*

Foram estudadas 16 corujas (*Asio clamator*), sendo que nove delas eram aparentemente adultas, três jovens e quatro não foram informadas as idades. Adicionalmente, dois filhotes de corujas, de aproximadamente um mês de idade também tiveram seus bulbos oculares examinados e documentados apenas com relação à morfologia. Do total foram avaliadas sete fêmeas; quatro machos e cinco animais cujo sexo não foi determinado. Os animais pesavam entre 485,00 e 625,00 g e foram selecionados aleatoriamente dos seguintes locais: Centro de Triagem de Animais Silvestres (Cetas, PUCPR/IBAMA), Tijucas do Sul, Brasil; Guira-Oga Centro de Recuperação e Reprodução de Animais da Selva Paranaense, Puerto Iguazú, Argentina; Zoológico Roberto Ribas Lange, Criadouro de Animais Silvestres e Hospital Veterinário da ITAIPU, Foz do Iguaçu, Brasil; e do Parque Ecológico Ouro Fino, Campo Largo, Brasil.

O experimento foi integralmente baseado nos critérios preconizados pelas “Normas para uso de animais em pesquisas oftalmológicas” da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Objetivando excluir possíveis alterações sistêmicas, todos os animais foram submetidos à exame físico, seguido de exame oftálmico. Os testes oftálmicos foram realizados por diferentes avaliadores, porém, para evitar discrepância de resultados, o mesmo avaliador que realizou um determinado teste, passou a sempre fazê-lo durante toda a investigação.

#### 5.4.3 *Exames oftálmicos*

Para a contenção física, utilizaram-se luvas de couro, que auxiliaram na contenção dos membros pélvicos. As asas foram então recolhidas e seguradas com

a mesma mão que continha os membros pélvicos, para evitar fraturas em qualquer seguimento dos membros ou quebra das penas, gerando o mínimo de estresse possível para o animal durante os procedimentos. Cada ave foi então mantida na posição vertical, com a cabeça estabilizada por contenção manual da extremidade do bico e tomou-se cuidado para não realizar compressão sobre a região cervical.

Após contenção, as aves foram submetidas a exame oftálmico, que incluía uso do transiluminador de Finoff, biomicroscopia com lâmpada de fenda (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, França.), teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Teste da Lágrima de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.), coleta de material para cultura e análise bacteriológica, estesiometria (Cochet-Bonnet, Luneau Ophthalmologie, Chartres Cedex, França.), documentação fotográfica digital (Máquina fotográfica, Sony Cybershot, DSC- T700, Câmera Digital com 3x Zoom Óptico.), tonometria de aplanção (Tonopen XL, Mentor Medical Systems, Estados Unidos.), medida da espessura central de córnea (Paquímetro ultrassônico, Micropach® Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY, Estados Unidos.), mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral e do diâmetro horizontal da córnea (paquímetro de aço inoxidável) (Paquímetro de aço inoxidável, Neiko Tools, Klamath Falls, Oregon, Estados Unidos.) e fundoscopia (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, França).

#### 5.4.3.1 Inspeção ocular

Utilizando iluminação direta com auxílio de um transiluminador de Finoff e biomicroscópio com lâmpada de fenda, procedeu-se a inspeção do segmento anterior de 32 olhos de 16 corujas (*Asio clamator*). Um olho foi excluído da pesquisa, por apresentar alterações oftálmicas, totalizando então 31 olhos estudados.

#### 5.4.3.2 Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)

Posteriormente, procedeu-se o exame lacrimal, por meio do Teste Lacrimal de Schirmer tipo 1 (TLS) (Figura 1A) em 31 olhos das 16 corujas, sem instilação de colírio anestésico para minimizar qualquer influência sobre os resultados. Este teste mensurou a produção basal e parte da produção reflexa da fração aquosa do filme lacrimal, sendo utilizadas tiras milimetradas e padronizadas de papel estéril de TLS para sua realização. As fitas foram acondicionadas individualmente no interior do

saco conjuntival até o fórnice inferior de ambos os olhos, durante o período de um minuto.

#### 5.4.3.3 Análise microbiológica

Para análise da microbiota ocular de avaliou-se 12 corujas realizando gentil fricção de zaragatoa na conjuntiva palpebral e fórnice conjuntival inferior de cada olho e na superfície ocular (córnea e conjuntiva bulbar) (Figura 1B), de forma asséptica, perfazendo um total de 23 olhos (amostras) de 12 corujas. Tomou-se o devido cuidado para que a zaragatoa não tocasse as filoplumas e a margem palpebral, tentando assim evitar ao máximo a contaminação externa. Não foi administrado anestésico tópico, pois a utilização deste fármaco poderia interferir no crescimento de micro-organismos (MULLIN; RUBINFELD, 1997). Em seguida, as zaragatoas foram acondicionadas em meio de transporte de Stuart e armazenadas sob refrigeração para, posteriormente, serem enviadas ao laboratório de microbiologia. As culturas dos micro-organismos foram realizadas em placas com meio BHI (*brain-heart infusion*), Agar sangue de carneiro 5% e MacConkey, as quais permaneceram incubadas a 37°C em ambiente aeróbico durante 24 a 48 horas. Em suma, a metodologia para análise microbiológica empregada nesta pesquisa foi a mesma de outras pesquisas realizadas em outras espécies animais para o estabelecimento da microbiota conjuntival (PINARD et al., 2002; MONTIANI-FERREIRA et al., 2006; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008a; LIMA et al., 2010). As colônias bacterianas obtidas foram identificadas por coloração de Gram e procedimentos padrão de avaliação.

#### 5.4.3.4 Estesiometria

A sensibilidade da córnea de 27 olhos de 14 corujas foi mensurada, utilizando o estesiômetro de Cochet-Bonnet (Figura 1C). O equipamento é composto por um monofilamento de náilon com diâmetro pré-definido, e comprimento ajustável. Para a mensuração, tocou-se suavemente o monofilamento de náilon, na superfície central da córnea, regulando o comprimento do fio, deixando-o mais curto, até se obter uma resposta (ato de piscar) da ave.

#### 5.4.3.5 Pressão intraocular (PIO)

A pressão intraocular de 31 olhos de 16 corujas foi mensurada com auxílio do tonômetro de aplanção (Figura 1D), posicionando-o perpendicularmente à córnea e tocando-a suavemente. O resultado final obtido representa uma média de três mensurações, com erro máximo de 5%, entre as mensurações consecutivas. Nesta etapa do estudo, o avaliador preocupou-se em não realizar qualquer forma de pressão na região cervical dos animais, evitando assim possível alteração na mensuração final da PIO.



**Figura.1** - Os testes oculares realizados nos olhos das corujas-orelhudas. (A) Teste lacrimal de Schirmer. (B) Coleta de amostra da microbiota da conjuntiva e córnea. (C) Análise estesiométrica da córnea central. (D) Mensuração da PIO.

#### 5.4.3.6 Diâmetro horizontal da rima palpebral e diâmetro horizontal da córnea

As mensurações do diâmetro horizontal da rima palpebral e do diâmetro horizontal da córnea foram realizadas utilizando-se paquímetro de aço inoxidável

com visor de LCD e precisão de +/- 0,02 mm, em 31 olhos de 16 corujas (*Asio clamator*).

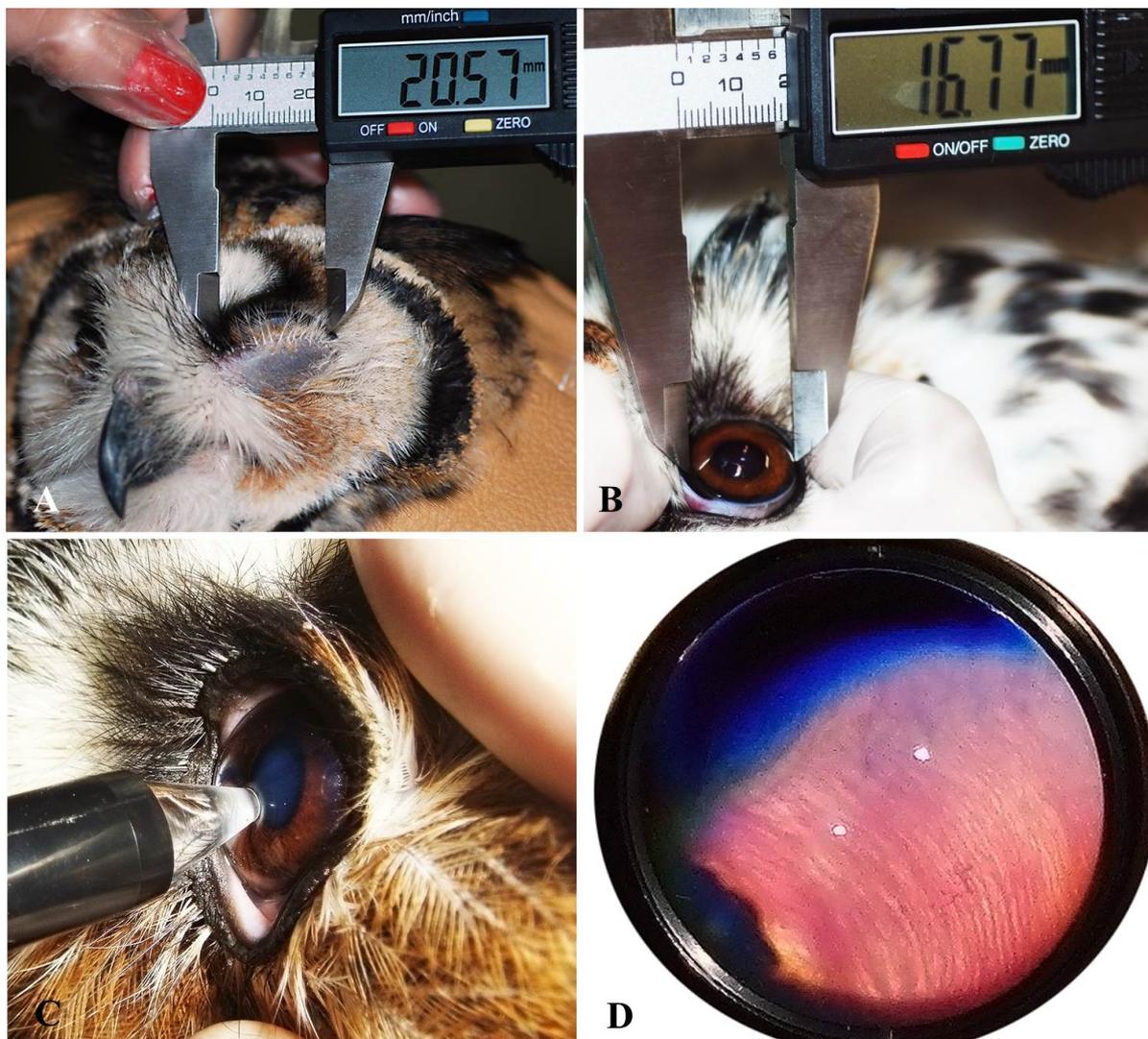
Para a mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral uma das extremidades do paquímetro foi posicionada sobre o vértice do ângulo medial do olho e, a outra extremidade, sobre o vértice do ângulo lateral. Já para a aferição do diâmetro horizontal da córnea, ambas as extremidades do paquímetro foram posicionadas sobre o limbo da córnea (Figura 2A e B).

#### 5.4.3.7 Paquimetria central de córnea

A espessura central da córnea (ECC) foi mensurada em 28 olhos de 14 corujas, utilizando-se um paquímetro ultrassônico, que apresenta a velocidade de som na córnea pré-estabelecida em 1640 m/s (Figura 2C). Previamente ao exame, instilou-se um colírio anestésico tópico estéril à base de cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% (Colírio Anestésico, Allergan, São Paulo, Brasil.).

#### 5.4.3.8 Fundoscopia

Os fundos dos olhos de cinco corujas foram examinados por meio de uma lente de 20 dioptrias e um transiluminador de Finoff (Figura 2D). As fotografias foram obtidas por meio do biomicroscópio com lâmpada de fenda adaptado a um sistema de fotografia digital.



**Figura. 2** - Os testes oculares realizados nos olhos de corujas-orelhudas. (A) Mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral. (B) Mensuração do diâmetro horizontal da córnea. (C) Paquimetria de córnea. (D) Oftalmoscopia indireta com lente de 20 dioptrias.

#### 5.4.3.9 Análise estatística

Foi realizada análise de estatística descritiva, Teste-*t* quando houve comparação entre dois grupos (comparando olhos direitos e esquerdos ou animais machos e fêmeas) de dados contínuos numéricos (dados biométricos), Teste Exato de Fisher (para comparação de proporções) e Teste de Correlação de Bartlett (para comparar correlações das variáveis contínuas numéricas) utilizando o software JMP, versão 5.0.1 (Software JMP, versão 5.0.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos). Os dados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados significativos quando o valor de  $P < 0,05$ .

## 5.5 RESULTADOS

Os resultados numéricos obtidos para todos os testes oftálmicos utilizados nos animais desta pesquisa apresentaram uma distribuição normal, uma vez que os erros dos dados apresentaram distribuição normal de acordo com o Teste Shapiro-Wilk. A Tabela 1 contém os resultados das análises estatísticas descritivas dos testes oftálmicos.

**Tabela 1-** Quantidade de animais e olhos avaliados com os respectivos resultados estatísticos, obtidos para os diferentes testes de diagnóstico oftalmológicos em olho de corujas (*Asio clamator*).

Exames	Nº de corujas	Nº de olhos	Média	Mediana	Desv Pad*	CV**.
Teste Lacrimal de Schirmer (mm/min)	16	30	5,03	5,00	3,29	0,65
Estesiometria (cm)	14	27	0,81	0,50	0,59	0,73
Diâmetro horizontal da rima palpebral (mm)	16	31	21,25	21,15	1,18	0,06
Diâmetro horizontal da córnea (mm)	16	31	15,76	16,50	2,74	0,17
Espessura da córnea central (mm)	13	26	0,29	0,29	0,03	0,11
Pressão intraocular (mmHg)	16	31	13,81	13,00	5,63	0,41

DesvPad\* = Desvio padrão; CV\*\* = Coeficiente de variação; Nº = Número; (mm/min) = milímetro por minuto; (mm) = milímetro; (mmHg) = milímetros de mercúrio.

### 5.5.1 Aspectos morfológicos da órbita óssea e da túnica fibrosa do bulbo ocular

Foi possível observar que, devido à forma tubular do bulbo ocular, os ossículos esclerais desta espécie apresentam forma retangular e côncava, com o eixo mais longo direcionado no sentido anteroposterior. A largura dos ossículos é nitidamente variável (Figura 3D). Dentre os quatro animais analisados, dois animais (50%) apresentavam 16 ossículos esclerais em ambos os olhos, um animal (25%) apresentava 15 em ambos os olhos e, por fim, um animal (25%) apresentava apenas 15 no olho direito (OD) e 16 no olho esquerdo (OE). Neste último, o ossículo escleral supranumerário se apresentava mais curto que os demais e intercalado entre dois ossículos bem desenvolvidos, de modo que a sua extremidade anterior não participava da margem anterior do anel de ossículos esclerais, voltada limbo da córnea. Já a extremidade posterior deste ossículo participava da margem posterior

do anel de ossículos esclerais, aquela contínua com a lâmina cartilaginosa da esclera e que denuncia o equador do bulbo ocular destes animais (Figura 3D). O osso sesamoide da esclera foi observado no aspecto ventral de todos os anéis de ossículos esclerais (Figura 3D).

A órbita óssea das corujas-orelhudas apresentou um curto processo supraorbital (Figura 3B, C), dirigido lateral e caudalmente, que se projeta do terço médio da margem supraorbital (Figura 3A-C), constituída pelo osso frontal. Tal processo provê área de fixação para a larga fáscia orbital, a qual tem papel na contenção do bulbo na órbita.

O processo pós-orbital (Figura 3B, C) é bem desenvolvido. Trata-se de um processo longo, largo e côncavo na sua face orbital. Projeta-se lateral e ventralmente da parte lateral da margem orbital, que em strigiformes é formada pelo osso frontal, de modo a acompanhar a curvatura da parte lateral do polo posterior do bulbo ocular. O processo pós-orbital constitui o limite lateral da cavidade orbital destas aves.

O septo interorbital (Figura 3C) é reduzido um tanto espesso e sendo constituído principalmente pelo osso mesetmoide, o qual abrange a parte rostral da parede medial da órbita. Não apresenta fontículos interorbitais, sendo, portanto, inteiramente ósseo. Em seu aspecto dorsal está localizado o sulco do nervo olfatório (I) (Figura 3C). Rostralmente, fundido ao osso mesetmoide, o osso ectetmoide (Figura 3C) contribui para a formação da parede rostral da órbita juntamente com o osso lacrimal (Figura 3B, C), localizado lateralmente a este. Entretanto apesar de relacionados, estes dois ossos não são fundidos e acabam por constituir uma parede rostral descontínua. A característica mais marcante do osso ectetmoide é um processo que se projeta em direção ventrolateral, o processo do ectetmoide (Figura 3B, C). Em similaridade com o processo pós-orbital, o processo do ectetmoide é côncavo em sua face orbital e acompanha o contorno do bulbo ocular, mas no quadrante ventromedial da órbita. Sua extremidade livre está voltada para a extremidade livre do processo pós-orbital, de modo que o espaço entre as extremidades livres dos dois processos e o espaço entre estes e a parede medial da órbita constituem um assoalho orbital ósseo descontínuo, fechado basicamente por músculos relacionados à mandíbula e, no estado macerado, invadido pelo processo orbital do osso quadrado (Figura 3C).

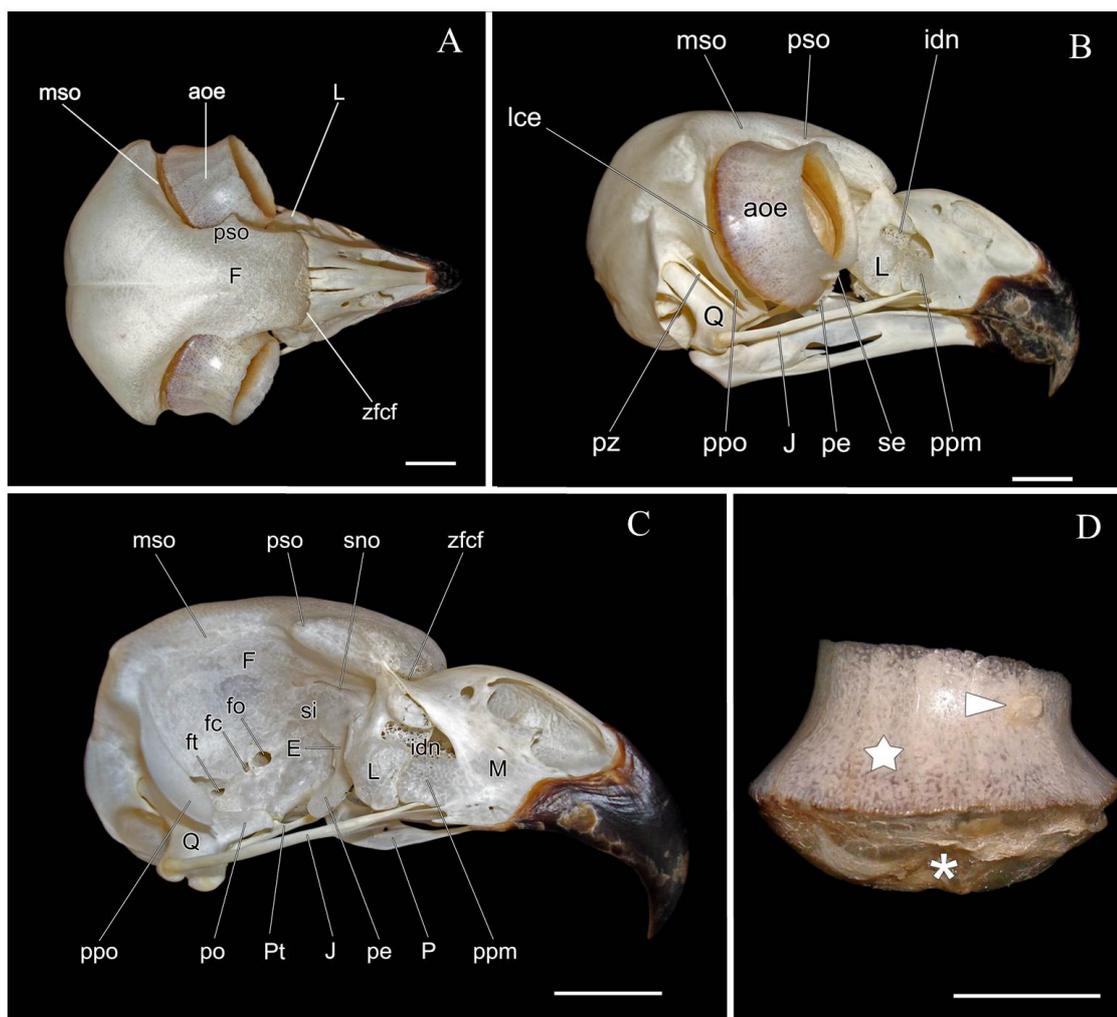
O osso lacrimal (Figura 3A-C) é muito desenvolvido e constitui grande parte da parede rostral da órbita. Está articulado ao osso frontal e amplamente à maxila, desde a região da zona flexora craniofacial (Figura 3A, C), dorsalmente, se estendendo ventralmente até muito próximo ao osso jugal (Figura 3B, C); rostral e ventralmente mantém amplo contato com o desenvolvido e bulboso processo palatino da maxila (Figura 3B, C). Apresenta formato irregular, contornos rombos e delicadas trabéculas ósseas que lhe conferem um aspecto esponjoso, perceptíveis em seu interior através de suas paredes finas e, em algumas partes, fenestradas. O osso lacrimal não apresenta processo supraorbital (este está presente no osso frontal) e é sulcado lateralmente pela incisura do ducto nasolacrimal (Figura 3B, C) que se continua na maxila e se abre na cavidade medial.

Três forames são facilmente perceptíveis no fundo da órbita. O maior e mais rostral corresponde ao forame óptico, enquanto que os outros dois menores e mais caudais e ventrais, correspondem ao forame comum para os nervos oculomotor (III), troclear (IV), abducente (VI) e ao forame do nervo trigêmeo (V) (Figura 3C), o mais caudal e ventral do conjunto.

### 5.5.2 Observações gerais nos animais vivos

Todos os 16 animais submetidos ao exame físico apresentavam-se em boas condições de saúde. Ao exame oftálmico, somente um paciente apresentou luxação de lente unilateral, com edema de córnea no bulbo ocular direito, sendo este olho excluído da pesquisa. Destes 16 animais, sete (43,75%) eram fêmeas, quatro (25,00%) eram machos e cinco (31,25%) não foram sexados. Nesta pesquisa, nove (56,25%) eram adultos, três (18,75%) jovens, quatro (25%) dos animais não foram classificados, pois eram de vida livre. Portanto, 12 animais foram classificados apenas em adultos ou em jovens, não sendo possível calcular a média da idade da população dos animais avaliados.

O peso médio encontrado foi  $510,00 \pm 50,00$  g. Foi observado que as fêmeas eram significativamente mais pesadas que os machos, apresentando peso médio de  $510,00 \pm 51,75$  g e os machos  $490,00 \pm 68,50$  g,  $P = < 0001$ . Contudo, não houve diferença significativa entre idade aproximada e peso médio dos animais ( $P = 0,52$ ).



**Figura 3** - Elementos ósseos do esqueleto da cabeça de uma coruja-orelhuda (*Asio clamator*) adulta. (A) Aspecto dorsal. (B) Aspecto lateral direito. (C) Aspecto rostrolateral direito. A mandíbula e o anel de ossículos esclerais foram removidos. (D) Aspecto ventral do bulbo ocular direito após remoção dos tecidos moles. Notar a forma tubular do anel de ossículos esclerais (estrela) e como os ossículos laterais são mais longos em comparação aos mediais; o sesamoide da esclera (cabeça de seta) localizado anterior e medialmente, próximo à margem anterior do anel de ossículos esclerais, margem que correspondente à região do limbo da córnea no vivo; e a lâmina cartilaginosa da esclera (asterisco), fixa à margem posterior do anel de ossículos, em forma de cúpula. Legenda: aoe, anel de ossículos esclerais esquerdo; osso frontal (F); osso lacrimal (L); margem supraorbital (mso); zona flexora craniofacial (zfcf); processo supraorbital (pso); incisura do ducto nasolacrimal (idn); osso jugal (J); lâmina cartilaginosa da esclera (lce); processo do osso ectetmoide (pe); processo palatino da maxila (ppm); processo pós-orbital (ppo); processo zigomático (pz); osso sesamoide da esclera (se). (E) osso ectetmoide; forame comum para os nervos oculomotor III (fc), troclear IV e abducente VI; forame óptico (fo); forame do nervo trigêmeo V (ft); maxila (M); osso palatino (P); processo orbital do osso quadrado (po); osso pterigoide (Pt); osso quadrado (Q); septo interorbital, osso mesetmoide (si); sulco do nervo olfatório (sno). Barra = 1cm.

### 5.5.3 Observações da morfologia ocular externa em animais vivos

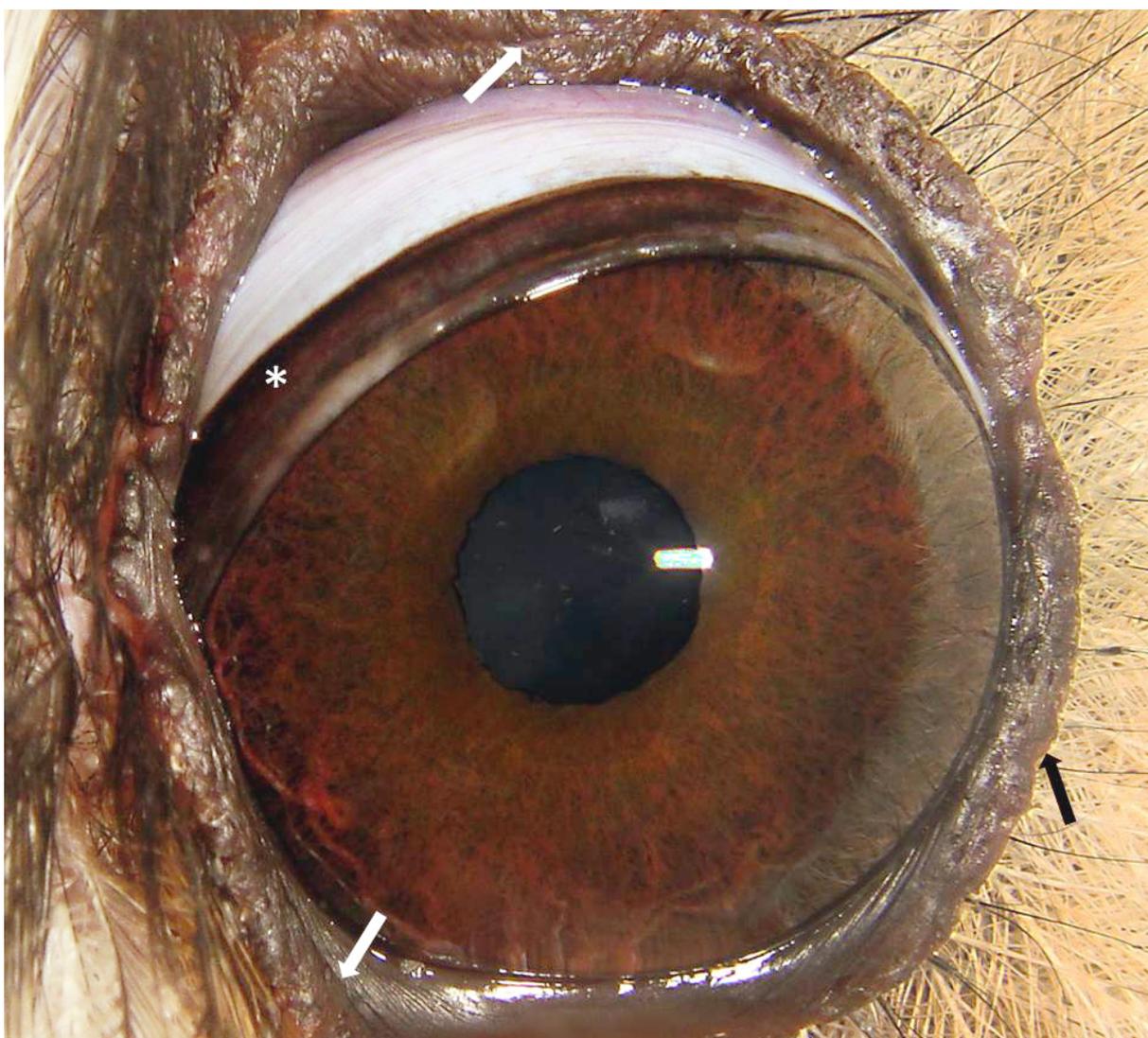
Externamente, é facilmente perceptível que os olhos de coruja *Asio clamator* são voltados rostralmente. As pálpebras são relativamente finas e móveis, sendo que a inferior é maior que a superior. A pálpebra inferior apresenta, na maior parte

do tempo, maior mobilidade quando comparada com a superior. Contudo, foi observado que em algumas situações a pálpebra superior movimentava-se com maior intensidade. O ângulo lateral do olho é maior do que o ângulo medial e a abertura total da rima palpebral é relativamente larga quando comparada ao diâmetro da córnea e ao tamanho do bulbo ocular. A margem palpebral é pigmentada, irregular e apresenta um desnível em “degrau” entre os limbos palpebrais anterior e o posterior. Há delicadas filoplumas (cílios modificados) em ambas as pálpebras (Figura 4). Dois pontos lacrimais, um superior e outro inferior, estão presentes na margem das respectivas pálpebras, na região do ângulo medial de ambos os olhos.



**Figura 4** - Imagem lateral do olho de uma coruja *Asio clamator*, evidenciando filoplumas em ambas as pálpebras, superior quanto inferior (setas), margem palpebral inferior mais extensa que a superior, margem palpebral irregular, demonstrando um desnível em “degrau” entre os limbos palpebrais anterior e posterior (asterisco), despigmentação na extremidade lateral da margem da terceira pálpebra e câmara anterior do olho profunda (DTP).

A terceira pálpebra está localizada dorsomedialmente no saco conjuntival, entre a pálpebra superior e o bulbo ocular. É relativamente espessa e de coloração esbranquiçada, não possibilitando a visualização das estruturas intraoculares ao recobrir a superfície corneana. Em alguns exemplares tende a ser azulada. Em sua margem é possível observar uma faixa pigmentada marrom-escura, que diminui de intensidade à medida que se aproxima do ângulo lateral do olho e termina por desaparecer por completo (Figura 5). A terceira pálpebra de corujas *Asio clamator* é uma estrutura extremamente móvel e seu movimento se dá em direção ventrolateral.



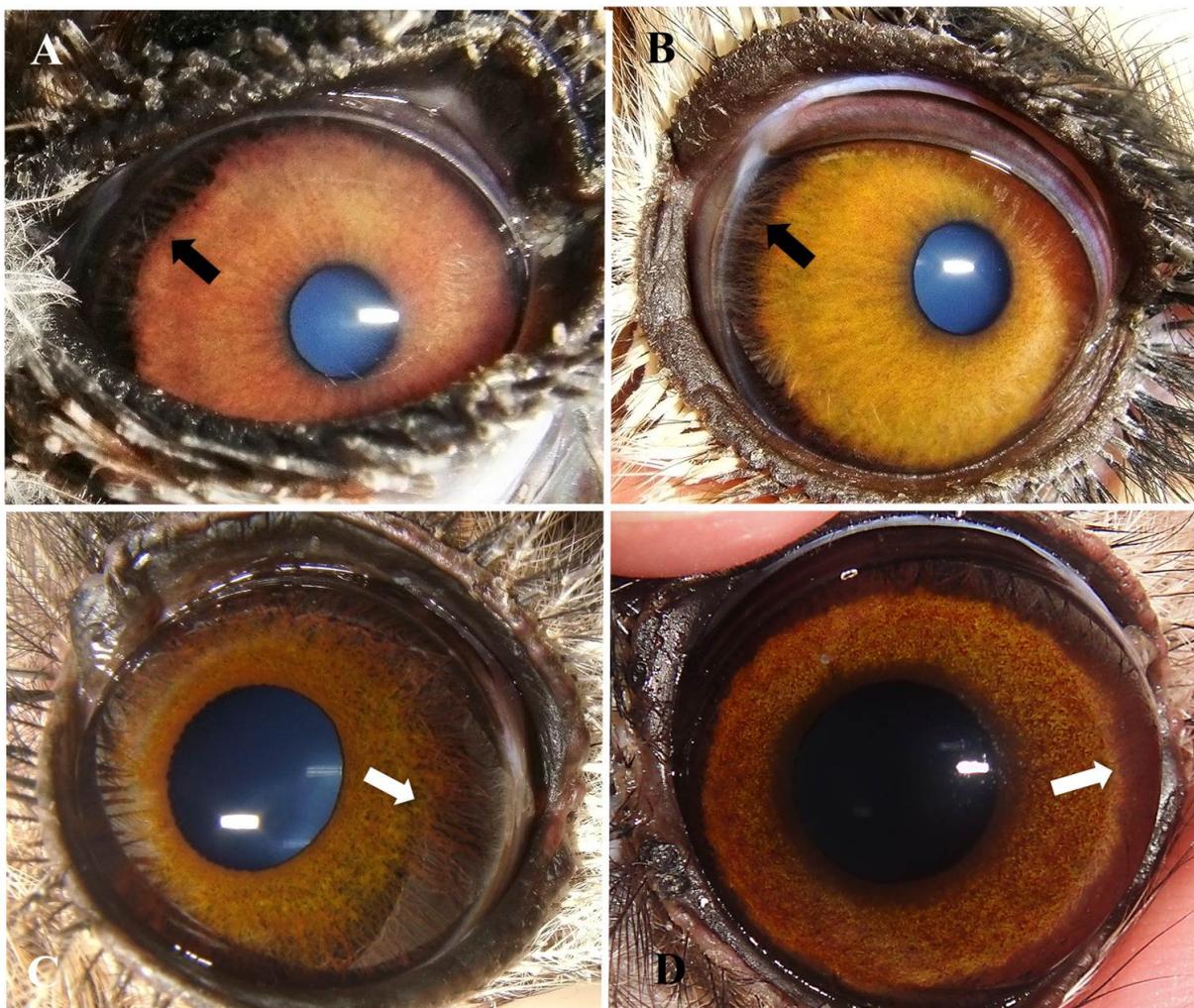
**Figura 5** - Olho esquerdo de uma coruja-orelhuda adulta, evidenciando a terceira pálpebra, de coloração esbranquiçada e margem pigmentada, que está localizada dorsomedialmente (asterisco). Notar a superfície irregular das margens palpebrais de ambas as pálpebras (setas).

A íris apresenta diferentes graus de pigmentação, variando entre o marrom escuro nos animais adultos e nos jovens de amarelado a marrom claro. As pupilas

possuem formato circular, movimento voluntário e é possível observar uma pequena parte do epitélio pigmentar da íris na margem pupilar (Figura 6).

Com relação aos reflexos pupilares, as corujas avaliadas não apresentaram resposta ao reflexo direto e ao consensual, contudo, foi observado que dois animais apresentaram anisocoria, provavelmente por estresse, logo após a contenção, sendo que as pupilas retornaram a dilatação normal quando as corujas estavam em situação de repouso após cerca de 20 minutos.

Os ligamentos pectinados nestas aves são mais desenvolvidos que nos mamíferos sendo que as malhas trabeculares são extensas, particularmente no nível do ângulo lateral do olho. Nos animais jovens parte da malha trabecular encontra-se não apenas no ângulo iridocorneano, mas é também visível na superfície periférica da íris, podendo-se observar os espaços entre os ligamentos pectinados, espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana), sem o uso de lente para gonioscopia. Nos animais adultos, os ligamentos pectinados, espaços do ângulo iridocorneano e até mesmo parte da malha trabecular, ainda estão aparentes ao olho desarmado. Entretanto, a extensão de tais ligamentos e o espaçamento entre eles nitidamente diminuem conforme as corujas envelhecem (Figura 6).



**Figura 6** - Íris de olhos de corujas-orelhudas em diferentes faixas etárias, evidenciando as diferentes colorações, os ligamentos pectinados e os espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana) observáveis sobre na superfície da íris. (A) Ligamentos pectinados do olho direito de uma coruja de aproximadamente um mês de idade. Observar a grande extensão dos ligamentos pectinados e o espaçamento entre eles, e a coloração marrom clara. (B) Ângulo iridocorneano do olho direito de uma coruja jovem evidenciando espaços menores entre os ligamentos pectinados e coloração mais amarelada. (C, D) Ângulo iridocorneano do olho esquerdo de uma coruja idosa; notar os ligamentos pectinados ainda aparentes, mas curtos e com espaçamento pequeno entre si e ambos apresentam coloração marrom escura.

A lente nesta espécie é transparente, contudo nas aves mais jovens (com aproximadamente um mês de idade) foi observada leve opacidade de localização central (nuclear), que após aproximadamente dois meses de vida começou a diminuir, tornando-se translúcida quando as aves chegam a idade adulta (entre três e quatro meses de idade) (Figura 7A, B).



**Figura 7** - Face de duas aves em diferentes faixas etárias. (A) Coruja jovem de aproximadamente um mês, é possível notar a opacidade da lente em ambos os olhos. (B) Coruja adulta, apresentando translucidez da lente bilateralmente.

#### 5.5.4 Exames oftálmicos

##### 5.5.4.1 Teste Lacrimal de Schirmer

O valor médio geral encontrado no Teste Lacrimal de Schirmer foi de  $5,03 \pm 3,28$  mm/min. De acordo com o sexo, as fêmeas apresentaram a média de  $6,64 \pm 3,85$  mm/min, já os machos de  $4,16 \pm 2,40$  mm/min, e de acordo com a idade, foi mensurado nos jovens  $4,00 \pm 3,09$  mm/min e  $6,25 \pm 3,58$  mm/min nos adultos. Não houve diferença significativa do Teste Lacrimal de Schirmer entre machos e fêmeas ( $P=0,16$ ), adultos e jovens ( $P=0,19$ ) e olhos direito e esquerdo ( $P=0,62$ ).

##### 5.5.4.2 Análise microbiológica

Foram isoladas 22 tipos de bactérias, em 23 amostras oculares obtidas de 12 corujas. A Tabela 2 traz os resultados condensados das análises microbiológicas encontrada em olhos de corujas. Os resultados da cultura revelaram que houve crescimento bacteriano nas amostras, em 21 dos 23 olhos (91,3%), sendo que apenas 2 (9,52%) amostras foram negativas. No total de amostras positivas, foram isoladas 20 (90,9%) bactérias classificadas em Gram-positivas e apenas 2 (9,09%) amostras foram Gram-negativas. As bactérias encontradas na microbiota ocular das corujas deste estudo incluem: *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., todas Gram-positivas. Dentre as Gram-negativas foram

isoladas apenas *E. coli* e *Serratia* sp. (Tabela 2). Neste estudo, as bactérias mais frequentes na microbiota ocular dos animais foram os *Staphylococcus* sp., sendo encontrado em 18 (81,83%) amostras (Tabela 2).

**Tabela 2** - Gêneros bacterianos e frequência de bactérias encontradas em olhos de corujas-orelhudas (*Asio clamator*) saudáveis

Bactérias - Gênero	Nº de bactérias	%de bactérias	Espécie das bactérias
<b>TOTAL DE GRAM-POSITIVA</b>	<b>20</b>	<b>90,90%</b>	
<i>Staphylococcus</i> sp.	<b>18</b>	<b>81,82</b>	
sp.	4	18,18	<i>Staphylococcus</i> sp.
SCP	8	36,35	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
SCN	6	27,27	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	<b>1</b>	<b>4,54</b>	
<i>Corynebacterium</i> sp.	<b>1</b>	<b>4,54</b>	
<b>TOTAL DE GRAM-NEGATIVA</b>	<b>2</b>	<b>9,1</b>	
<b>Enterobacteria</b>	<b>2</b>	<b>9,1</b>	
<i>E. coli</i>	1	4,55	
<i>Serratia</i> sp.	1	4,55	
<b>Total de bactérias isoladas</b>	<b>22</b>	<b>100</b>	

SCP= *Staphylococcus* coagulase positivo;

SCN = *Staphylococcus* coagulase negativo.

#### 5.5.4.3 Estesiometria da córnea

A média geral de estesiometria foi de  $0,80 \pm 0,59$  cm para a população estudada. O valor médio encontrado nas fêmeas foi  $1,00 \pm 0,51$  cm e nos machos  $0,64 \pm 0,61$  cm. Os animais jovens apresentaram média de  $1,2 \pm 0,28$  cm e os adultos de  $0,86 \pm 0,65$  cm. Não foi encontrada diferença significativa das médias de estesiometria com relação à idade (adultos ou jovens) ( $P=0,22$ ), entre machos e fêmeas ( $P=0,23$ ) ou entre olhos direito e esquerdo ( $P=0,53$ ).

#### 5.5.4.4 Pressão intraocular (PIO)

A média geral da PIO foi de  $13,81 \pm 5,62$  mmHg da população estudada. As fêmeas apresentaram média de  $14,35 \pm 4,58$  mmHg e os machos de  $13,143 \pm 4,88$  mmHg. A média de pressão intraocular encontrada nos jovens foi de  $16,83 \pm 3,86$  mmHg e nos adultos de  $12,29 \pm 4,41$  mmHg. A PIO nas aves jovens foi significativamente maior que nas aves adultas ( $P=0,036$ ). Não houve diferença

significativa das médias obtidas entre os sexos ( $P=0,58$ ) ou entre os olhos direito e esquerdo ( $P=0,79$ ).

#### 5.5.4.5 Diâmetro horizontal da rima palpebral e diâmetro horizontal da córnea

O valor médio horizontal geral para a rima palpebral foi de  $21,24\pm 1,17$  mm para a população estudada. A média obtida para os machos foi  $22,18\pm 0,95$  mm e para fêmeas  $21,02\pm 1,09$  mm. A média encontrada para jovens foi de  $20,43\pm 0,97$  mm e em adultos foi de  $21,78\pm 0,97$  mm. Foi observado que os machos apresentam o diâmetro horizontal da rima palpebral significativamente maior que as fêmeas ( $P=0,027$ ), e nos jovens é significativamente menor que nos adultos ( $P=0,008$ ).

A média geral do diâmetro horizontal da córnea foi de  $15,7\pm 2,74$  mm para a população estudada. O comprimento médio encontrado nos machos foi de  $17,57\pm 0,48$  mm e de  $14,12\pm 3,40$  mm para fêmeas. Nos jovens a média foi de  $13,63\pm 3,29$  mm e  $16,02\pm 2,87$  mm para os adultos. Os machos tiveram o diâmetro da córnea significativamente maior que as fêmeas ( $P=0,016$ ). Não houve diferença significativa quando o diâmetro horizontal da córnea das corujas adultas e jovens foi comparado ( $P=0,10$ ), e do olho direito e esquerdo ( $P=0,99$ ).

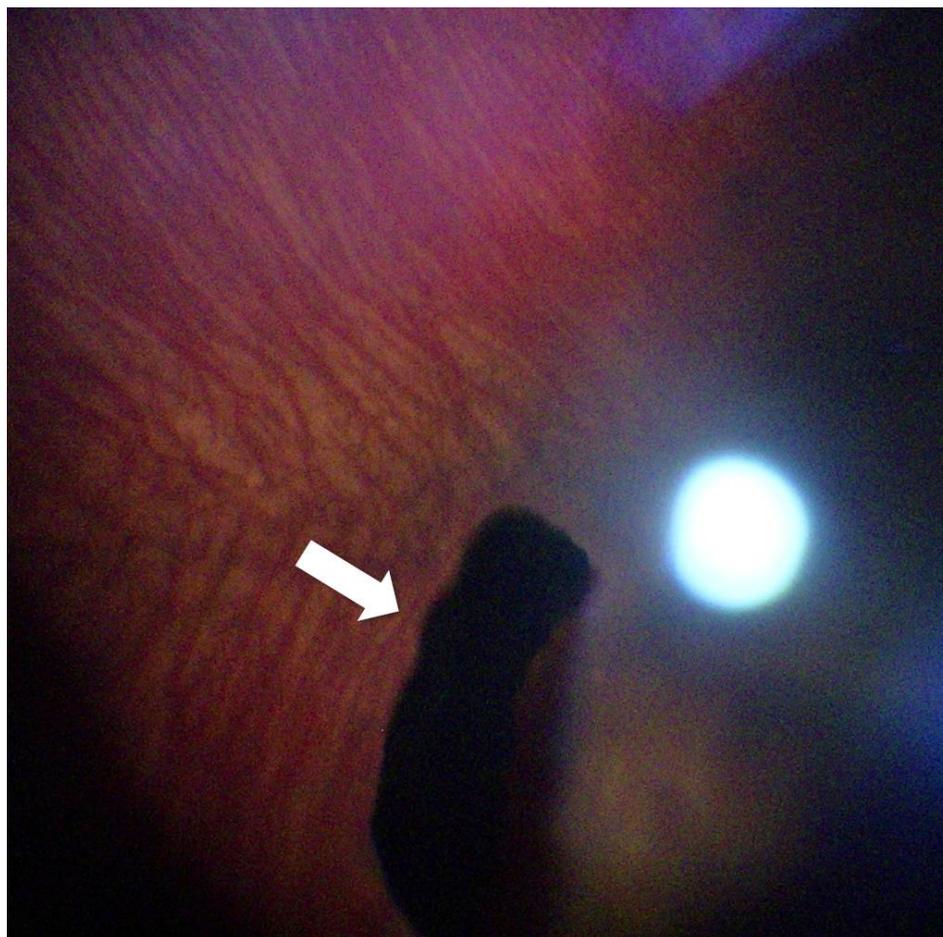
#### 5.5.4.6 Espessura central da córnea

O valor médio da espessura central da córnea para a população estudada foi de  $0,28\pm 0,03$  cm. Para fêmeas a espessura média foi de  $0,29\pm 0,02$  cm o qual foi significativamente menor ( $P=0,03$ ) que a espessura observada em machos desta espécie  $0,31\pm 0,02$  cm. Com relação à idade dos animais, observou-se pouca diferença na espessura central da córnea entre jovens e adultos, os quais os valores médios encontrados foram  $0,30\pm 0,02$  cm e  $0,30\pm 0,024$  cm, respectivamente. Não foi observada diferença significativa com relação à idade ( $P=0,71$ ) ou aos olhos direito e esquerdo ( $P=0,68$ ).

#### 5.5.4.7 Fundoscopia

Somente em cinco corujas que responderam à contenção física em ambiente escuro com midríase, foi possível observar padrão anangiótico e atepetal da retina. A coroide é altamente vascularizada, com vasos evidentes e distribuídos em um

padrão radial a partir de uma faixa central imaginária, onde tais vasos, por vezes, se entrelaçam (Figura 2D). Da superfície do nervo óptico se protrui, em direção ao corpo vítreo, uma estrutura denominada pécten ocular, em formato plissado, similar a um pente, altamente pigmentada (Figura 8). Foi possível de se observar ainda uma fóvea bem desenvolvida em algumas aves, localizada dorsolateralmente ao pécten ocular.



**Figura 8** - Fundo de olho de uma coruja-orelhuda adulta capturada por oftalmoscopia indireta. Observar a intensa vascularização coroidal, com vasos em disposição radial a partir de uma faixa central imaginária na qual tais vasos, por vezes, se entrelaçam, e a presença do pécten ocular (seta).

## 5.6 DISCUSSÃO

Devido ao fato dos animais examinados terem sido originalmente de vida livre, não foi possível obter a idade exata de cada exemplar, apenas aproximada. No presente estudo, observou-se diferença significativa de pesos entre os sexos das

corujas-orelhudas (*Asio clamator*), sendo que as fêmeas são mais pesadas. Esta diferença entre sexos já foi descrita anteriormente em outros rapinantes. Esta característica é mais evidente em falconídeos que nas corujas, podendo ser em decorrência do chamado dimorfismo sexual reverso que estas aves apresentam (WEIDENSAUL, 1996; PEREIRA, 2007). Nosso achado corrobora também com alguns relatos, que afirmam que as fêmeas são mais pesadas nos rapinantes que se alimentam de serpentes e roedores, como é o caso das corujas *Asio clamator* (DEL HOYO; SARGATAL; ELLIOT, 1994; PEREIRA, 2007).

Como já demonstrado em outros animais da ordem Strigiformes (CURTIS; MILLER, 1938), observamos na coruja-orelhuda que os ossículos esclerais apresentam forma retangular e côncava, com o eixo mais longo direcionado no sentido anteroposterior, apresentando uma largura nitidamente variável, isto em decorrência da forma tubular do bulbo ocular destas aves (FRANZ-ODENDAAL; HALL, 2006; LIMA et al., 2009; MENEGAZ; KIRK, 2009). A forma individual dos ossículos esclerais varia entre as aves de achatada ou ligeiramente convexa a côncava, de acordo com o formato geral do bulbo ocular (BAUMEL et al., 1993; LIMA et al., 2009). Este arranjo tem importante papel na acomodação da córnea e na proteção do bulbo ocular (FRANZ-ODENDAAL; HALL, 2006; LIMA et al., 2009). A quantidade de ossículos esclerais variaram entre 15-16, corroborando Mohecha & Oliveira, (1998) que encontraram variação de 14-16 ossículos esclerais em corujas da família *Titonidae* e *Stringidae*, e Lima et al., (2009), que encontraram 15 ossículos esclerais em cada anel de ossículos em corujas da espécie *T. alba*. Porém, o bulbo ocular destes animais, as coruja-das-torres (*T. alba*), é relativamente pequeno, provavelmente, pelo fato do crânio desta espécie ser mais estreito comparativamente ao de outras corujas (MAHECHA; OLIVEIRA, 1998). Diversos estudos afirmam que o anel escleral é composto por ossículos que podem apresentar-se em quantidade variável e possuir formatos diferentes entre si, variando amplamente entre as diferentes espécies de aves (CURTIS; MILLER, 1938; DE QUEIROZ; GOOD, 1988; WARHEIT; GOOD; DE QUEIROZ, 1989; LIMA et al., 2009; MENEGAZ; KIRK, 2009), répteis e teleósteos (FRANZ-ODENDAAL; HALL, 2006).

O osso sesamoide da esclera foi observado no aspecto ventral de todos os anéis de ossículos esclerais das corujas-orelhudas analisadas. Segundo Mahecha e Oliveira (1998), relatam que tal osso sesamoide foi observado apenas nas corujas,

apresentando dimensões e formas variadas nas diferentes espécies estudadas. Ocasionalmente pode ser duplo, como na coruja jacurutu (*Bubo virginianus*) (MAHECHA; OLIVEIRA, 1998). O osso sesamoide tem a função de redirecionar o trajeto do tendão do músculo piramidal da terceira pálpebra (BAUMEL et al. 1993; MAHECHA; OLIVEIRA, 1998).

A órbita óssea das corujas-orelhudas apresentou algumas particularidades distintas, dentre elas um curto processo supraorbital, dirigido lateral e caudalmente, projetado do terço médio da margem supraorbital, constituído pelo osso frontal (PYCRAFT, 1902). Tal processo provê área de fixação para a larga fáscia orbital que contribui para a manutenção do bulbo ocular na órbita e que se continua pela parte caudal da margem supraorbital e processo pós-orbital (PYCRAFT, 1902). Outra peculiaridade observada é o processo pós-orbital que é bem desenvolvido. Trata-se, no caso, de um processo longo, largo e côncavo na sua face orbital, projetando-se lateral e ventralmente da parte lateral da margem orbital, que em *Struthioniformes* é formada pelo osso frontal (BAUMEL et al. 1993), de modo a acompanhar a curvatura da parte lateral do polo posterior do bulbo ocular. Aparentemente, as corujas são as únicas aves nas quais o processo pós-orbital, pelo fato de ser largo, isola a órbita da fossa lateral (MENEGAZ; KIRK, 2009). Adicionalmente, foi observado que o septo interorbital é reduzido, um tanto espesso e não apresenta fontículos interorbitais, sendo, portanto, inteiramente ósseo. Esta característica é observada nas espécies *Asio*, *Photodilus*, *Bubo* (PYCRAFT, 1902) e na espécie *Strinx* que também apresenta o septo interorbital relativamente espesso, comparativamente a outras espécies de corujas (SHUFELDT, 1900). Sendo assim, o septo interorbital de corujas-orelhudas é diferente da ampla e delgada lâmina óssea presente na maioria das outras ordens de aves, apresentando tecido ósseo esponjoso entre suas finas lâminas de osso compacto (PYCRAFT, 1902; BAUMEL et al. 1993). O osso lacrimal (Figura 1-3) é muito desenvolvido e constitui grande parte da parede rostral da órbita, mantendo amplo contato com o desenvolvido e bulboso processo palatino da maxila presente neste gênero (PYCRAFT, 1902). Três forames foram identificados no fundo da órbita, corroborando com os achados de Pycraft (1902) que demonstram que o maior e mais rostral corresponde ao forame óptico, enquanto que os outros dois menores, mais caudais e ventrais, correspondem ao forame comum para os nervos oculomotor (III), troclear (IV) e abducente (VI) e ao forame do nervo trigêmeo (V) (Figura 3), o mais caudal e ventral do conjunto.

Nas corujas *Asio clamator*, em algumas situações, há grande movimentação da pálpebra superior no ato de piscar em decorrência da movimentação da terceira pálpebra, com frequência de movimentos maior do que a pálpebra inferior. Em outras situações a pálpebra inferior move-se com maior intensidade. Isto pode estar associado ao estresse ou nervosismo destes animais, frente a situações em que se sentem ameaçados (SICK, 1993). Nas aves em geral, as pálpebras comumente são finas, mais susceptíveis aos traumas e apresentam pouco movimento, sendo que as pálpebras inferiores são mais móveis que as superiores (MURPHY, 1993; WILLIAMS, 1994; GELATT, 1999; MONTIANI-FERREIRA, 2001), principalmente em situação de tranquilidade (SICK, 1993). Nas corujas-orelhudas observou-se que o movimento da terceira pálpebra ocorre no sentido ventrolateral, diferente dos cães e gatos, espécies nas quais a terceira pálpebra se movimenta no sentido dorsolateral devido esta estrutura estar localizada ventromedialmente no saco conjuntival, entre a pálpebra inferior e o bulbo ocular (MAGGS; MILLER; OFRI, 2008). Nos rapinantes diurnos, este movimento ocorre do ângulo medial do olho em direção lateral (MURPHY, 1993). Nas corujas estudadas, foi observado que a terceira pálpebra é espessa, apresenta coloração esbranquiçada e não é translúcida como em muitas outras aves (GELATT, 1999; MONTIANI-FERREIRA, 2001; HARRIS et al., 2008; MAGGS; MILLER; OFRI, 2008). Em sua margem apresentam pigmentação, como observado em alguns cães (MAGGS; MILLER; OFRI, 2008).

As aves apresentam as margens palpebrais altamente pigmentadas e não apresentam glândulas tarsais (MURPHY, 1993; MONTIANI-FERREIRA, 2001; HARRIS et al., 2008), diferentemente dos canídeos, felinos domésticos (MAGGS; MILLER; OFRI, 2008) e seres humanos (LIESEGANG; SKUTA; CANTOR, 2005). Nas pálpebras de corujas-orelhudas, percebeu-se que as margens, são irregulares e associadas aos folículos das filoplumas. Além disso, um desnível em “degrau” é nitidamente perceptível entre os limbos palpebrais anterior e posterior de ambas as pálpebras. O ângulo lateral do olho é aparentemente maior que o ângulo medial e foi notado que as pálpebras inferiores são maiores que as superiores diferentemente do que foi encontrado por Harris et al. (2008), que destacaram que a pálpebra superior das corujas *Megascops asio*, é maior que a inferior. As filoplumas são cílios modificados que estão presentes em ambas as pálpebras de corujas e são estruturas observadas apenas em aves (MURPHY, 1993; MONTIANI-FERREIRA, 2001; HARRIS et al., 2008).

A cor da íris, bem como o formato da pupila, podem variar de acordo com a espécie dos indivíduos (GELATT, 1999), podendo também alterar-se entre os animais, dependendo da quantidade e tipos de pigmentos, do grau de vascularização (GELATT, 1999), da idade (GELATT, 1999) e sexo (BORTOLOTTI; SMITS; BIRD, 2003). Em aves a dieta também pode influenciar na coloração da íris (GELATT, 1999). Como os animais vieram de diferentes criatórios, as dietas podem ter influenciado a coloração da íris destes animais. Contudo, verificou-se que nas corujas-orelhudas ocorre influência da idade na coloração da íris. Os animais jovens, até aproximadamente quatro meses de vida, apresentavam íris mais clara, variando de castanho amarelada a castanho claro. Nos animais com idade além desta, a íris tornou-se marrom escura, podendo este fenômeno estar relacionado com a presença de purinas e de pteridinas (GELATT, 1999; BORTOLOTTI; SMITS; BIRD, 2003), sendo isto observado principalmente em pombas e nas corujas jacurutu (*Bubo virginianus*) (GELATT, 1999).

No presente estudo dois animais apresentaram anisocoria fisiológica, provavelmente em decorrência do estresse da contenção, sendo este fenômeno comumente descrito em aves em situações de estresse (MONTIANI-FERREIRA, 2001; HARRIS et al., 2008).

Quanto ao ângulo iridocorneano, pode-se observar que a malha trabecular estende-se pelo estroma da íris. Isto ocorre porque no ângulo iridocorneano das aves, há extensão lateral da câmara anterior, situada entre a íris e a córnea, é altamente desenvolvida e estende-se posteriormente, entre o corpo ciliar e a esclera, onde recebe o nome de seio cilioescleral (EVANS; MARTIN, 1993). Este seio é atravessado por uma grande rede de fibras elásticas que constituem os ligamentos pectinados com largas aberturas, os chamados espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana). Nos animais investigados os mais jovens apresentavam espaçamento entre os ligamentos pectinados, enquanto que, nos adultos, a malha trabecular pareceu estar mais desenvolvida, com espaçamentos menos evidentes ou ausentes.

A mensuração lacrimal é parte importante do exame oftálmico e tem como objetivo avaliar o funcionamento da glândula lacrimal, sendo possível mensurar em mamíferos, répteis e aves por meio do Teste Lacrimal de Schirmer-1 (TLS) (MONTIANI-FERREIRA, 2001). Com relação aos rapinantes noturnos, não há relatos da mensuração do Teste Lacrimal de Schirmer em corujas-orelhudas. A

produção lacrimal que encontramos foi de  $5,03 \pm 5,00$  mm/min, diferiu substancialmente do resultado encontrado em 21 olhos de corujas-*screech*-oriental (*Megascops asio*) nas quais a média foi de  $<2$  mm/min (HARRIS et al., 2008). Outros estudos em diferentes espécies de aves, já foram realizados, como nos psitacíformes que apresentaram  $3,2 \pm 2,7$  a  $7,5 \pm 2,6$  mm/min de produção lacrimal e nas pombas africanas que foi de  $4,5 \pm 1$  mm/min (WILLIAMS, 1994). Dentre os rapinantes diurnos, os Accipitriformes apresentaram uma produção lacrimal bem maior que os Falconiformes, que foi de  $10,7 \pm 4,0$  a  $11,5 \pm 5,4$  mm/min e de  $4,1 \pm 2,7$  a  $14,4 \pm 7,2$  mm/min, respectivamente (HARRIS et al., 2008). Provavelmente as diferenças de valores encontrada nas diferentes espécies de aves podem estar relacionadas com a adaptação ao meio ambiente natural no qual cada uma vive, tamanho da órbita, tamanho e função da glândula lacrimal (WILLIAMS, 1994), além da conformação e do movimento das pálpebras.

A microbiota conjuntival normal tem sido estudada em diferentes mamíferos e animais selvagens, pois pode auxiliar eventualmente na escolha da melhor conduta terapêutica, frente a processos infecciosos. Dentre os animais investigados encontram-se aves (DUPONT et al., 1994, WILLIAMS, 1994; HARRIS et al., 2008; BAYÓN et al. 2007), porcos (DAVIDSON et al., 1994), cães (MOORE; NASISSE 1995), gatos (SHEWEN et al., 1980), cavalos (ANDREW et al., 2003), cervo (DUBAY et al., 2000), macacos-prego (GALERA et al., 2002; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008b), bugio (GALERA et al., 2002), capivaras (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008a), castores (CULLEN, 2003), furão-europeu (MONTIANI-FERREIRA et al., 2006), chinchilas (LIMA et al., 2010; MÜLLER et al., 2010), gambás (PINARD et al., 2002; SPINELLI et al. 2010), *racoon* (PINARD et al., 2002; SPINELLI et al. 2010), coelhos (COOPER et al., 2001), entre outras. Neste estudo, assim como a grande maioria dos mamíferos (SHEWEN et al., 1980; DAVIDSON et al., 1994; DUPONT et al., 1994; WILLIAMS, 1994; MOORE; NASISSE 1995; DUBAY et al., 2000; PINARD et al., 2002; CULLEN, 2003; MONTIANI-FERREIRA et al., 2006; BAYÓN et al., 2007; HARRIS et al., 2008; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008a; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008b; LIMA et al., 2010; SPINELLI et al. 2010), a predominância foi de isolados bacterianos Gram-positivos, com maior prevalência do *Staphylococcus* sp. e em menor frequência *Micrococcus* sp. e *Corynebacterium* spp. Estas bactérias fazem parte microbiota conjuntival normal destes animais, mas são oportunistas e podem se tornar patogênicas em situações específicas (MOORE; NASISSE 1995).

Nas corujas deste estudo, a maioria das bactérias Gram-negativas foram da família Enterobacteriaceae, dentre elas *E. coli*, e *Serratia* sp. Corroborando com estudos que afirmam que o isolamento de *E. coli* em olhos de animais é um achado relativamente comum, e sendo igualmente descrito em outras espécies de corujas, falconiformes (DUPONT et al., 1994; HARRIS et al., 2008) entre outras espécies animais. Por serem bactérias habitantes naturais do intestino de mamíferos, são excretadas pelas fezes, podendo sobreviver em partículas fecais, na poeira e em água por meses (QUINN, 1994). Assim como no caso das *E. coli*, estas bactérias não parecem serem residentes do olho e sim, agentes transitórios. Portanto, o seu isolamento neste estudo pode indicar possível contaminação fecal, sendo neste caso, apenas uma bactéria transitória da conjuntiva.

O estesiometro de Cochet-Bonnettem objetiva avaliar a sensibilidade da córnea através do limiar de toque da sua superfície, sendo a utilização deste instrumento calibrado recentemente bem estabelecida na medicina veterinária. Para tanto, pesquisas com diversas espécies de animais já foram realizadas, exceto em corujas-orelhudas, as quais apresentaram menor sensibilidade corneana média ( $0,81 \pm 0,59$  cm) em relação a outras espécies animais, tais como os porcos-da-índia ( $2,0 \pm 0,6$  cm) (TROST; SKALICKY; NELL, 2007), os *Hispaniolan parrot* ( $1,33 \pm 1,06$  cm) (Storey, 2009), os gatos domésticos (2,8 cm) (CHAN-LING, 1989, BLOCKER; VAN DER WOERDT, 2001), os equinos ( $5,01 \pm 0,61$  cm) (BROOKS et al., 2000; RANKIN et al., 2003) e os seres humanos (5,3 cm) (MILLODOT, 1969). Esta menor sensibilidade corneana observada nas corujas-orelhudas e nos *Hispaniolan parrot* pode ocorrer para permitir que a visão durante o vôo não seja obstruída por lacrimejamento excessivo (STOREY, 2009). Vale ressaltar que as corujas jovens ( $1,25 \pm 0,28$  cm) foram mais sensíveis que as corujas adultas ( $0,86 \pm 0,65$  cm), fato este não sendo descrito em outras aves. Porém, corrobora com estudos em outras espécies, como em gatos domésticos (BLOCKER; VAN DER WOERDT, 2001), equinos e em alpacas que apresentaram sensibilidade corneana significativamente maior em filhotes (BROOKS; CLARK; LESTER, 2000; RANKIN et al., 2012). Millodot (1977) afirma em seu estudo, comparando a influência da idade na sensibilidade corneana de seres humanos que pessoas de 7-40 anos de idade apresentam maior sensibilidade. Porém, após os 50 anos, a sensibilidade vai diminuindo significativamente e o autor ainda questiona se esta alteração é decorrente do

espessamento da estrutura fibrosa da córnea, da diminuição do teor de água ou da atrofia das fibras nervosas (MILLODOT, 1977).

A PIO já foi relatada em algumas aves e em diferentes espécies de corujas, contudo não há relatos da PIO em corujas *Asio clamator*. Os valores de PIO relatados variaram consideravelmente entre as diferentes espécies de corujas, como nas corujas jacurutu (*Bubo virginianus*) que apresentaram média de PIO de  $7,1 \pm 1,1$  mmHg, relativamente menor que a encontrada nas outras espécies (RAYMENT; WILLIAMS, 1997). Contudo o instrumento utilizado nesta ocasião foi a tonometro de Schiotz (RAYMENT; WILLIAMS, 1997), que pode ter levado a esse tipo de diferença. Nas corujas bufo-real (*Bubo bubo*), que atualmente são as maiores corujas relatadas, a média encontrada foi de  $9,35 \pm 1,81$  mmHg (JEONG et al., 2007). Nas corujas Scheech-oriental (*Megascops asio*) as médias encontradas foram de  $11 \pm 1,9$  mmHg (HARRIS et al., 2008). Já nas corujas mocho-galego (*Athene noctua*), que são aves pequenas, as médias da PIO (19,15 mmHg) (BAYÓN et al., 2006) foram muito maiores às que as médias obtidas para a espécie investigada no presente estudo ( $13,81 \pm 5,63$  mmHg). Valores maiores de PIO também foram observados em três espécies de falconídeos, os águia-calçada, (*Aquila pennata*)  $16,19 \pm 3,49$  mmHg (BAYÓN et al., 2006), na águia-cobreira (*Circaetus gallicus*)  $20 \pm 5,92$  mmHg (BAYÓN et al., 2006) e águia-de-bonelli, (*Aquila fasciata*)  $19,61 \pm 2,43$  mmHg (BAYÓN et al., 2006). Em outras espécies de aves a PIO também foi avaliada, como nos perus (25 mmHg) (BAYÓN; ALMELA; TALAVERA, 2007) e nos Psitacídeos (20-25 mmHg) (BAYÓN et al., 2007), sendo estes resultados, maiores que os valores mensurados nas corujas deste estudo. Estas discrepâncias encontradas entre os strigiformes, falconídeos e outras famílias de aves ocorrem, provavelmente, devido às diferenças nos instrumentos empregados em cada estudo, diferenças nas formas dos bulbos oculares entre estas espécies, influência do ciclo circadiano na regulação e formação do humor aquoso (PEREIRA et al., 2011) e por último, devido às diferenças no mecanismo de acomodação ocular entre as diferentes aves (GLASSER; HOWLAND, 1996).

No presente estudo, apesar das corujas fêmeas serem significativamente maiores que os machos, a média do diâmetro horizontal da rima palpebral encontrada foi maior nos machos e nos adultos. Como algumas corujas se encontravam ainda em crescimento, também foi observada diferença no diâmetro horizontal da rima palpebral entre jovens e adultos. Com relação ao diâmetro

horizontal da córnea das corujas-orelhudas deste estudo, a média encontrada foi de  $15,7\pm 2,74$  mm, corroborando com os achados em corujas *Scheech*-oriental (*Megascops asio*) ( $15,5\pm 0,5$  mm), que foram semelhantes (HARRIS et al., 2008). Contudo, em nosso estudo observamos que a córnea dos machos ( $17,57\pm 0,48$  mm) é significativamente maior que as das fêmeas ( $14,12\pm 3,40$  mm) fato ainda não relatado em outras espécies (WILLIAMS, 1994; CULLEN, 2003; HARRIS et al., 2008).

Algumas pesquisas com o paquímetro ultrassônico avaliando a espessura central da córnea em aves já foram realizadas nas aves de rapina. No entanto, este é o primeiro relato da mensuração de espessura central da córnea em corujas *Asio clamator* ( $0,29\pm 0,03$  mm). A espessura central da córnea (ECC) desta espécie foi maior que as encontradas em coruja mocho-galego (*Athene noctua*) ( $0,14\pm 0,018$  mm) (BAYÓN et al., 2006) e na espécie de corujas bufo-real (*Bubo bubo*) ( $0,24\pm 0,008$  mm) (BAYÓN et al., 2006). Comparando nossos resultados com os resultados obtidos em outra espécie de ave, nosso dado foi ainda maior que o encontrado nas galinhas  $0,24\pm 0,0004$  mm (MONTIANI-FERREIRA; CARDOSO; PETERSEN-JONES, 2004). Comparativamente a diferentes espécies de mamíferos já estudadas, a ECC das corujas foram menores que no furão-europeu ( $0,33\pm 0,02$  mm) (MONTIANI-FERREIRA et al., 2006), nos macacos-prego ( $0,46$  mm) (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008b), nas capivaras ( $0,48\pm 0,03$  mm) (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008a), nos gatos domésticos ( $0,57\pm 0,012$  mm) (MOODIE et al., 2001) e nos seres humanos ( $0,52\pm 0,03$  mm) (ASHWIN et al., 2009). Corroborando com Prince (1956), que afirmam que a ECC em aves, de forma geral, é mais fina que em outras espécies. Contudo a razão para este fato não está bem elucidada, podendo ocorrer em decorrência do formato do bulbo ocular e pela presença da lâmina cartilaginosa da esclera. Discordando desta ideia, achados em outras aves de rapina, como nos falconídeos, mostram que a espessura corneana média encontrada na águia-calçada (*Aquila pennata*)  $0,58\pm 0,05$  mm, na águia-cobreira (*Circaetus gallicus*)  $0,60\pm 0,05$  mm e águia-de-bonelli, (*Aquila fasciata*)  $0,63\pm 0,02$  mm foram maiores que nas corujas deste estudo e até mesmo que nos seres humanos (BAYÓN et al., 2006).

Apesar das fêmeas deste estudo serem mais pesadas, suas córneas foram significativamente mais finas que as dos machos. O mesmo fenômeno ocorreu nas chinchilas (LIMA et al., 2010) e em crianças (SAHIN et al., 2008), contudo não foi

encontrado relatos na literatura sobre este fenômeno em aves. Em contrapartida, em capivaras (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008a), furão-europeu (MONTIANI-FERREIRA et al., 2006) e seres humanos adultos (SÁNCHEZ-TOCINO et al., 2007) o oposto ocorreu, as córneas das fêmeas foram mais espessas comparativamente aos machos de suas respectivas espécies.

Não foi realizada fundoscopia em todas as corujas-orelhudas examinadas, uma vez que foi encontrada certa dificuldade em sua execução em decorrência da miose parcial observada em muitos destes animais. O padrão da retina das cinco corujas-orelhudas examinadas é anangiótica e atapetal, recebendo sua nutrição através do corpo vítreo e da coroide, como é observado em aves de forma geral (PEREIRA, 2007, RUGGERI et al., 2010). Ruggeri et al. (2010) confirmaram através das imagens obtidas por tomografia de coerência óptica (TCO) que as camadas da retina de falconídeos e strigiformes não possuem vasos sanguíneos, diferentemente da dos seres humanos. Foi possível observar nas corujas veias coroidais, especialmente nas aves jovens (MURPHY, 1993), podendo estas serem visualizadas em decorrência da pouca pigmentação do epitélio pigmentar na maioria das aves de rapina noturnas (MURPHY, 1993). Apenas uma fóvea, a fóvea temporal, que é bem desenvolvida e localizada dorsolateralmente ao pecten ocular foi observada nas corujas-orelhuda (RUGGERI et al., 2010), característica comumente relatada em strigiformes (MURPHY, 1993; OROSZ, 2007). Por sua vez os falconiformes e os psitaciformes possuem duas fóveas em cada bulbo ocular (PRINCE, 1956; MURPHY, 1993; WILLIAMS, 1994; MONTIANI-FERREIRA, 2001; OROSZ, 2007; RUGGERI et al., 2010). Exames de TCO em corujas (*Bubo virginianus* e *Strix varia*) revelam que a espessura da coroide altera dependendo da localização, ou seja, a coroide é mais fina na região próxima no nervo óptico e mais espessa ao redor da fóvea (RUGGERI et al., 2010). A maioria das espécies domésticas de mamíferos não possui fóvea, apresentando uma acuidade visual menos privilegiada comparativamente às aves (GELATT, 1999; MONTIANI-FERREIRA, 2001; MONTIANI-FERREIRA, 2008a; CULLEN, 2003; LIMA et al., 2010).

O pecten ocular é uma projeção tecidual localizado no interior da câmara vítrea (PRINCE 1956; GELATT, 1999; OROSZ, 2007; MONTIANI-FERREIRA, 2001; RUGGERI et al., 2010), similar ao tecido da úvea (MONTIANI-FERREIRA, 2007), que é encontrado em todas as aves (PRINCE 1956; MURPHY, 1993; OROSZ, 2007;

RUGGERI et al., 2010). O pécten ocular da coruja *Asio clamator* é plissado diferenciando-se de outros formatos relatados, como a forma de palheta, ou de cone (MONTIANI-FERREIRA, 2001). Esta estrutura pôde ser evidenciada em corujas-orelhudas no exame de oftalmoscopia, no entanto exames de ultrassonografia ocular (SQUARZONI et al., 2010) e de OCT (RUGGERI et al., 2010) também auxiliam na observação desta estrutura *in vivo*. O pécten ocular das aves tem como função, proteger e obstruir a sobrecarga de brilho na retina (PRINCE, 1956), mas provavelmente suas funções primárias incluem a nutrição da porção interna da retina avascular (MURPHY, 1993; GELATT, 1999; MONTIANI-FERREIRA, 2001), participação na regulação ácido-básica e provável contribuição na formação de fluido intraocular (MURPHY, 1993).

Este estudo contribuiu para o estabelecimento de valores de referências para testes diagnósticos oftálmicos em corujas-orelhudas (*Asio clamator*), bem como para a caracterização da morfologia ocular, gerando dados e demonstrando aspectos que poderão auxiliar os médicos veterinários oftalmologistas a não confundirem eventuais oftalmopatias com as características morfológicas peculiares desta espécie. Sendo assim, o estabelecimento de valores de referência certamente proporcionará diagnósticos mais precisos para as oftalmopatias nestas aves quando receberem cuidados oftalmológicos no futuro. Para melhor compreensão de algumas das características morfológicas descritas nesta pesquisa, acredita-se ser necessário o desenvolvimento estudos complementares sobre histologia ocular nesta espécie.

## 5.7 REFERÊNCIAS

AGILLAR, R.F. 2003. Strigiformes (Owls), p.491–501. In: Fowler M.E. & Miller R.E. (Eds), **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5th ed. W.B. Saunders, St Louis, Missouri.

AGUIAR, K.M.O.; NAIFF R.H. Aspectos reprodutivos e dieta alimentar dos ninhegos de *Asio clamator* (Aves: Strigidae) no campus Marco Zero da Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP. **Acta Amazonica**. 39:1, 2009.

ANDREW, S.E.; NGUYEN, A.; JONES, G.L. et al. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. **Vet. Ophthalmol**. 6: 45-50, 2003.

ASHWIN, P.T.; SHAH, S.; PUSHPOTH, S. et al. relationship of Central Corneal Thickness (CCT) to Thinnest Central Cornea (TCC) in healthy adults. **Contact Lens and Anterior Eye**. 32(2):64-67, 2009.

BAUMEL, J.J.; KING, A.S.; BREAZILLE, J.E. et al. 1993. **Handbook of avian anatomy: Nomina anatomica avium**. 2<sup>nd</sup> edition. Nutall Ornithological Club, Cambridge.

BAYÓN, A.; ALMELA, R.M.; TALAVERA, J. Avian ophthalmology. **Eur. J. Companion Anim. Pract.** 17(3):253-266, 2007.

BAYÓN, A.; VECINO, E.; ALBERT, A. et al. Evaluation of intraocular pressure obtained by two tonometers and their correlations with corneal thickness obtained by pachymetry in raptors [abstract]. **Vet. Ophthalmol.** 9(6):426-434, 2006.

BLOCKER, T.; VAN DER WOERDT, A. A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and domestic short-haired cats. **Vet. Ophthalmol.** 4(2):127-130, 2001.

BORTOLOTTI, G.R.; SMITS, J.E.; BIRD D.M. Iris colour of American kestrels varies with age, sex and exposure to PCBs. **Physiol. Biochem. Zoology**. 76(1):99-104, 2003.

BROOKS, D.E.; CLARK, C.K.; LESTER, G.D. Cochet-Bonnet aesthesiometer determined corneal sensitivity in neonatal foals and adult horses. **Vet. Ophthalmol.** 3(2/3):133-137, 2000.

CHAN-LING, T. Sensitivity and neural organization of the cat cornea. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.** 30(6):1075-1082, 1989.

COOPER, S.C.; MCLELLAN, G.J.; RYCROFT A.N. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Vet. Rec.** 149 (8):232-235, 2001.

CULLEN, C.L. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian beaver (*Castor canadensis*). **Vet. Ophthalmol.** 6:279-284, 2003.

CURTIS, E.L.; MILLER R.C. The sclerotic ring in North American birds. **The Auk** 55(2):225-243, 1938.

DAVIDSON, H.J.; ROGERS, D.P.; YEARY, T.J. et al. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. **Am. J. Vet. Res.** 55(7):949-951, 1994.

DEL HOYO, J.; SARGATAL, J.; ELLIOT, A. 1994. **Handbook of the Birds of the World: New world vultures to Guinea-fowl**, Lynx, Barcelona. 639p.

DE QUEIROZ K.; GOOD D.A. The scleral ossicles of opisthocomus and their phylogenetic significance. **The Auk** 105:29-35, 1988.

DUBAY, S.A.; WILLIAMS, E.S.; MILL, S K. et al. Bacteria and nematodes in the conjunctiva of mule deer from Wyoming and Utah. **J. Wildl. Dis.** 36(4):783-787, 2000.

DUPONT, C.; CARRIER M.; HIGGINS R. Bacterial and Fungal flora in healthy eyes of birds of prey. **Can. Vet. J.** 35(11):699-701, 1994.

EVANS, H.E.; MARTIN, G.R. 1993. Organa sensuum, In: Baumel J.J. (Ed.), **Handbook of Avian Anatomy: Nomina anatomica avium. Nuttall Ornithological Club**, Cambridge, Massachusetts. p.585-611.

FRANZ-ODENDAAL, T.A.; HALL BK. Skeletal elements within teleost eyes and a discussion of their homology. **J. Morphology.**267(11):1326-1337, 2006.

GALERA, P.D.; AVILA, M.O.; RIBEIRO, C.R. et al. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella*) e macacos bugio (*Alouatta caraya*) provenientes do reservatório de manso, MT, Brasil. **Arqs Inst. Biológico, São Paulo**, 69(2): 33-36, 2002.

GELATT, K.N. 1999. **Veterinary Ophthalmology**. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1544p.

GLASSER, A.; HOWLAND, H.C. History of studies of visual accommodation in birds. **Quart. Rev. Biology.** 71(4):475-509, 1996.

HARRIS, M.C.; SCHORLING, J.J.; HERRING, I.P. et al. Ophthalmic examination findings in a colony of Screech owls (*Megascops asio*). **Vet. Ophthalmol.** 11(3):186-192, 2008..

JEONG, M.B.; KIM, Y.J.; YI N.Y. et al. Comparison of the rebound tonometer (TonoVet) with the applanation tonometer (TonoPen XL) in normal Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*). **Vet. Ophthalmol.** 10(6):376-379, 2007.

KING, A.S.; MCLELLAND, J. 1984 *Birds: Their structure and function*. 2nd ed. Baillière Tindall, London.

LIESEGANG, T.J.; SKUTA, G.L.; CANTOR, L.B. *Fundamentals and Principles of Ophthalmology*. **American Academy of Ophthalmology**, 2005. São Francisco. 528p.

LIMA, F.C.; VIEIRA, L.G.; SANTOS, A.L.Q. et al. Anatomy of the scleral ossicles in brazilian birds. **Braz. J. Morphol. Sci.** 26(3/4):165-169, 2009.

LIMA, L.; MONTIANI-FERREIRA, F.; TRAMONTIN, M. et al. The chinchila eye: Morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. **Vet. Ophthalmol.** 13(Suppl.):14-25, 2010.

MAGGS, D.; MILLER, P.; OFRI, R. 2008. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Health Sciences, Missouri.496p.

MAHECHA, G.A.B.; OLIVEIRA, C.A. An additional bone in the sclera of the eyes of owls and the common potoo (*Nictibius griseus*) and its role in the contraction of the nictitating membrane. **Acta Anatomica** 163(4):201-211, 1998.

MENEGAZ, R.A.; KIRK, E.C. Septa and processes: Convergent evolution of the orbit in haplorhine primates and strigiform birds. **J. Human Evolution** 57(6):672-687, 2009.

MILLODOT, M.; LARSON, W. New measurements of corneal sensitivity: A preliminary report. **Am. J. Optometry, Archs Am. Acad. Optometry.** 46(4):261-265, 1969.

MILLODOT, M. The influence of age on the sensitivity of the cornea. **Invest. Ophthalmol. Vision Sci.** 16(3):240-242, 1977.

MONTIANI-FERREIRA, F. 2001. Ophthalmology In: Fowler, M.E.; Cubas Z.S. (Eds), *Biology Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press, Ames, p.437-456.

MONTIANI-FERREIRA, F.; CARDOSO, F.; PETERSEN-JONES, S. Postnatal development of central corneal thickness in chicks of *Gallus gallus domesticus*. **Vet. Ophthalmol.** 7(1):37-39, 2004.

MONTIANI-FERREIRA, F.; MATTOS, B.C.; RUSS, H.H. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putoriusfuro*). **Vet. Ophthalmol.** 9(4):209-213, 2006.

MONTIANI-FERREIRA, F. 2007. Oftalmologia, p.1092-1104. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária**. Roca, São Paulo.

MONTIANI-FERREIRA, F.; TRUPPEL, J.; TRAMONTIN, M.H. et al. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. **Vet. Ophthalmol.** 11(6):386-394, 2008a.

MONTIANI-FERREIRA, F.; SHAW, G.; MATTOS, B.C. et al. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Vet. Ophthalmol.** 11(3):197-201, 2008b.

MOODIE, K.L.; HASHIZUME, N.; HOUSTON, D.L. et al. Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. **Vet. Ophthalmol.** 4(4):267-272, 2001.

MOORE, C.P.; NASISSE, M.P. 1999. Clinical microbiology, p.259–289. In: Gelatt K.N. (Ed.), **Veterinary Ophthalmology**. 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

MÜLLER, K.; MAULER, D.A.; EULE, J.C. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eyes (*Chinchilla lanigera*). **Vet. Ophthalmol.** 2010. 13(Suppl.):29-34.

MULLIN, G.S.; RUBINFELD, R.S. The antibacterial activity of topical anesthetics. **Cornea** 1997.16:662-665.

MURPHY, C.J. 1993. Ocular lesions in birds of prey, In: Fowler, M.E. (Ed.), **Zoo and Wildlife Medicine**. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. p.211-221.

NOVAES, F.C. 2011. Listas das aves do Brasil. 10<sup>a</sup> ed. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 25.1.2011, Disponível em <<http://www.cbro.org.br>> Acesso em 20 abr. 2012.

OROSZ, S.E. 2007. The special senses of birds, In: Coles B.H. (Ed.), **Essentials of Avian Medicine and Surgery**. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK. p.22-39.

PEREIRA, R.J.G. 2007. Falconiformes e Strigiformes (águia, gavião, falcão, abutre, coruja), In: Cubas Z.S.; Silva J.C.R.; Catão-Dias J.L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. Vol.17. Roca, São Paulo. p.252-267.

PEREIRA F.Q.; BERCHT B.S.; SOARES M.G.; Comparison of are bound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. **Vet. Ophthalmol.** 14 (5):321-326, 2011.

PINARD, C.L.; BRIGHTMAN, A.H.; YEARY, T.J. et al. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). **J. Wildl. Dis.** 38(4):851-855, 2002.

PRINCE, J.H. 1956. **Comparative Anatomy of the Eye**. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. 418p.

PYCRAFT, W.I. A contribution towards our knowledge of the morphology of the owls. Part II. **Osteology**. Transactions of the Linnean Society. 1902. 9(1):1-48.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. et al. 1994. Staphylococcus species, p.118-125. In: Ibid. (Eds), **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London.

RANKIN, A.J.; HOSKING K.G.; ROUSH, J.K. Corneal sensitivity in healthy, immature, and adult pacas. **Vet. Ophthalmol.** 15(1):31-35, 2012.

RAYMENT, L.J.; WILLIAMS, D. Glaucoma in a captive-bred great horned owl (*Bubo virginianus virginianus*). **Vet. Rec.** 140(18):481-483, 1997.

RUGGERI, M.; MAJOR JR, J.C.; MCKEOWN, C. et al. Retinal structure of birds of prey revealed by ultra-high resolution spectral-domain optical coherence tomography. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.** 51(11): 89-95, 2010.

SAHIN, A.; BASMAK, H.; YILDIRIM, N. The influence of central corneal thickness and corneal curvature on intraocular pressure measured by tonopen and rebound tonometer in children. **J. Glaucoma.** 17(1):57-61, 2008.

SÁNCHEZ-TOCINO, H.; BRINGAS-CALVO, R.; IGLESIAS-CORTIÑAS, D. Correlation between intraocular pressure, pachymetry and keratometry in a normal population. **Archs Soc. Española Oftalmol.** 82(5): 267-272, 2007.

SANTOS, E. 1979. **Da Ema ao Beija Flor.** Itatiaia, Belo Horizonte. 395p.

SHEWEN, P.E.; POVEY, R.C.; WILSON, M.R. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. **Can. Vet. J.** 21(8):231-233, 1980.

SHUFELDT, R.W. 1900. On the osteology of the Striges (Strigidæ and Bubonidæ). **Proc. Am. Philosoph. Soc.** 39(164):665-722.

SICK, H. 1993. Order Strigiformes. In: *ibid.* (Ed.), **Birds in Brazil: A natural history.** Princeton University Press, Princeton, USA. p.286-298.

SPINELLI, T.P.; OLIVEIRA-FILHO, E.F.; SILVA, D. et al. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco and Paraíba (Northeast Brazil). **Vet. Ophthalmol.** 13(Suppl.1):134-136, 2010.

STOREY, E.S.; CARBONI, D.A.; KEARNEY, M.T. et al. Use of phenol red thread tests to evaluate production in clinically normal Amazon parrots and comparison with Schirmer tear test findings. **Journal Am. Vet. Med. Assoc.** 235(10):1181-1187, 2009.

SQUARZONI, R.; PERLMANN, E.; ANTUNES, A. et al. Ultrasonographic aspects and biometry of Striped owl's eyes (*Rhinoptynx clamator*). **Vet. Ophthalmol.** 13(Suppl.):86-90, 2010.

TROST, K.; SKALICKY, M.; NELL, B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. **Vet. Ophthalmol.** 10(3):143-146, 2007.

WARHEIT, K.I.; GOOD, D.A.; QUEIROZ, K. Variation in numbers of scleral ossicles and their phylogenetic transformations within the Pelecaniformes. **The Auk** 106:383-388, 1989.

WEIDENSAUL, S. 1996. Raptors, the birds of prey: An almanac of hawks, eagles, and falcons of the World. **Swan Hill Press**, Shrewsbury. 382p.

WILLIAMS, D. 1994. Ophthalmology. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Eds), **Avian Medicine: Principles and application**. Winger's Publishing Inc., Lake Worth, FL. p.682-686

## 6 ANEXOS

## O olho da coruja-orelhuda: observações morfológicas, biométricas e valores de referência para testes de diagnóstico oftálmico<sup>1</sup>

Ana C.V. Rodarte-Almeida<sup>2\*</sup>, Marcello Machado<sup>3</sup>, Suelen B. Baldotto<sup>2</sup>, Luciane Leigue dos Santos<sup>2</sup>, Leandro Lima<sup>2</sup>, Rogério R. Lange<sup>2</sup>, Tilde R. Froes<sup>2</sup> e Fabiano Montiani-Ferreira<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Rodarte-Almeida A.C.V., Machado M., Baldotto S.B., Leigue dos Santos L., Lima L., Lange R.R., Froes T.R. & Montiani-Ferreira F. 2013. [The eye of the striped owl: morphologic observations, biometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostics tests.] O olho da coruja-orelhuda: observações morfológicas, biométricas e valores de referência para testes de diagnóstico oftálmico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(10):1275-1289. Setor de Oftalmologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Cabral, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: [acrodarte@gmail.com](mailto:acrodarte@gmail.com)

The investigation aimed to describe the most relevant morphological characteristics of the eyes of the striped owl (*Asio clamator*) and determine normal values for selected ophthalmic diagnostic tests. A total of 32 eyes of 16 young and adult free-ranging healthy striped owls of both sexes were investigated. Data of different morphological observations of the skull, eye globe and adnexa, clinical tests and parameters were collected, including Schirmer Tear Test (STT), normal conjunctival bacterial microbiota, esthesiometry, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness (CCT), horizontal palpebral fissure length, horizontal, corneal diameter and funduscopy. Twenty two types of bacteria were identified in twelve owls, the most frequent bacteriae were the Gram-positive. The mean value found for the STT was  $5.03 \pm 3.28$  mm/min; horizontal palpebral fissure lengths was  $21.24 \pm 1.17$  mm, and  $15.7 \pm 2.74$  mm for horizontal corneal diameter. The mean value for the esthesiometry was  $0.80 \pm 0.59$  cm, IOP was  $13.81 \pm 5.62$  mmHg and CCT was  $0.28 \pm 0.03$  cm. This study contributes to establish reference values for selected ophthalmic diagnostic tests in the striped owl, as well as for morphological characterization of the eyeball of *Asio clamator*; but it is still necessary to characterize furthermore its histologic features.

INDEX TERMS: *Asio clamator*, Schirmer tear test, normal microflora, esthesiometry, intraocular pressure, morphology of the skull, ultrasound pachymetry.

**RESUMO.-** Objetivou-se relatar características morfológicas do bulbo ocular e determinar valores de referência para testes oftálmicos selecionados em corujas-orelhudas (*Asio clamator*). Foram estudados 32 olhos de 16 corujas (*Asio clamator*), adultas e jovens, machos e fêmeas, de vida livre. Sendo compilados dados referentes a observações

morfológicas do crânio, bulbo ocular e anexos, além de mensuração de testes oftálmicos, incluindo, Teste Lacrimal de Schirmer (TLS), cultura da microbiota normal da conjuntiva, estesiometria, pressão intraocular (PIO), espessura de córnea central (ECC), diâmetro horizontal da rima palpebral, diâmetro horizontal da córnea e oftalmoscopia indireta. Vinte e dois tipos de bactérias foram identificados em 12 corujas havendo predominância de microrganismos Gram-positivos. A média encontrada para o TLS foi de  $5,03 \pm 3,28$  mm/min, para o diâmetro horizontal da rima palpebral em 16 corujas foi  $21,24 \pm 1,17$  mm, e  $15,7 \pm 2,74$  mm para o diâmetro horizontal da córnea. O valor médio para o teste de estesiometria foi de  $0,80 \pm 0,59$  cm, a PIO média de  $13,81 \pm 5,62$  mmHg e ECC média de  $0,28 \pm 0,03$  cm. O estudo contribuiu para a caracterização da morfologia ocular e

<sup>1</sup> Recebido em 18 de janeiro de 2013.

Aceito para publicação em 10 de julho de 2013.

<sup>2</sup> Laboratório de Oftalmologia Comparada, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários 1540, Cabral, Curitiba, PR 80035-050, Brasil. \*Autor para correspondência: [acrodarte@gmail.com](mailto:acrodarte@gmail.com)

<sup>3</sup> Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus de Curitiba, Rodov. Ulysses Gaboardi Km 3, Curitiba, SC 89.520-000, Brasil.

para o estabelecimento de valores de referências de testes diagnósticos oftálmicos em corujas-orelhudas, sendo necessário ainda o desenvolvimento de estudos complementares sobre histologia ocular desta espécie.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Asio clamator*, teste lacrimal de Schirmer, espessura central da córnea, pressão intraocular, microbiota conjuntival normal, paquimetria ultrassônica, estesiometria, morfologia da órbita.

## INTRODUÇÃO

A coruja (*Asio clamator*), também conhecida como coruja-orelhuda (Sick 1993, Novaes 2011), é uma ave de rapina noturna pertencente à ordem dos Strigiformes que é subdividida em duas famílias: Titonidae (suindaras) e Estrigidae (corujas típicas) (Agillar 2003, Pereira 2007). A família Titonidae conta com 1 gênero composto por 16 espécies diferentes e 63 taxons. Por sua vez, a família Estrigidae é composta por 25 gêneros com 189 espécies 548 taxons (Agillar 2003).

As corujas estão distribuídas em diversos habitats no mundo (Santos 1979, Sick 1993, Agillar 2003), exceto na Antártica, e são provavelmente originárias do Velho Mundo (Sick 1993, Aguiar & Naiff 2009). As corujas-orelhudas são encontradas na América do Sul, principalmente na Venezuela, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, tanto em áreas altamente arborizadas quanto em áreas urbanas (Sick 1993, Agillar 2003, Squarzoni et al. 2010).

Os tamanhos das corujas de modo geral variam consideravelmente com a espécie (Sick 1993), sendo que as corujas-orelhudas (*Asio clamator*) são relativamente grandes, apresentando aproximadamente 37cm e pesando entre 320,00-546,00g (Sick 1993, Squarzoni et al. 2010). Os indivíduos de ambos os sexos se parecem, sendo que às vezes as fêmeas são maiores que os machos. Uma peculiaridade das corujas é que a penugem natal destas aves é substituída por uma segunda geração de plumas assemelhando-se a uma lanugem (Sick 1993).

As corujas-orelhudas (*Asio clamator*) se alimentam de roedores, marsupiais (gambás) e morcegos (Santos 1979, Sick 1993, Agillar 2003), muitas vezes devorando a presa inteira sem limpá-la, e possuem ainda a capacidade de regurgitar alimentos inteiros, ou seja, pelotas de ossos de roedores maiores e de quirópteros. (Santos 1979, Sick 1993, Agillar 2003, Pereira, 2007). Sua maior atividade caçadora desenvolve-se no crepúsculo e no começo da noite até aproximadamente 21 horas, podendo haver alteração de acordo com a claridade da lua (Sick 1993). Esta espécie animal apresenta um ouvido bem desenvolvido, com presença de um disco facial que possui a função de refletor sonoro, permitindo assim, que a coruja localize sua preza em movimento. Os ouvidos externos são assimétricos, fato este que parece colaborar, com a focalização, onde o lado esquerdo focaliza para baixo e o direito para cima. As penas que recobrem os ouvidos possuem uma estrutura rala peculiar, permitindo a penetração de som (Sick 1993, Agillar 2003). Nestas corujas, a capacidade visual aparentemente não é inferior à acústica destas aves (Sick 1993).

Nas corujas em geral, os olhos apresentam características distintas, como olhos grandes localizados rostralmen-

te, altamente expressivos, com campo visual limitado pela pouca mobilidade do bulbo ocular, fato este suprido pela alta mobilidade da cabeça, que pode girar em até aproximadamente 270º, para facilitar a visão, sendo ela uma cabeça larga e redonda (Santos 1979, Sick 1993, Agillar 2003). Os olhos destas aves apresentam formato semitubular devido à conformação do anel de ossículos esclerais, contínuo com a lâmina cartilaginosa da esclera. O olho da ave é relativamente grande em relação à cabeça do animal. Geralmente a coruja-orelhuda e as outras corujas apresentam excelente acomodação visual, em torno de 0,7-10 Dioptrias aproximadamente (Gelatt 1999), já que tanto a córnea quanto a lente podem modificar a curvatura ao focar (King 1984, Murphy 1993, Gelatt 1999, Montiani-Ferreira 2001, Montiani-Ferreira 2007). Sabe-se que as córneas das corujas apresentam a lamina limitante anterior (lâmina de Bowman) visível à microscopia. As retinas das corujas de modo geral são anangióticas, possuindo apenas uma fóvea e o pecten ocular, sendo capaz de responder a amplo espectro de cores, como o ultravioleta (King 1984, Murphy 1993, Montiani-Ferreira 2001, Montiani-Ferreira 2007). Algumas investigações oftálmicas já foram realizadas em outras espécies de corujas como Scheech-oriental (*Megascops asio*) (Harris et al. 2008), macho galego (*Athene noctua*), bufo-real (*Bubo bubo*) (Bayón et al. 2006, Jeong et al. 2007). Na espécie *Asio clamator*, no entanto, apenas avaliações dos aspectos ultrassonográficos dos olhos destes animais foram realizadas (Squarzoni et al. 2010), sendo portando, necessários ainda mais estudos, principalmente de outros parâmetros biométricos e morfológicos dos seus olhos e valores de referência para testes de diagnóstico oftálmico desta espécie. Uma vez que a oftalmologia comparada tornou-se parte importante na oftalmologia veterinária, objetivou-se obter na presente investigação descritiva do órgão da visão, dados sobre as peculiaridades morfológicas, bem como fisiológicas do olho das corujas orelhudas, por meio de testes oftálmicos aqui selecionados, que poderão ajudar na interpretação e no diagnóstico de doenças oculares nessas aves.

## MATERIAL E MÉTODOS

A nomenclatura utilizada nesta investigação, para a classificação da coruja-orelhuda (*Asio clamator*) e das outras espécies de aves mencionadas, foi a proposta pelo Comitê Brasileiro de registros ornitológicos (CBRO) (Novaes 2011).

**Preparo das peças anatômicas.** Para o estudo morfológico da órbita óssea da espécie de coruja *Asio clamator*, objeto deste trabalho, foram utilizadas 03 (três) cabeças de animais que vieram a óbito no Hospital Veterinário da Universidade do Contestado (UnC, Canoinhas, Brasil) e 1 (uma) de um animal doado por um pesquisador (Dr. José Ricardo Pachaly, Unipar-PR). A técnica utilizada para o preparo dos ossos das cabeças foi maceração com larvas de moscas, a qual permite a completa remoção dos tecidos moles, preservando apenas as partes ósseas e as ranfotecas. Tal técnica é um método eficaz para a preservação de ossos delicados, pois evita danos que comumente ocorrem com o emprego de outras formas de osteotécnicas, como também em tentativas de dissecação com instrumental cirúrgico.

Após a remoção da pele e dos bulbos oculares, as cabeças foram colocadas em recipientes individuais e cobertas por tela de metal com aberturas hexagonais de cerca de 2 cm de diâmetro, em seguida, serem expostas ao tempo na intenção de haver a de-

posição de ovos de insetos dípteros, comumente atraídos por carcaças desprotegidas. O período de maceração varia de acordo com a quantidade de larvas que se desenvolvem e, neste estudo, variou de 5-7 dias. Após este período, as peças ósseas foram lavadas em água corrente e mergulhadas em peróxido de hidrogênio 50% para o seu clareamento, durante 24 horas. Em seguida as peças foram lavadas em água destilada, secas ao ar e montadas. Um adesivo comercial de éster de cianoacrilato foi utilizado para colar as partes ósseas, com exceção da mandíbula, a qual foi mantida livre. Os bulbos oculares foram preparados por dissecação com instrumental cirúrgico, a fim de se preservar a disposição natural dos ossículos esclerais. Logo após removidos da órbita, os bulbos foram minuciosamente dissecados para a remoção de tecidos moles como músculos extrínsecos oculares, fâscias, conjuntiva bulbar, camadas superficiais da esclera, córnea e componentes internos como íris, corpo ciliar, coróide, retina, corpo vítreo e lente. Foram preservados apenas a lâmina cartilaginosa da esclera e o anel de ossículos esclerais. Especial atenção foi dada à preservação do osso sesamoide da esclera. Assim, a conformação óssea da órbita e os ossículos esclerais de 4 (quatro) corujas adultas da espécie *Asio clamator* foi estudada a olho desarmado, como também sob magnificação de duas a quatro vezes por meio de lupa estereoscópica. Foram realizadas fotografias digitais do conjunto total dos ossos da cabeça, bem como de detalhes relativos à órbita e aos bulbos oculares.

**Procedimentos oftálmicos e animais vivos.** Foram estudadas 16 corujas (*Asio clamator*), sendo que nove delas eram aparentemente adultas, três jovens e quatro não foram informadas as idades. Adicionalmente, dois filhotes de corujas, de aproximadamente um mês de idade também tiveram seus bulbos oculares examinados e documentados apenas com relação à morfologia. Do total foram avaliadas sete fêmeas; quatro machos e cinco animais cujo sexo não foi determinado. Os animais pesavam entre 485,00

e 625,00g e foram selecionados aleatoriamente dos seguintes locais: Centro de Triagem de Animais Silvestres (Cetas, PUCPR/IBAMA), Tijucas do Sul, Brasil; Guira-Oga Centro de Recuperação e Reprodução de Animais da Selva Paranaense, Puerto Iguazú, Argentina; Zoológico Roberto Ribas Lange, Criadouro de Animais Silvestres e Hospital Veterinário da ITAIPU, Foz do Iguaçu, Brasil; e do Parque Ecológico Ouro Fino, Campo Largo, Brasil.

O experimento foi integralmente baseado nos critérios preconizados pelas "Normas para uso de animais em pesquisas oftalmológicas" da ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Objetivando excluir possíveis alterações sistêmicas, todos os animais foram submetidos à exame físico, seguido de exame oftálmico. Os testes oftálmicos foram realizados por diferentes avaliadores, porém, para evitar discrepância de resultados, o mesmo avaliador que realizou um determinado teste, passou a sempre fazê-lo durante toda a investigação.

**Exames oftálmicos.** Para a contenção física, utilizaram-se luvas de couro, que auxiliaram na contenção dos membros pélvicos. As asas foram então recolhidas e seguradas com a mesma mão que continha os membros pélvicos, para evitar fraturas em qualquer seguimento dos membros ou quebra das penas, gerando o mínimo de estresse possível para o animal durante os procedimentos. Cada ave foi então mantida na posição vertical, com a cabeça estabilizada por contenção manual da extremidade do bico e tomou-se cuidado para não realizar compressão sobre a região cervical.

Após contenção, as aves foram submetidas a exame oftálmico, que incluía uso do transiluminador de Finoff, biomicroscopia com lâmpada de fenda (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France.), teste Lacrimal de Schirmer (TLS) (Teste da Lágrima de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.), coleta de material



Fig.1. Os testes oculares realizados nos olhos das corujas-orelhudas. (A) Teste lacrimal de Schirmer. (B) Coleta de amostra da microbiota da conjuntiva e córnea. (C) Análise estesiométrica da córnea central. (D) Mensuração da PIO.

para cultura e análise bacteriológica, estesiometria (Cochet-Bonnet, Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France.), documentação fotográfica digital (Máquina fotográfica, Sony Cybershot, DSC- T700, Câmera Digital com 3x Zoom Óptico.), tonometria de aplanção (Tonopen XL, Mentor Medical Systems.), medida da espessura central de córnea (Paquímetro ultrassônico, Micropach® Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY, USA.), mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral e do diâmetro horizontal da córnea (paquímetro de aço inoxidável) (Paquímetro de aço inoxidável, Neiko Tools, Klamath Falls, Oregon, USA.) e fundoscopia (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France).

**Inspeção ocular.** Utilizando iluminação direta com auxílio de um transiluminador de Finoff e biomicroscópio com lâmpada de fenda, procedeu-se a inspeção do segmento anterior de 32 olhos de 16 corujas (*Asio clamator*). Um olho foi excluído da pesquisa, por apresentar alterações oftálmicas, totalizando então 31 olhos estudados.

**Teste lacrimal de Schirmer (TLS).** Posteriormente, procedeu-se o exame lacrimal, por meio do Teste Lacrimal de Schirmer tipo 1 (TLS) (Fig.1A) em 31 olhos das 16 corujas, sem instalação de colírio anestésico para minimizar qualquer influência sobre os resultados. Este teste mensurou a produção basal e parte da produção reflexa da fração aquosa do filme lacrimal, sendo utilizadas tiras milimetradas e padronizadas de papel estéril de TLS para sua realização. As fitas foram acondicionadas individualmente no interior do saco conjuntival até o fórnice inferior de ambos os olhos, durante o período de um minuto.

**Análise microbiológica.** Para análise da microbiota ocular de avaliou-se 12 corujas realizando gentil fricção de zaragatoa na conjuntiva palpebral e fórnice conjuntival inferior de cada olho e na superfície ocular (córnea e conjuntiva bulbar) (Fig.1B), de forma asséptica, perfazendo um total de 23 olhos (amostras) de 12 corujas. Tomou-se o devido cuidado para que a zaragatoa não tocasse as filoplumas e a margem palpebral, tentando assim evitar ao máximo a contaminação externa. Não foi administrado anestésico tópico, pois a utilização deste fármaco poderia interferir no crescimento de micro-organismos (Mullin & Rubinfeld 1997). Em seguida, as zaragatoas foram acondicionadas em meio de transporte de Stuart e armazenadas sob refrigeração para, posteriormente, serem enviadas ao laboratório de microbiologia. As culturas dos micro-organismos foram realizadas em placas com meio BHI (brain-heart infusion), Agar sangue de carneiro 5% e MacConkey, as quais permaneceram incubadas a 37°C em ambiente aeróbico durante 24 a 48 horas. Em suma, a metodologia para análise microbiológica empregada nesta pesquisa foi a mesma de outras pesquisas realizadas em outras espécies animais para o estabelecimento da microbiota conjuntival (Pinard et al.2002, Montiani-Ferreira et al. 2006, Montiani-Ferreira et al. 2008a, Lima et al. 2010). As colônias bacterianas obtidas foram identificadas por coloração de Gram e procedimentos padrão de avaliação.

**Estesiometria.** A sensibilidade da córnea de 27 olhos de 14 corujas foi mensurada, utilizando o estesiômetro de Cochet-Bonnet (Fig.1C). O equipamento é composto por um monofilamento de náilon com diâmetro pré-definido, e comprimento ajustável. Para a mensuração, tocou-se suavemente o monofilamento de náilon, na

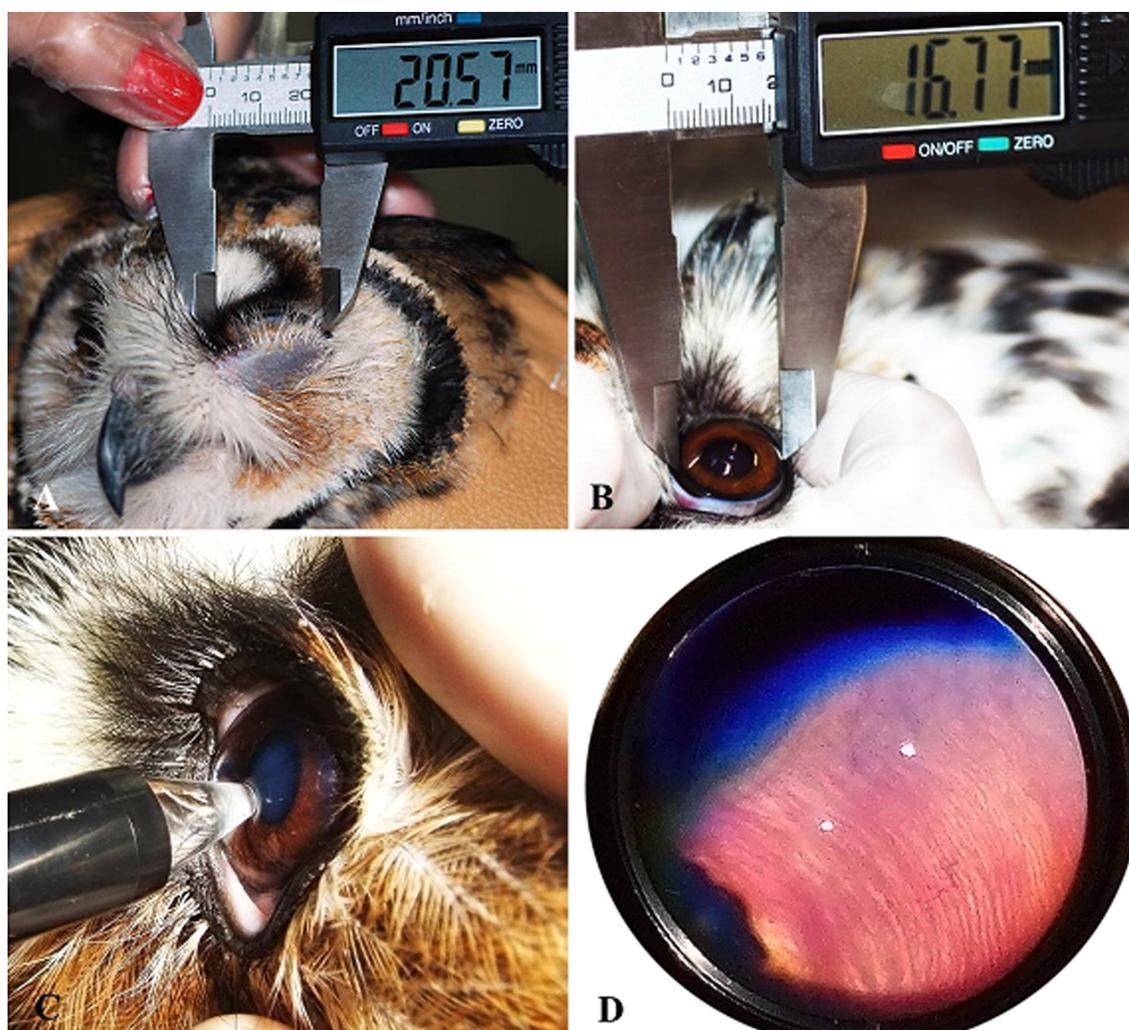


Fig.2. Os testes oculares realizados nos olhos de corujas-orelhudas. (A) Mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral. (B) Mensuração do diâmetro horizontal da córnea. (C) Paquimetria de córnea. (D) Oftalmoscopia indireta com lente de 20 dioptrias.

superfície central da córnea, regulando o comprimento do fio, deixando-o mais curto, até se obter uma resposta (ato de piscar) da ave.

**Pressão intraocular (PIO).** A pressão intraocular de 31 olhos de 16 corujas foi mensurada com auxílio do tonômetro de aplanação (Fig.1D), posicionando-o perpendicularmente à córnea e tocando-a suavemente. O resultado final obtido representa uma média de três mensurações, com erro máximo de 5%, entre as mensurações consecutivas. Nesta etapa do estudo, o avaliador preocupou-se em não realizar qualquer forma de pressão na região cervical dos animais, evitando assim possível alteração na mensuração final da PIO.

Diâmetro horizontal da rima palpebral e diâmetro horizontal da córnea. As mensurações do diâmetro horizontal da rima palpebral e do diâmetro horizontal da córnea foram realizadas utilizando-se paquímetro de aço inoxidável com visor de LCD e precisão de +/- 0,02 mm, em 31 olhos de 16 corujas (*Asio clamator*).

Para a mensuração do diâmetro horizontal da rima palpebral uma das extremidades do paquímetro foi posicionada sobre o vértice do ângulo medial do olho e, a outra extremidade, sobre o vértice do ângulo lateral. Já para a aferição do diâmetro horizontal da córnea, ambas as extremidades do paquímetro foram posicionadas sobre o limbo da córnea (Fig.2A e B).

**Paquimetria central de córnea.** A espessura central da córnea (ECC) foi mensurada em 28 olhos de 14 corujas, utilizando-se um paquímetro ultrassônico, que apresenta a velocidade de som na córnea pré-estabelecida em 1640m/s (Fig.2C). Previamente ao exame, instilou-se um colírio anestésico tópico estéril à base de cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% (Colírio Anestésico, Allergan, São Paulo, BR).

**Fundoscopia.** Os fundos dos olhos de 5 corujas foram examinados por meio de uma lente de 20 dioptrias e um transiluminador de Finoff (Fig.2D). Fotografias foram obtidas por meio do

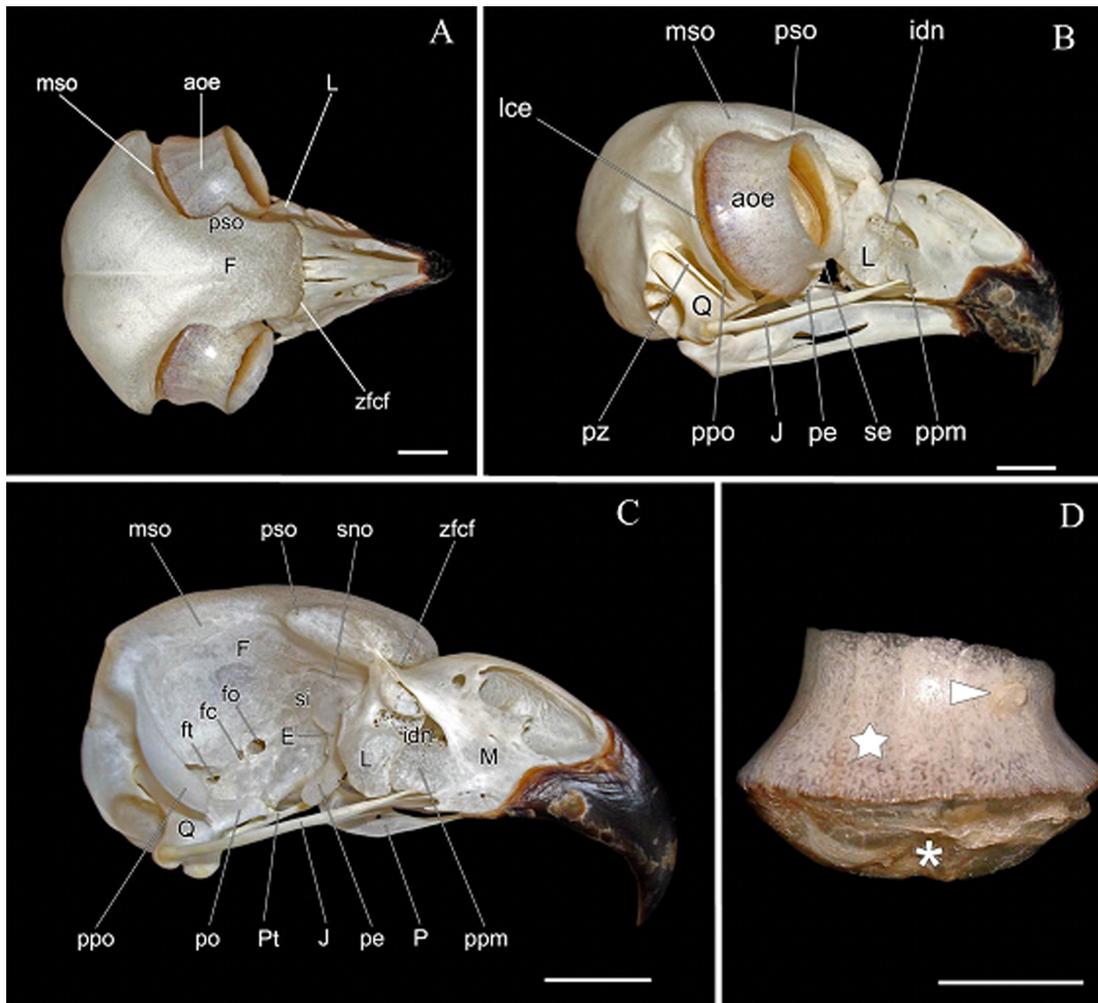


Fig.3. Elementos ósseos do esqueleto da cabeça de uma coruja-orelhuda (*Asio clamator*) adulta. (A) Aspecto dorsal. (B) Aspecto lateral direito. (C) Aspecto rostrolateral direito. A mandíbula e o anel de ossículos esclerais foram removidos. (D) Aspecto ventral do bulbo ocular direito após remoção dos tecidos moles. Notar a forma tubular do anel de ossículos esclerais (estrela) e como os ossículos laterais são mais longos em comparação aos mediais; o sesamoide da esclera (cabeça de seta) localizado anterior e medialmente, próximo à margem anterior do anel de ossículos esclerais, margem que correspondente à região do limbo da córnea no vivente; e a lâmina cartilaginosa da esclera (asterisco), fixa à margem posterior do anel de ossículos, em forma de cúpula. Legenda: aoe, anel de ossículos esclerais esquerdo; Osso frontal (F); osso lacrimal (L); margem supraorbital (mso); zona flexora craniofacial (zfcf); processo supraorbital (pso); incisura do ducto nasolacrimal (idn); osso jugal (J); lâmina cartilaginosa da esclera (lce); processo do osso ectetmoide (pe); processo palatino da maxila (ppm); processo pós-orbital (ppo); processo zigomático (pz); osso sesamoide da esclera (se). (E) Osso ectetmoide; forame comum para os nervos oculomotor III (fc), troclear IV e abducente VI; forame óptico (fo); forame do nervo trigêmeo V (ft); maxila (M); osso palatino (P); processo orbital do osso quadrado (po); osso pterigoide (Pt); osso quadrado (Q); septo interorbital, osso mesetmoide (si); sulco do nervo olfatório (sno). Barra = 1cm.

**Quadro 1. Quantidade de animais e olhos avaliados com os respectivos resultados estatísticos, obtidos para os diferentes testes de diagnóstico oftalmológicos em olho de corujas (*Asio clamator*)**

Exames	Nº de corujas	Nº de olhos	Média	Mediana	Desv Pad*	CV**
Teste lacrimal de Schirmer (mm/min)	16	30	5,03	5,00	3,29	0,65
Estesiometria (cm)	14	27	0,81	0,50	0,59	0,73
Diâmetro horizontal da rima palpebral (mm)	16	31	21,25	21,15	1,18	0,06
Diâmetro horizontal da córnea (mm)	16	31	15,76	16,50	2,74	0,17
Espessura da córnea central (mm)	13	26	0,29	0,29	0,03	0,11
Pressão intraocular (mmHg)	16	31	13,81	13,00	5,63	0,41

DesvPad\* = Desvio padrão; CV\*\* = Coeficiente de variação; Nº = Número; (mm/min) = milímetro por minuto; (mm) = milímetro; (mmHg) = milímetros de mercúrio.

biomicroscópio com lâmpada de fenda adaptado a um sistema de fotografia digital.

**Análise estatística.** Foi realizada análise de estatística descritiva, Teste-t quando houve comparação entre dois grupos (comparando olhos direitos e esquerdos ou animais machos e fêmeas) de dados contínuos numéricos (dados biométricos), Teste Exato de Fisher (para comparação de proporções) e Teste de Correlação de Bartlett (para comparar correlações das variáveis contínuas numéricas) utilizando o software JMP, versão 5.0.1 (Software JMP, versão 5.0.1, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados significativos quando o valor de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados numéricos obtidos para todos os testes oftálmicos utilizados nos animais desta pesquisa apresentaram uma distribuição normal, uma vez que os erros dos dados apresentaram distribuição normal de acordo com o Teste

Shapiro-Wilk. O Quadro 1 contém os resultados das análises estatísticas descritivas dos testes oftálmicos.

### Aspectos morfológicos da órbita óssea e da túnica fibrosa do bulbo ocular

Foi possível observar que, devido à forma tubular do bulbo ocular, os ossículos esclerais desta espécie apresentam forma retangular e côncava, com o eixo mais longo direcionado no sentido anteroposterior. A largura dos ossículos é nitidamente variável (Fig.3D). Dentre os quatro animais analisados, dois animais (50%) apresentavam 16 ossículos esclerais em ambos os olhos, um animal (25%) apresentava 15 em ambos os olhos e, por fim, um animal (25%) apresentava apenas 15 no olho direito e 16 no olho esquerdo. Neste último, o ossículo escleral supranumerário se apresentava mais curto que os demais e intercalado entre dois ossículos bem desenvolvidos, de modo que a sua extremidade anterior não participava da margem anterior do anel de ossículos esclerais, voltada limbo da córnea. Já a extremidade posterior deste ossículo participava da margem posterior do anel de ossículos esclerais, aquela contínua com a lâmina cartilaginosa da esclera e que denuncia



Fig.4. Imagem lateral do olho de uma coruja *Asio clamator*, evidenciando filoplumas em ambas as pálpebras, superior quanto inferior (setas), margem palpebral inferior mais extensa que a superior, margem palpebral irregular, demonstrando um desnível em "degrau" entre os limbos palpebrais anterior e posterior (asterisco), despigmentação na extremidade lateral da margem da terceira pálpebra e câmara anterior do olho profunda (DTP).

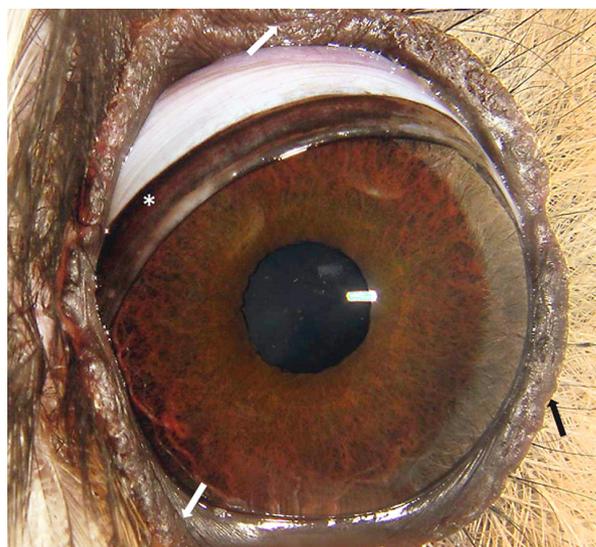


Fig.5. Olho esquerdo de uma coruja-orelhuda adulta, evidenciando a terceira pálpebra, de coloração esbranquiçada e margem pigmentada, que está localizada dorsomedialmente (asterisco). Notar a superfície irregular das margens palpebrais de ambas as pálpebras (setas).

o equador do bulbo ocular destes animais (Fig.3D). O osso sesamoide da esclera foi observado no aspecto ventral de todos os anéis de ossículos esclerais (Fig.3D).

A órbita óssea das corujas-orelhudas apresenta um curto processo supraorbital (Fig.3B,C), dirigido lateral e caudalmente, que se projeta do terço médio da margem supraorbital (Fig.3A-C), constituída pelo osso frontal. Tal processo provê área de fixação para a larga fâscia orbital, a qual tem papel na contenção do bulbo na órbita.

O processo pós-orbital (Fig.3B,C) é bem desenvolvido. Trata-se de um processo longo, largo e côncavo na sua face orbital. Projeta-se lateral e ventralmente da parte lateral da margem orbital, que em strigiformes é formada pelo osso frontal, de modo a acompanhar a curvatura da parte lateral do polo posterior do bulbo ocular. O processo pós-orbital constitui o limite lateral da cavidade orbital destas aves.

O septo interorbital (Fig.3C) é reduzido um tanto espesso e sendo constituído principalmente pelo osso mesetmoide, o qual abrange a parte rostral da parede medial da órbita. Não apresenta fontículos interorbitais, sendo, portanto, inteiramente ósseo. Em seu aspecto dorsal está localizado o sulco do nervo olfatório (I) (Fig.3C). Rostralmente, fundido ao osso mesetmoide, o osso ectetmoide (Fig.3C) contribui para a formação da parede rostral da órbita juntamente com o osso lacrimal (Fig.3B,C), localizado lateralmente a este. Entretanto apesar de relacionados, estes dois ossos não são fundidos e acabam por constituir uma parede rostral descontínua. A característica mais marcante do osso ectetmoide é um processo que se projeta em direção ventrolateral, o processo do ectetmoide (Fig.3B,C). Em similitude com o processo pós-orbital, o processo do ectetmoide é côncavo em sua face orbital e acompanha o contorno do bulbo ocular, mas no quadrante ventromedial da órbita. Sua extremidade livre está voltada para a extremidade livre do processo pós-orbital, de modo que o espaço entre as extremidades livres dos dois processos e o espaço entre estes e a parede medial da órbita constituem um assoalho orbital ósseo descontínuo, fechado basicamente por músculos relacionados à mandíbula e, no estado macerado, invadido pelo processo orbital do osso quadrado (Fig.3C).

O osso lacrimal (Fig.3A-C) é muito desenvolvido e constitui grande parte da parede rostral da órbita. Está articulado ao osso frontal e amplamente à maxila, desde a região da zona flexora craniofacial (Fig.3A,C), dorsalmente, se estendendo ventralmente até muito próximo ao osso jugal (Fig.3B,C); rostral e ventralmente mantém amplo contato com o desenvolvido e bulboso processo palatino da maxila (Fig.3B,C). Apresenta formato irregular, contornos rombos e delicadas trabéculas ósseas que lhe conferem um aspecto esponjoso, perceptíveis em seu interior através de suas paredes finas e, em algumas partes, fenestradas. O osso lacrimal não apresenta processo supraorbital (este está presente no osso frontal) e é sulcado lateralmente pela incisura do ducto nasolacrimal (Fig.3B,C) que se continua na maxila e se abre na cavidade medial.

Três forames são facilmente perceptíveis no fundo da órbita. O maior e mais rostral corresponde ao forame óptico, enquanto que os outros dois menores e mais caudais e ventrais, correspondem ao forame comum para os nervos

oculomotor (III), troclear (IV), abducente (VI) e ao forame do nervo trigêmeo (V) (Fig.3C), o mais caudal e ventral do conjunto.

### Observações gerais nos animais vivos

Todos os 16 animais submetidos ao exame físico apresentavam-se em boas condições de saúde. Ao exame oftálmico, somente um paciente apresentou luxação de lente unilateral, com edema de córnea no bulbo ocular direito, sendo este olho excluído da pesquisa. Destes 16 animais, sete (43,75%) eram fêmeas, quatro (25,00%) eram machos e cinco (31,25%) não foram sexados. Nesta pesquisa, nove (56,25%) eram adultos, três (18,75%) jovens, quatro (25%) dos animais não foram classificados, pois eram de vida livre. Portanto, 12 animais foram classificados apenas em adultos ou em jovens, não sendo possível calcular a média da idade da população dos animais avaliados.

O peso médio encontrado foi  $510,00 \pm 50,00$ g. Foi observado que as fêmeas eram significativamente mais pesadas que os machos, apresentando peso médio de  $510,00 \pm 51,75$  g e os machos  $490,00 \pm 68,50$  g,  $P = <0001$ . Contudo, não houve diferença significativa entre idade aproximada e peso médio dos animais ( $P = 0,52$ ).

### Observações da morfologia ocular externa em animais vivos

Externamente, é facilmente perceptível que os olhos de coruja *Asio clamator* são voltados rostralmente. As pálpebras são relativamente finas e móveis, sendo que a inferior é maior que a superior. A pálpebra inferior apresenta, na maior parte do tempo, maior mobilidade quando comparada com a superior. Contudo, foi observado que em algumas situações a pálpebra superior movimentava-se com maior intensidade. O ângulo lateral do olho é maior do que o ângulo medial e a abertura total da rima palpebral é relativamente larga quando comparada ao diâmetro da córnea e ao tamanho do bulbo ocular. A margem palpebral é pigmentada, irregular e apresenta um desnível em “degrau” entre os limbos palpebrais anterior e o posterior. Há delicadas filoplumas (cílios modificados) em ambas as pálpebras (Fig.4). Dois pontos lacrimais, um superior e outro inferior, estão presentes na margem das respectivas pálpebras, na região do ângulo medial de ambos os olhos.

A terceira pálpebra está localizada dorsomedialmente no saco conjuntival, entre a pálpebra superior e o bulbo ocular. É relativamente espessa e de coloração esbranquiçada, não possibilitando a visualização das estruturas intraoculares ao recobrir a superfície corneana. Em alguns exemplares tende a azulada. Em sua margem é possível observar uma faixa pigmentada marrom-escura, que diminui de intensidade à medida que se aproxima do ângulo lateral do olho e termina por desaparecer por completo (Fig.5). A terceira pálpebra de corujas *Asio clamator* é uma estrutura extremamente móvel e seu movimento se dá em direção ventrolateral.

A íris apresenta diferentes graus de pigmentação, variando entre o marrom escuro nos animais adultos e nos jovens de amarelado a marrom claro. As pupilas possuem formato circular, movimento voluntário e é possível obser-

var uma pequena parte do epitélio pigmentar da íris na margem pupilar (Fig.6).

Com relação aos reflexos pupilares, as corujas avaliadas não apresentaram resposta ao reflexo direto e ao consensual, contudo, foi observado que dois animais apresentaram anisocoria, provavelmente por estresse, logo após a contenção, sendo que as pupilas retornaram a dilatação normal quando as corujas estavam em situação de repouso após cerca de 20 minutos.

Os ligamentos pectinados nestas aves são mais desenvolvidos que nos mamíferos sendo que as malhas trabeculares são extensas, particularmente no nível do ângulo lateral do olho. Nos animais jovens parte da malha trabecular encontra-se não apenas no ângulo iridocorneano, mas é também visível na superfície periférica da íris, podendo-se observar os espaços entre os ligamentos pectinados, espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana), sem o

uso de lente para gonioscopia. Nos animais adultos, os ligamentos pectinados, espaços do ângulo iridocorneano e até mesmo parte da malha trabecular, ainda estão aparentes ao olho desarmado. Entretanto, a extensão de tais ligamentos e o espaçamento entre eles nitidamente diminuem conforme as corujas envelhecem (Fig.6).

A lente nesta espécie é transparente, contudo nas aves mais jovens (com aproximadamente um mês de idade) foi observada leve opacidade de localização central (nuclear), que após aproximadamente dois meses de vida começou a diminuir, tornando-se translúcida quando as aves chegam a idade adulta (entre três e quatro meses de idade) (Fig. 7A,B).

#### Teste lacrimal de Schirmer

O valor médio geral encontrado no Teste Lacrimal de Schirmer foi de  $5,03 \pm 3,28$  mm/min. De acordo com o

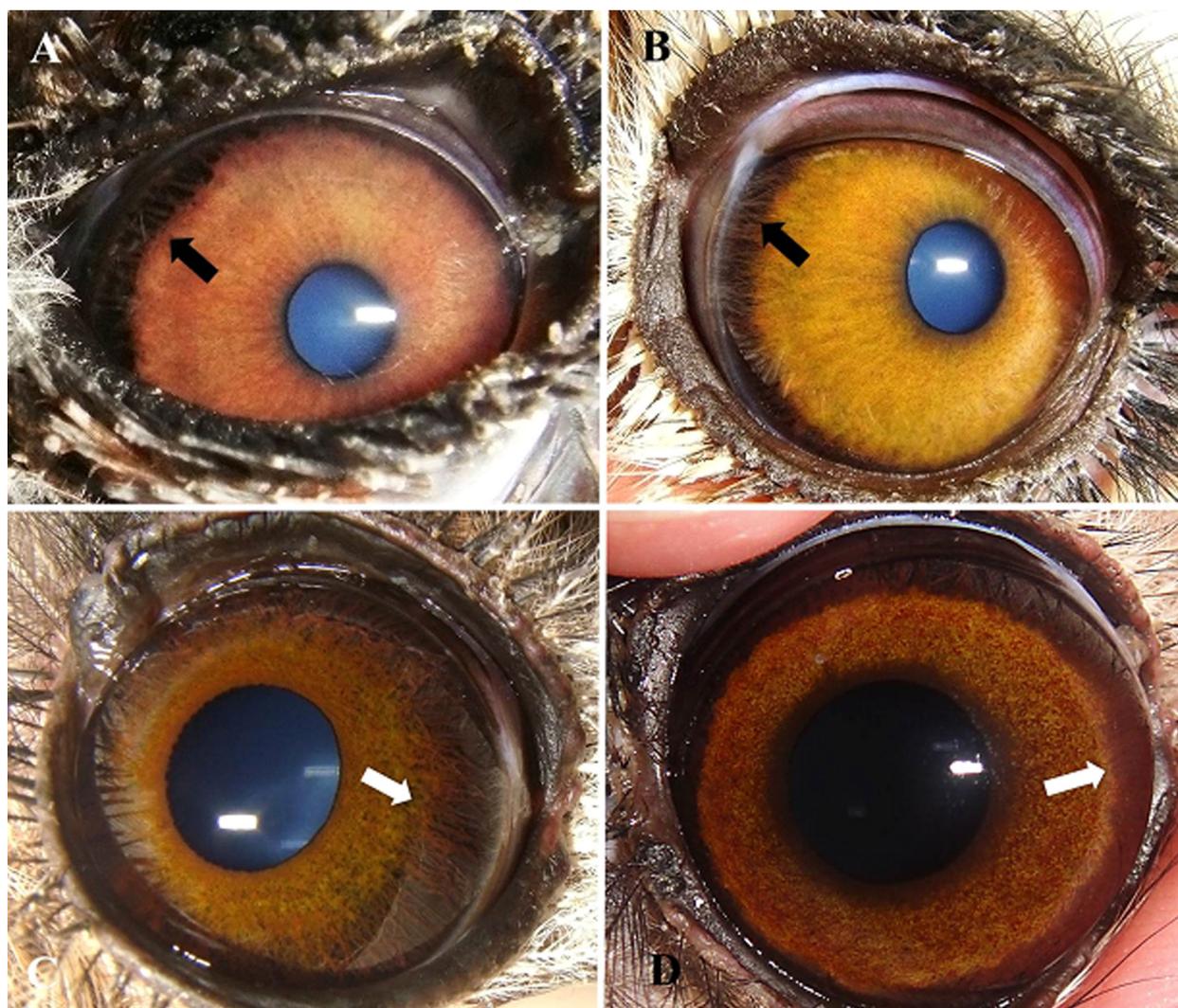


Fig.6. Íris de olhos de corujas-orelhudas em diferentes faixas etárias, evidenciando as diferentes colorações, os ligamentos pectinados e os espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana) observáveis sobre na superfície da íris. (A) Ligamentos pectinados do olho direito de uma coruja de aproximadamente um mês de idade. Observar a grande extensão dos ligamentos pectinados e o espaçamento entre eles, e a coloração marrom clara. (B) Ângulo iridocorneano do olho direito de uma coruja jovem evidenciando espaços menores entre os ligamentos pectinados e coloração mais amarelada. (C,D) Ângulo iridocorneano do olho esquerdo de uma coruja idosa; notar os ligamentos pectinados ainda aparentes, mas curtos e com espaçamento pequeno entre si e ambos apresentam coloração marrom escura.

**Quadro 2. Gêneros bacterianos e frequência de bactérias encontradas em olhos de corujas-orelhudas saudáveis**

Bactérias - Gênero	Nº de bactérias	% de bactérias	Espécie das bactérias
TOTAL DE GRAM-POSITIVA	20	90,90%	
<i>Staphylococcus</i> sp.	18	81,82	
sp.	4	18,18	<i>Staphylococcus</i> sp.
SCP	8	36,35	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
SCN	6	27,27	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	1	4,54	
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	4,54	
TOTAL DE GRAM-NEGATIVAS	2	9,1	
Enterobacteria	2	9,1	
<i>E. coli</i>	1	4,55	
<i>Serratia</i> sp.	1	4,55	
TOTAL DE BACTÉRIAS ISOLADAS	22	100	

SCP = *Staphylococcus* coagulase positivo; SCN = *Staphylococcus* coagulase negativo.

sexo, as fêmeas apresentaram a média de  $6,64 \pm 3,85$  mm/min, já os machos de  $4,16 \pm 2,40$  mm/min, e de acordo com a idade, foi mensurado nos jovens  $4,00 \pm 3,09$  mm/min e  $6,25 \pm 3,58$  mm/min nos adultos. Não houve diferença significativa do Teste Lacrimal de Schirmer entre machos e fêmeas ( $P=0,16$ ), adultos e jovens ( $P=0,19$ ) e olhos direito e esquerdo ( $P=0,62$ ).

**Análise microbiológica**

Foram isoladas 22 tipos de bactérias, em 23 amostras oculares obtidas de 12 corujas. O Quadro 2 traz os resultados condensados das análises microbiológicas encontrada em olhos de corujas. Os resultados da cultura revelaram que houve crescimento bacteriano nas amostras, em 21 dos 23 olhos (91,3%), sendo que apenas 2 (9,52%) amostras foram negativas. No total de amostras positivas, foram isoladas 20 (90,9%) bactérias classificadas em Gram-positivas e apenas 2 (9,09%) amostras foram Gram-negativas. As bactérias encontradas na microbiota ocular das corujas deste estudo incluem: *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. *Coryne-*

*bacterium* sp., todas Gram-positivas. Dentre as Gram-negativas foram isoladas apenas *E. coli* e *Serratia* sp. (Quadro 2). Neste estudo, as bactérias mais frequentes na microbiota ocular dos animais foram os *Staphylococcus* sp., sendo encontrado em 18 (81,83%) amostras (Quadro 2).

**Estesiometria da córnea**

A média geral de estesiometria foi de  $0,80 \pm 0,59$  cm para a população estudada. O valor médio encontrado nas fêmeas foi  $1,00 \pm 0,51$  cm e nos machos  $0,64 \pm 0,61$  cm. Os animais jovens apresentaram média de  $1,2 \pm 0,28$  cm e os adultos de  $0,86 \pm 0,65$  cm. Não foi encontrada diferença significativa das médias de estesiometria com relação à idade (adultos ou jovens) ( $P=0,22$ ), entre machos e fêmeas ( $P=0,23$ ) ou entre olhos direito e esquerdo ( $P=0,53$ ).

**Pressão intraocular (PIO)**

A média geral da PIO foi de  $13,81 \pm 5,62$  mmHg da população estudada. As fêmeas apresentaram média de  $14,35 \pm 4,58$  mmHg e os machos de  $13,143 \pm 4,88$  mmHg. A média de pressão intraocular encontrada nos jovens foi de  $16,83 \pm 3,86$  mmHg e nos adultos de  $12,29 \pm 4,41$  mmHg. A PIO nas aves jovens foi significativamente maior que nas aves adultas ( $P=0,036$ ). Não houve diferença significativa das médias obtidas entre os sexos ( $P=0,58$ ) ou entre os olhos direito e esquerdo ( $P=0,79$ ).

**Diâmetro horizontal da rima palpebral e diâmetro horizontal da córnea**

O valor médio horizontal geral para a rima palpebral foi de  $21,24 \pm 1,17$  mm para a população estudada. A média obtida para os machos foi  $22,18 \pm 0,95$  mm e para fêmeas  $21,02 \pm 1,09$  mm. A média encontrada para jovens foi de  $20,43 \pm 0,97$  mm e em adultos foi de  $21,78 \pm 0,97$  mm. Foi observado que os machos apresentam o diâmetro horizontal da rima palpebral significativamente maior que as fêmeas ( $P=0,027$ ), e nos jovens é significativamente menor que nos adultos ( $P=0,008$ ).



Fig.7. Face de dois aves em diferentes faixas etárias. (A) Coruja jovem de aproximadamente um mês, é possível notar a opacidade da lente em ambos os olhos. (B) Coruja adulta, apresentando translucidez da lente bilateralmente.

A média geral do diâmetro horizontal da córnea foi de  $15,7 \pm 2,74$  mm para a população estudada. O comprimento médio encontrado nos machos foi de  $17,57 \pm 0,48$  mm e de  $14,12 \pm 3,40$  mm para fêmeas. Nos jovens a média foi de  $13,63 \pm 3,29$  mm e  $16,02 \pm 2,87$  mm para os adultos. Os machos tiveram o diâmetro da córnea significativamente maior que as fêmeas ( $P=0,016$ ). Não houve diferença significativa quando o diâmetro horizontal da córnea das corujas adultas e jovens foi comparado ( $P=0,10$ ), e do olho direito e esquerdo ( $P=0,99$ ).

### Espessura central da córnea

O valor médio da espessura central da córnea para a população estudada foi de  $0,28 \pm 0,03$  cm. Para fêmeas a espessura média foi de  $0,29 \pm 0,02$  cm o qual foi significativamente menor ( $P=0,03$ ) que a espessura observada em machos desta espécie  $0,31 \pm 0,02$  cm. Com relação à idade dos animais, observou-se pouca diferença na espessura central da córnea entre jovens e adultos, os quais os valores médios encontrados foram  $0,30 \pm 0,02$  cm e  $0,30 \pm 0,024$  cm, respectivamente. Não foi observada diferença significativa com relação à idade ( $P=0,71$ ) ou aos olhos direito e esquerdo ( $P=0,68$ ).

### Fundoscopia

Somente em cinco corujas que responderam à contenção física em ambiente escuro com midríase, foi possível observar padrão anangiótico e atepetal na retina. A coróide é altamente vascularizada, com vasos evidentes e distribuídos em um padrão radial a partir de uma faixa central imaginária, onde tais vasos, por vezes, se entrelaçam (Fig.2D). Da superfície do nervo óptico se protrui, em direção ao corpo vítreo, uma estrutura denominada pecten ocular, em formato plissado, similar a um pente, altamente pigmen-

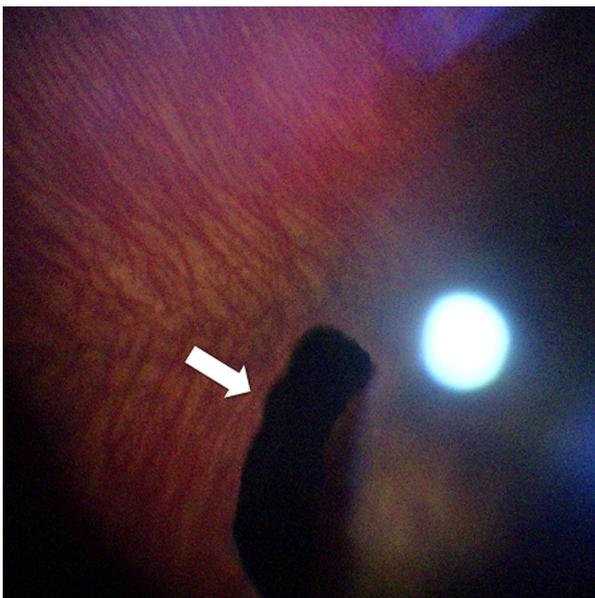


Fig.8. Fundo de olho de uma coruja-orelhuda adulta capturada por oftalmoscopia indireta. Observar a intensa vascularização coroidal, com vasos em disposição radial a partir de uma faixa central imaginária na qual tais vasos, por vezes, se entrelaçam, e a presença do pecten ocular (seta).

tada (Fig.8). Foi possível de se observar ainda uma fóvea bem desenvolvida em algumas aves, localizada dorsolateralmente ao pecten ocular.

### DISCUSSÃO

Devido ao fato dos animais examinados terem sido originalmente de vida livre, não foi possível obter a idade exata de cada exemplar, apenas aproximada. No presente estudo, observou-se diferença significativa de pesos entre os sexos das corujas-orelhudas (*Asio clamator*), sendo que as fêmeas são mais pesadas. Esta diferença entre sexos já foi descrita anteriormente em outros rapinantes. Esta característica é mais evidente em falconídeos que nas corujas, podendo ser em decorrência do chamado dimorfismo sexual reverso que estas aves apresentam (Weidensaul 1996, Pereira, 2007). Nosso achado corrobora também com alguns relatos, que afirmam que as fêmeas são mais pesadas nos rapinantes que se alimentam de serpentes e roedores, como é o caso das corujas *Asio clamator* (Del Hoyo, Sargatal & Elliot 1994, Pereira, 2007).

Como já demonstrado em outros animais da ordem Strigiformes (Curtis & Miller 1938), observamos na coruja-orelhuda que os ossículos esclerais apresentam forma retangular e côncava, com o eixo mais longo direcionado no sentido anteroposterior, apresentando uma largura nitidamente variável, isto em decorrência da forma tubular do bulbo ocular destas aves (Franz-Odendaal & Hall 2006, Lima et al. 2009, Menegaz & Kirk 2009). A forma individual dos ossículos esclerais varia entre as aves de achatada ou ligeiramente convexa a côncava, de acordo com o formato geral do bulbo ocular (Baumel et al. 1993, Lima et al. 2009). Este arranjo tem importante papel na acomodação da córnea e na proteção do bulbo ocular (Franz-Odendaal & Hall 2006, Lima et al. 2009). A quantidade de ossículos esclerais variaram entre 15-16, corroborando Mahecha & Oliveira (1998) que encontraram variação de 14-16 ossículos esclerais em corujas da família Titiidae e Stringidae, e Lima et al (2009), que encontraram 15 ossículos esclerais em cada anel de ossículos em corujas da espécie *T. alba*. Porém, o bulbo ocular destes animais, as coruja-das-torres (*T. alba*), é relativamente pequeno, provavelmente, pelo fato do crânio desta espécie ser mais estreito comparativamente ao de outras corujas (Mahecha & Oliveira 1998). Diversos estudos afirmam que o anel escleral é composto por ossículos que podem apresentar-se em quantidade variável e possuir formatos diferentes entre si, variando amplamente entre as diferentes espécies de aves (Curtis & Miller 1938, De Queiroz & Good 1988, Warheit, Good & De Queiroz 1989, Lima et al. 2009, Menegaz & Kirk 2009), reptéis e teleosteos (Franz-Odendaal & Hall 2006).

O osso sesamoide da esclera foi observado no aspecto ventral de todos os anéis de ossículos esclerais das corujas-orelhudas analisadas. Segundo Mahecha & Oliveira (1998), relatam que tal osso sesamoide foi observado apenas nas corujas, apresentando dimensões e formas variadas nas diferentes espécies estudadas. Ocasionalmente pode ser duplo, como na coruja jacurutu (*Bubo virginianus*) (Mahecha & Oliveira 1998). O osso sesamoide tem a função de redirecionar o trajeto do tendão do músculo piramidal da terceira pálpebra (Baumel et al. 1993, Mahecha & Oliveira 1998).

A órbita óssea das corujas-orelhudas apresentou algumas particularidades distintas, dentre elas um curto processo supraorbital, dirigido lateral e caudalmente, projetado do terço médio da margem supraorbital, constituído pelo osso frontal (Pycraft 1902). Tal processo provê área de fixação para a larga fâscia orbital que contribui para a manutenção do bulbo ocular na órbita e que se continua pela parte caudal da margem supraorbital e processo pós-orbital (Pycraft 1902). Outra peculiaridade observada é o processo pós-orbital que é bem desenvolvido. Trata-se no caso de um processo longo, largo e côncavo na sua face orbital, projetando-se lateral e ventralmente da parte lateral da margem orbital, que em strutioniformes é formada pelo osso frontal (Baumel et al. 1993), de modo a acompanhar a curvatura da parte lateral do polo posterior do bulbo ocular. Aparentemente, as corujas são as únicas aves nas quais o processo pós-orbital, pelo fato de ser largo, isola a órbita da fossa lateral (Menegaz & Kirk 2009). Adicionalmente foi observado que o septo interorbital é reduzido, um tanto espesso e não apresenta fontículos interorbitais, sendo, portanto, inteiramente ósseo. Esta característica é observada nas espécies *Asio*, *Photodilus*, *Bubo* (Pycraft 1902) e na espécie *Strinx* que também apresenta o septo interorbital relativamente espesso, comparativamente a outras espécies de corujas (Shufeldt 1900). Sendo assim, o septo interorbital de corujas-orelhudas é diferente da ampla e delgada lâmina óssea presente na maioria das outras ordens de aves, apresentando tecido ósseo esponjoso entre suas finas lâminas de osso compacto (Pycraft 1902, Baumel et al. 1993). O osso lacrimal (Fig.1-3) é muito desenvolvido e constitui grande parte da parede rostral da órbita, mantendo amplo contato com o desenvolvido e bulboso processo palatino da maxila presente neste gênero (Pycraft 1902). Três forames foram identificados no fundo da órbita, corroborando com os achados de Pycraft (1902) que demonstram que o maior e mais rostral corresponde ao forame óptico, enquanto que os outros dois menores, mais caudais e ventrais, correspondem ao forame comum para os nervos oculomotor (III), troclear (IV) e abducente (VI) e ao forame do nervo trigêmeo (V) (Figura 3), o mais caudal e ventral do conjunto.

Nas corujas *Asio clamator*, em algumas situações, há grande movimentação da pálpebra superior no ato de piscar em decorrência da movimentação da terceira pálpebra, com frequência de movimentos maior do que a pálpebra inferior. Em outras situações a pálpebra inferior move-se com maior intensidade. Isto pode estar associado ao estresse ou nervosismo destes animais, frente a situações em que se sentem ameaçados (Sick 1993). Nas aves em geral, as pálpebras comumente são finas, mais susceptíveis aos traumas e apresentam pouco movimento, sendo que as pálpebras inferiores são mais móveis que as superiores (Murphy 1993, Williams 1994, Gelatt 1999, Montiani-Ferreira 2001), principalmente em situação de tranquilidade (Sick 1993). Nas corujas-orelhudas observou-se que o movimento da terceira pálpebra ocorre no sentido ventrolateral, diferente dos cães e gatos, espécies nas quais a terceira pálpebra se movimenta no sentido dorsolateral devido esta estrutura estar localizada ventromedialmente no saco conjuntival, entre a pálpebra inferior e o bulbo

ocular (Maggs, Miller & Ofri 2008). Nos rapinantes diurnos, este movimento ocorre do ângulo medial do olho em direção lateral (Murphy 1993). Nas corujas estudadas, foi observado que a terceira pálpebra é espessa, apresenta coloração esbranquiçada e não é translúcida como em muitas outras aves (Gelatt 1999, Montiani-Ferreira 2001, Harris et al. 2008, Maggs et al. 2008). Em sua margem apresentam pigmentação, como observado em alguns cães (Maggs et al. 2008).

As aves apresentam as margens palpebrais altamente pigmentadas e não apresentam glândulas tarsais (Murphy 1993, Montiani-Ferreira 2001, Harris et al. 2008), diferentemente dos canídeos, felinos domésticos (Maggs, Miller & Ofri 2008) e seres humanos (Liesegang, Skuta & Cantor 2005). Nas pálpebras de corujas-orelhudas, percebeu-se que as margens, são irregulares e associadas aos folículos das filoplumas. Além disso, um desnível em “degrau” é nitidamente perceptível entre os limbos palpebrais anterior e posterior de ambas as pálpebras. O ângulo lateral do olho é aparentemente maior que o ângulo medial e foi notado que as pálpebras inferiores são maiores que as superiores diferentemente do que foi encontrado por Harris et al. (2008), que destacaram que a pálpebra superior das corujas *Megascops asio*, é maior que a inferior. As filoplumas são cílios modificados que estão presentes em ambas as pálpebras de corujas e são estruturas observadas apenas em aves (Murphy 1993, Montiani-Ferreira 2001, Harris et al. 2008).

A cor da íris, bem como o formato da pupila, podem variar de acordo com a espécie dos indivíduos (Gelatt 1999), podendo também alterar-se entre os animais, dependendo da quantidade e tipos de pigmentos, do grau de vascularização (Gelatt 1999), da idade (Gelatt 1999) e sexo (Bortolotti et al. 2003). Em aves a dieta também pode influenciar na coloração da íris (Gelatt 1999). Como os animais vieram de diferentes criatórios, as dietas podem ter influenciado a coloração da íris destes animais. Contudo, verificou-se que nas corujas-orelhudas a influência da idade na coloração da íris. Os animais jovens, até aproximadamente quatro meses de vida, apresentavam íris mais clara, variando de castanho amarelado a castanho claro. Nos animais com idade além desta, a íris tornou-se marrom escura, podendo este fenômeno estar relacionado com a presença de purinas e de pteridinas (Gelatt 1999, Bortolotti et al. 2003), sendo isto observado principalmente em pombas e nas corujas jacurutu (*Bubo virginianus*) (Gelatt 1999).

No presente estudo dois animais apresentaram anisocoria fisiológica, provavelmente em decorrência do estresse da contenção, sendo este fenômeno comumente descrito em aves em situações de estresse (Montiani-Ferreira 2001, Harris et al. 2008).

Quanto ao ângulo iridocorneano, pode-se observar que a malha trabecular estende-se pelo estroma da íris. Isto ocorre porque no ângulo iridocorneano das aves, a extensão lateral da câmara anterior, situada entre a íris e a córnea, é altamente desenvolvida e estende-se posteriormente, entre o corpo ciliar e a esclera, onde recebe o nome de seio cílioscleral (Evans & Martin 1993). Este seio é atravessado por uma grande rede de fibras elásticas que constituem os ligamentos pectinados com largas aberturas, os chamados

espaços do ângulo iridocorneano (Espaços de Fontana). Nos animais investigados os mais jovens apresentavam espaçamento entre os ligamentos pectinados, enquanto que, nos adultos, a malha trabecular pareceu estar mais desenvolvida, com espaçamentos menos evidentes ou ausentes.

A mensuração lacrimal é parte importante do exame oftálmico e tem como objetivo avaliar o funcionamento da glândula lacrimal, sendo possível mensurar em mamíferos, reptéis e aves por meio do Teste Lacrimal de Schirmer-1 (TLS) (Montiani-Ferreira 2001). Com relação aos rapinantes noturnos, não há relatos da mensuração do Teste Lacrimal de Schirmer em corujas-orelhudas. A produção lacrimal que encontramos foi de  $5,03 \pm 5,00$  mm/min, diferiu substancialmente do resultado encontrado em 21 olhos de corujas-screech-oriental (*Megascops asio*) nas quais a média foi de  $< 2$  mm/min (Harris et al. 2008). Outros estudos em diferentes espécies de aves, já foram realizados, como nos psitacíformes que apresentaram  $3,2 \pm 2,7$  a  $7,5 \pm 2,6$  mm/min de produção lacrimal e nas pombas africanas que foi de  $4,5 \pm 1$  mm/min (Williams 1994). Dentre os rapinantes diurnos, os Accipitriformes apresentaram uma produção lacrimal bem maior que os Falconiformes, que foi de  $10,7 \pm 4,0$  a  $11,5 \pm 5,4$  mm/min e de  $4,1 \pm 2,7$  a  $14,4 \pm 7,2$  mm/min, respectivamente (Harris et al. 2008). Provavelmente as diferenças de valores encontrada nas diferentes espécies de aves podem estar relacionadas com a adaptação ao meio ambiente natural no qual cada uma vive, tamanho da órbita, tamanho e função da glândula lacrimal (Williams 1994), além da conformação e do movimento das pálpebras.

A microbiota conjuntival normal tem sido estudada em diferentes mamíferos e animais selvagens, pois pode auxiliar eventualmente na escolha da melhor conduta terapêutica, frente a processos infecciosos. Dentre os animais investigados encontram-se aves (Dupont et al. 1994, Williams 1994, Harris et al. 2008, Bayón et al. 2007), porcos (Davidson et al. 1994), cães (Moore & Nasisse 1995), gatos (Shewen et al. 1980), cavalos (Andrew et al. 2003), cervo (Dubay et al. 2000), macacos-prego (Galera et al. 2002, Montiani-Ferreira et al. 2008b), bugio (Galera et al. 2002), capivaras (Montiani-Ferreira et al. 2008a), castores (Cullen 2003), furão-europeu (Montiani-Ferreira et al. 2006), chinchilas (Lima et al. 2010, Müller et al. 2010), gambás (Pinard et al. 2002, Spinelli et al. 2010), racoon (Pinard et al. 2002, Spinelli et al. 2010), coelhos (Cooper et al. 2001), entre outras. Neste estudo, assim como a grande maioria dos mamíferos (Shewen et al. 1980, Davidson et al. 1994, Dupont et al. 1994, Williams 1994, Moore & Nasisse 1995, Dubay et al. 2000, Pinard et al. 2002, Cullen 2003, Montiani-Ferreira et al. 2006, Bayón et al. 2007, Harris et al. 2008, Montiani-Ferreira et al. 2008a, 2008b, Lima et al. 2010, Spinelli et al. 2010), a predominância foi de isolados bacterianos Gram-positivos, com maior prevalência do *Staphylococcus* sp. e em menor frequência *Micrococcus* sp., e *Corynebacterium* spp. Estas bactérias fazem parte microbiota conjuntival normal destes animais, mas são oportunistas e podem se tornar patogênicas em situações específicas (Moore & Nasisse 1995). Nas corujas deste estudo, a maioria das bactérias Gram-negativas foram da família Enterobacteriaceae, dentre elas *E. coli*, e *Serratia* sp. Corroborando com estu-

dos que afirmam que o isolamento de *E. coli* em olhos de animais é um achado relativamente comum, e sendo igualmente descrito em outras espécies de corujas, falconiformes (Dupont et al. 1994, Harris et al. 2008) entre outras espécies animais. Por serem bactérias habitantes naturais do intestino de mamíferos, são excretadas pelas fezes, podendo sobreviver em partículas fecais, na poeira e em água por meses (Quinn 1994). Assim como no caso das *E. coli*, estas bactérias não parecem serem residentes do olho e sim, agentes transitórios. Portanto, o seu isolamento neste estudo pode indicar possível contaminação fecal, sendo neste caso, apenas uma bactéria transitória da conjuntiva.

O estesiometro de Cochet-Bonnet tem como objetivo avaliar a sensibilidade da córnea através do limiar de toque da sua superfície, sendo a utilização deste instrumento calibrado recentemente bem estabelecida na medicina veterinária. Para tanto, pesquisas com diversas espécies de animais já foram realizadas, exceto em corujas-orelhudas, as quais apresentaram menor sensibilidade corneana média ( $0,81 \pm 0,59$  cm) em relação aos porcos-da-índia ( $2,0 \pm 0,6$  cm) (Trost, Skalicky & Nell 2007), aos Hispaniolan parrot ( $1,33 \pm 1,06$  cm) (Storey 2009), aos gatos domésticos ( $2,8$  cm) (Chan-Ling 1989, Blocker & Van der Woerd 2001), aos cavalos ( $5,01 \pm 0,61$  cm) (Brooks et al. 2000, Rankin et al. 2003) e aos seres humanos ( $5,3$  cm) (Millodot 1969). Esta menor sensibilidade corneana observada nas corujas-orelhudas e nos Hispaniolan parrot pode ocorrer para permitir que a visão durante o vôo não seja obstruída por lacrimajamento excessivo (Storey 2009). Vale ressaltar que as corujas jovens ( $1,25 \pm 0,28$  cm) foram mais sensíveis que as corujas adultas ( $0,86 \pm 0,65$  cm), corroborando com estudos em outras espécies, como em gatos domésticos (Blocker & Van der Woerd 2001), cavalos e em alpacas que apresentaram sensibilidade corneana significativamente maior em filhotes (Brooks, Clark & Lester 2000, Rankin et al. 2012). Millodot (1977) afirma em seu estudo, comparando a influência da idade na sensibilidade corneana de seres humanos que pessoas de 7-40 anos de idade apresentam maior sensibilidade. Porém, após os 50 anos, a sensibilidade vai diminuindo significativamente e o autor ainda questiona se esta alteração é decorrente do espessamento da estrutura fibrosa da córnea, da diminuição do teor de água ou da atrofia das fibras nervosas (Millodot 1977).

A PIO já foi relatada em algumas aves e em diferentes espécies de corujas, contudo não há relatos da PIO em corujas *Asio clamator*. Os valores de PIO relatados variaram consideravelmente entre as diferentes espécies de corujas, como nas corujas jacurutu (*Bubo virginianus*) que apresentaram média de PIO de  $7,1 \pm 1,1$  mmHg, relativamente menor que a encontrada nas outras espécies (Rayment & Williams 1997). Contudo o instrumento utilizado nesta ocasião foi a tonometro de Schiotz (Rayment & Williams 1997), que pode ter levado a esse tipo de diferença. Nas corujas bufoniformes (*Bubo bubo*), que atualmente são as maiores corujas relatadas, a média encontrada foi de  $9,35 \pm 1,81$  mmHg (Jeong et al. 2007). Nas corujas scheech-oriental (*Megascops asio*) as médias encontradas foram de  $11 \pm 1,9$  mmHg (Harris et al. 2008). Já nas corujas mocho-galego (*Athene noctua*), que são aves pequenas, as médias de PIO

(19,15mmHg) (Bayón et al. 2006) foram muito maiores às que as médias obtidas para a espécie investigada no presente estudo (13,81±5,63mmHg). Valores maiores de PIO também foram observados em três espécies de falconídeos, os águia-calçada, (*Aquila pennata*) 16,19±3,49mmHg (Bayón et al. 2006), na águia-cobreira (*Circaetus gallicus*) 20±5,92mmHg (Bayón et al. 2006) e águia-de-bonelli, (*Aquila fasciata*) 19,61±2,43mmHg (Bayón et al. 2006). Em outras espécies de aves a PIO também foi avaliada, como nos perus (25mmHg) (Bayón, Almela & Talavera 2007) e nos Psitacídeos (20-25mmHg) (Bayón et al. 2007), sendo estes resultados, maiores que os valores mensurados nas corujas deste estudo. Estas discrepâncias encontradas entre os strigiformes, falconídeos e outras famílias de aves ocorrem, provavelmente, devido às diferenças nos instrumentos empregados em cada estudo, diferenças nas formas dos bulbos oculares entre estas espécies, influencia do ciclo circadiano na regulação e formação do humor aquoso (Pereira et al. 2011) e por último, devido às diferenças no mecanismo de acomodação ocular entre as diferentes aves (Glasser & Howland 1996).

No presente estudo, apesar das corujas fêmeas serem significativamente maiores que os machos, a média do diâmetro horizontal da rima palpebral encontrada foi maior nos machos e nos adultos. Como algumas corujas se encontravam ainda em crescimento, também foi observada diferença no diâmetro horizontal da rima palpebral entre jovens e adultos. Com relação ao diâmetro horizontal da córnea das corujas-orelhudas deste estudo, a média encontrada foi de 15,7±2,74mm, corroborando com os achados em corujas scheech-oriental (*Megascops asio*) (15,5±0,5mm), que foram semelhantes (Harris et al. 2008). Contudo, em nosso estudo observamos que a córnea dos machos (17,57±0,48mm) é significativamente maior que as das fêmeas (14,12±3,40mm) fato ainda não relatado em outras espécies (Williams 1994, Cullen 2003, Harris et al. 2008).

Algumas pesquisas com o paquímetro ultrassônico avaliando a espessura central da córnea em aves já foram realizadas nas aves de rapina. No entanto, este é o primeiro relato da mensuração de espessura central da córnea em corujas *Asio clamator* (0,29±0,03mm). A espessura central da córnea desta espécie foi maior que as encontradas em coruja mocho-galego (*Athene noctua*) (0,14±0,018mm) (Bayón et al. 2006) e na espécie de corujas bufo-real (*Bubo bubo*) (0,24±0,008 mm) (Bayón et al. 2006). Comparando nossos resultados com os resultados obtidos em outra espécie de ave, nosso dado foi ainda maior que o encontrado nas galinhas 0,24±0,0004mm (Montiani-Ferreira et al. 2004). Por sua vez, menores do que nos diferentes mamíferos já estudados como furão-europeu (0,33±0,02mm) (Montiani-Ferreira et al. 2006), macacos-prego (0,46mm) (Montiani-Ferreira et al. 2008b), capivaras (0,48±0,03mm) (Montiani-Ferreira et al. 2008a), gatos domésticos (0,57±0,012mm) (Moodie et al. 2001) e seres humanos (0,52±0,03 mm) (Ashwin et al. 2009). Corroborando com Prince (1956), que afirmam que a espessura central da córnea em aves, de forma geral, é mais fina que em outras espécies. Contudo a razão para este fato não está bem elucidada, podendo ocor-

rer em função da forma do bulbo ocular e pela presença da lâmina cartilaginosa da esclera. Discordando desta ideia geral, achados em outras aves de rapina, como nos falconídeos, mostram que a espessura corneana média encontrada na águia-calçada (*Aquila pennata*) 0,58±0,05mm, na águia-cobreira (*Circaetus gallicus*) 0,60±0,05mm e águia-de-bonelli, (*Aquila fasciata*) 0,63±0,02mm foram maiores que nas corujas deste estudo e até mesmo que nos seres humanos (Bayón et al. 2006).

Apesar das fêmeas deste estudo serem mais pesadas, suas córneas foram significativamente mais finas que as dos machos. O mesmo fenômeno ocorreu nas chinchilas (Lima et al. 2010) e em crianças (Sahin et al. 2008), contudo não foi encontrado relatos sobre este fenômeno em aves na literatura. Em contrapartida, em capivaras (Montiani-Ferreira et al. 2008a), furão-europeu (Montiani-Ferreira et al. 2006) e seres humanos adultos (Sánchez-Tocino et al. 2007) o oposto ocorreu, as córneas das fêmeas foram mais espessas comparativamente aos machos de suas respectivas espécies.

Não foi realizada fundoscopia em todas as corujas-orelhudas examinadas, uma vez que foi encontrada certa dificuldade em sua execução em decorrência da miose parcial observada em muitos destes animais. O padrão da retina das cinco corujas-orelhudas examinadas é anangiótica e atapetal, recebendo sua nutrição através do corpo vítreo e da coroide, como é observado em aves de forma geral (Pereira 2007, Ruggeri et al. 2010). Ruggeri et al. (2010) confirmaram através das imagens obtidas por tomografia de coerência óptica (TCO) que as camadas da retina de falconídeos e strigiformes não possuem vasos sanguíneos, diferentemente da dos seres humanos.. Foi possível observar nas corujas veias coroidais, especialmente nas aves jovens (Murphy 1993), podendo estas serem visualizadas em decorrência da pouca pigmentação do epitélio pigmentar na maioria das aves de rapina noturnas (Murphy 1993). Apenas uma fóvea, a fóvea temporal, que é bem desenvolvida e localizada dorsolateralmente ao pécten ocular foi observada nas corujas-orelhuda (Ruggeri et al. 2010), característica comumente relatada em strigiformes (Murphy 1993, Orosz, 2007). Por sua vez os falconiformes e os psitacídeos possuem duas fóveas em cada bulbo ocular (Prince 1956, Murphy 1993, Williams 1994, Montiani-Ferreira 2001, Orosz, 2007, Ruggeri et al. 2010). Exames de OCT em corujas (*Bubo virginianus* e *Strix varia*) revelam que a espessura da coroide altera dependendo da localização, ou seja, a coroide é mais fina na região próxima no nervo óptico e mais espessa ao redor da fóvea (Ruggeri et al. 1989). A maioria das espécies domésticas de mamíferos não possui fóvea, apresentando uma acuidade visual menos privilegiada comparativamente às aves (Gelatt 1999, Montiani-Ferreira 2001, 2008a, Cullen 2003, Lima et al. 2010).

O pécten ocular é uma projeção tecidual localizado no interior da câmara vítrea (Prince 1956, Gelatt 1999, Orosz 2007, Montiani-Ferreira 2001, Ruggeri et al. 2010), similar ao tecido da úvea (Montiani-Ferreira 2007), que é encontrado em todas as aves (Prince 1956, Murphy 1993, Orosz, 2007, Ruggeri et al. 2010). O pécten ocular da coruja *Asio clamator* é plissado diferenciando-se de outros formatos

relatados, como a forma de palhetas, ou de cone (Montiani-Ferreira 2001). Esta estrutura pôde ser evidenciada em corujas-orelhudas no exame de oftalmoscopia, no entanto exames de ultrassonografia ocular (Squarzonei et al. 2010) e de OCT (Ruggeri et al. 2010) também auxiliam na observação desta estrutura in vivo. O pécten ocular das aves tem como função, proteger e obstruir a sobrecarga de brilho na retina (Prince 1956), mas provavelmente suas funções primárias incluem a nutrição da porção interna da retina avascular (Murphy 1993, Gelatt 1999, Montiani-Ferreira 2001), participação na regulação ácido-básica e provável contribuição na formação de fluido intraocular (Murphy 1993).

Este estudo contribuiu para o estabelecimento de valores de referências para testes diagnósticos oftálmicos em corujas-orelhudas (*Asio clamator*), bem como para a caracterização da morfologia ocular, gerando dados e demonstrando aspectos que poderão auxiliar os médicos veterinários oftalmologistas a não confundirem eventuais oftalmopatias com as características morfológicas peculiares desta espécie. Sendo assim, o estabelecimento de valores de referência certamente proporcionará diagnósticos mais precisos para as oftalmopatias nestas aves quando receberem cuidados oftalmológicos no futuro. Para melhor compreensão de algumas das características morfológicas descritas nesta pesquisa, acredita-se ser necessário o desenvolvimento estudos complementares sobre histologia ocular nesta espécie.

## REFERÊNCIAS

- Agillar R.F. 2003. Strigiformes (Owls), p.491-501. In: Fowler M.E. & Miller R.E. (Eds), Zoo and Wild Animal Medicine. 5<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders, St Louis, Missouri.
- Aguiar K.M.O. & Naiff R.H. 2009. Aspectos reprodutivos e dieta alimentar dos ninhegos de *Asio clamator* (Aves: Strigidae) no campus Marco Zero da Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP. Acta Amazonica 39:1.
- Andrew S.E., Nguyen A., Jones G.L. & Brooks D.E. 2003. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. Vet. Ophthalmol. 6:45-50.
- Ashwin P.T., Shah S., Pushpoth S., Wehbeh L. & Ilango B. 2009. The relationship of Central Corneal Thickness (CCT) to Thinnest Central Cornea (TCC) in healthy adults. Contact Lens and Anterior Eye 32(2):64-67.
- Baumel J.J., King A.S., Breazille J.E., Evans H.E. & Vanden Berge J.C. 1993. Handbook of avian anatomy: Nomina anatomica avium. 2<sup>nd</sup> ed. Nuttall Ornithological Club, Cambridge.
- Bayón A., Almela R.M. & Talavera J. 2007. Avian ophthalmology. Eur. J. Companion Anim. Pract. 17(3):253-266.
- Bayón A., Vecino E., Albert A., Almela R.M., Cozzi A., Talavera J. & Fernández del Palacio M.J. 2006. Evaluation of intraocular pressure obtained by two tonometers and their correlations with corneal thickness obtained by pachymetry in raptors. Vet. Ophthalmol. 9(6):426-434.
- Blocker T. & Van der Woerd A. 2001. A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and domestic short-haired cats. Vet. Ophthalmol. 4(2):127-130.
- Bortolotti G.R., Smits J.E. & Bird D.M. 2003. Iris colour of American kestrels varies with age, sex and exposure to PCBs. Physiol. Biochem. Zoology 76(1):99-104.
- Brooks D.E., Clark C.K. & Lester G.D. 2000. Cochet-Bonnet aesthesiometer determined corneal sensitivity in neonatal foals and adult horses. Vet. Ophthalmol. 3(2/3):133-137.
- Chan-Ling T. 1989. Sensitivity and neural organization of the cat cornea. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 30(6):1075-1082.
- Cooper S.C., McLellan G.J. & Rycroft A.N. 2001. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet. Rec. 149(8):232-235.
- Cullen C.L. 2003. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian beaver (*Castor canadensis*). Vet. Ophthalmol. 6:279-284.
- Curtis E.L. & Miller R.C. 1938. The sclerotic ring in North American birds. The Auk 55(2):225-243.
- Davidson H.J., Rogers D.P., Yearly T.J., Stone G.G., Schoneweis D.A. & Chengappa M.M. 1994. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. Am. J. Vet. Res. 55(7):949-951.
- Del Hoyo J., Sargatal J. & Elliot A. 1994. Handbook of the Birds of the World: New world vultures to Guinea-fowl, Lynx, Barcelona. 639p.
- De Queiroz K. & Good D.A. 1988. The scleral ossicles of opisthocomus and their phylogenetic significance. The Auk 105:29-35.
- Dubay S.A., Williams E.S., Mills K. & Boerger-Fields A.M. 2000. Bacteria and nematodes in the conjunctiva of mule deer from Wyoming and Utah. J. Wildl. Dis. 36(4):783-787.
- Dupont C., Carrier M. & Higgins R. 1994. Bacterial and Fungal flora in healthy eyes of birds of prey. Can. Vet. J. 35(11):699-701.
- Evans H.E. & Martin G.R. 1993. Organa sensuum, p.585-611. In: Baumel J.J. (Ed.), Handbook of Avian Anatomy: Nomina anatomica avium. Nuttall Ornithological Club, Cambridge, Massachusetts.
- Franz-Odendaal T.A. & Hall B.K. 2006. Skeletal elements within teleost eyes and a discussion of their homology. J. Morphology 267(11):1326-1337.
- Galera P.D., Avila M.O., Ribeiro C.R. & Santos F.V. 2002. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella*) e macacos bugio (*Alouatta caraya*) provenientes do reservatório de Manso, MT, Brasil. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 69(2):33-36.
- Gelatt K.N. 1999. Veterinary Ophthalmology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1544p.
- Glasser A. & Howland H.C. 1996. History of studies of visual accommodation in birds. Quart. Rev. Biology 71(4):475-509.
- Harris M.C., Schorling J.J. & Herring I.P., Elvinger F., Bright P.R. & Pickett J.P. 2008. Ophthalmic examination findings in a colony of Screech owls (*Megascops asio*). Vet. Ophthalmol. 11(3):186-192.
- Jeong M.B., Kim Y.J., Yi N.Y., Park S.A., Kim W.T., Kim S.E., Chae J.M., Kim J.T., Lee H. & Seo K.M. 2007. Comparison of the rebound tonometer (Tono-Vet) with the applanation tonometer (TonoPen XL) in normal Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*). Vet. Ophthalmol. 10(6):376-379.
- King A.S. & McLellan J. 1984 Birds: Their structure and function. 2<sup>nd</sup> ed. Baillière Tindall, London.
- Liesegang T.J., Skuta G.L. & Cantor L.B. 2005. Fundamentals and Principles of Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology, São Francisco. 528p.
- Lima F.C., Vieira L.G., Santos A.L.Q., De Simone S.B.S., Hirano L.Q.L., Silva J.M.M. & Romão M.F. 2009. Anatomy of the scleral ossicles in brazilian birds. Braz. J. Morphol. Sci. 26(3/4):165-169.
- Lima L., Montiani-Ferreira F., Tramontin M., Santos L.L., Machado M., Lange R.R. & Russ H.H.A. 2010. The chinchila eye: Morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. Vet. Ophthalmol. 13(Suppl.):14-25.
- Maggs D., Miller P. & Ofri R. 2008. Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Health Sciences, Missouri. 496p.
- Mahecha G.A.B. & Oliveira C.A. 1998. An additional bone in the sclera of the eyes of owls and the common potoo (*Nyctibius griseus*) and its role in the contraction of the nictitating membrane. Acta Anatomica 163(4):201-211.
- Menegaz R.A. & Kirk E.C. 2009. Septa and processes: Convergent evolution of the orbit in haplorhine primates and strigiform birds. J. Human Evolution 57(6):672-687.
- Millodot M. & Larson W. 1969. New measurements of corneal sensitivity: A preliminary report. Am. J. Optometry, Archs Am. Acad. Optometry 46(4):261-265.
- Millodot M. 1977. The influence of age on the sensitivity of the cornea. Invest. Ophthalmol. Vision Sci. 16(3):240-242.

- Montiani-Ferreira F. 2001. Ophthalmology, p.437-456. In: Fowler M.E. & Cubas Z.S. (Eds), *Biology Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press, Ames.
- Montiani-Ferreira F, Cardoso F. & Petersen-Jones S. 2004. Postnatal development of central corneal thickness in chicks of *Gallus gallus domesticus*. *Vet. Ophthalmol.* 7(1):37-39.
- Montiani-Ferreira F, Mattos B.C. & Russ H.H. 2006. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). *Vet. Ophthalmol.* 9(4):209-213.
- Montiani-Ferreira F. 2007. Oftalmologia, p.1092-1104. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo.
- Montiani-Ferreira F, Truppel J., Tramontin M.H., Vilani R.G. & Lange R.R. 2008a. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. *Vet. Ophthalmol.* 11(6):386-394.
- Montiani-Ferreira F, Shaw G., Mattos B.C., Russ H.H. & Vilani R.G. 2008b. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Vet. Ophthalmol.* 11(3):197-201.
- Moodie K.L., Hashizume N., Houston D.L., Hoopes P.J., Demidenko E., Trembley B.S. & Davidson M.G. 2001. Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. *Vet. Ophthalmol.* 4(4):267-272.
- Moore C.P. & Nasisse M.P. 1999. Clinical microbiology, p.259-289. In: Gelatt K.N. (Ed.), *Veterinary Ophthalmology*. 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Müller K., Mauler D.A. & Eule J.C. 2010. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eyes (*Chinchilla lanigera*). *Vet. Ophthalmol.* 13(Suppl.):29-34.
- Mullin G.S. & Rubinfeld R.S. 1997. The antibacterial activity of topical anesthetics. *Cornea* 16:662-665.
- Murphy C.J. 1993. Ocular lesions in birds of prey, p.211-221. In: Fowler M.E. (Ed.), *Zoo and Wildlife Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Novaes F.C. 2011. Listas das aves do Brasil. 10<sup>a</sup> ed. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 25.1.2011, Disponível em <<http://www.cbro.org.br>> Acesso em 20 abr. 2012.
- Orosz S.E. 2007. The special senses of birds, p.22-39. In: Coles B.H. (Ed.), *Essentials of Avian Medicine and Surgery*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Pereira R.J.G. 2007. Falconiformes e Strigiformes (águia, gavião, falcão, abutre, coruja), p.252-267. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. Vol.17. Roca, São Paulo.
- Pereira F.Q., Bercht B.S., Soares M.G., Mota M.G. & Pigatto J.A. 2011. Comparison of a rebound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. *Vet. Ophthalmol.* 14(5):321-326.
- Pinard C.L., Brightman A.H., Yearly T.J., Everson T.D., Cox L.K., Chengappa M.M. & Davidson H.J. 2002. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). *J. Wildl. Dis.* 38(4):851-855.
- Prince J.H. 1956. *Comparative Anatomy of the Eye*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. 418p.
- Pycraft W.I. 1902. A contribution towards our knowledge of the morphology of the owls. Part II. Osteology. *Transactions of the Linnean Society* 9(1):1-48.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. *Staphylococcus* species, p.118-125. In: *Ibid.* (Eds), *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe, London.
- Rankin A.J., Hosking K.G. & Roush J.K. 2012. Corneal sensitivity in healthy, immature, and adult alpacas. *Vet. Ophthalmol.* 15(1):31-35.
- Rayment L.J. & Williams D. 1997. Glaucoma in a captive-bred great horned owl (*Bubo virginianus virginianus*). *Vet. Rec.* 140(18):481-483.
- Ruggeri M., Major Jr J.C., McKeown C., Knighton R.W., Puliafito C.A. & Jiao S. 2010. Retinal structure of birds of prey revealed by ultra-high resolution spectral-domain optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 51(11):89-95.
- Sahin A., Basmak H. & Yildirim N. 2008. The influence of central corneal thickness and corneal curvature on intraocular pressure measured by tonopen and rebound tonometer in children. *J. Glaucoma* 17(1):57-61.
- Sánchez-Tocino H., Bringas-Calvo R. & Iglesias-Cortiñas D. 2007. Correlation between intraocular pressure, pachymetry and keratometry in a normal population. *Archs Soc. Española Oftalmol.* 82(5):267-272.
- Santos E. 1979. Da Ema ao Beija Flor. Itatiaia, Belo Horizonte. 395p.
- Shewen P.E., Povey R.C. & Wilson M.R. 1980. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. *Can. Vet. J.* 21(8):231-233.
- Shufeldt R.W. 1900. On the osteology of the Striges (Strigidae and Bubonidae). *Proc. Am. Philosoph. Soc.* 39(164):665-722.
- Sick H. 1993. Order Strigiformes, p.286-298. In: *Ibid.* (Ed.), *Birds in Brazil: a natural history*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Spinelli T.P., Oliveira-Filho E.F., Silva D., Mota R. & Sá F.B. 2010. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco and Paraíba (Northeast Brazil). *Vet. Ophthalmol.* 13(Suppl.1):134-136.
- Storey E.S., Carboni D.A., Kearney M.T. & Tully T.N. 2009. Use of phenol red thread tests to evaluate tear production in clinically normal Amazon parrots and comparison with Schirmer tear test findings. *Journal Am. Vet. Med. Assoc.* 235(10):1181-1187.
- Squarizoni R., Perlmann E., Antunes A., Milanelo L. & Barros P.S.M. 2010. Ultrasonographic aspects and biometry of Striped owl's eyes (*Rhinoptynx clamator*). *Vet. Ophthalmol.* 13(Suppl.):86-90.
- Trost K., Skalicky M. & Nell B. 2007. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Vet. Ophthalmol.* 10(3):143-146.
- Warheit K.I., Good D.A. & Queiroz K. 1989. Variation in numbers of scleral ossicles and their phylogenetic transformations within the Pelecaniformes. *The Auk* 106:383-388.
- Weidensaul S. 1996. *Raptors, the birds of prey: an almanac of hawks, eagles, and falcons of the World*. Swan Hill Press, Shrewsbury. 382p.
- Williams D. 1994. Ophthalmology, p.682-686. In: Ritchie B.W., Harrison G.J. & Harrison L.R. (Eds), *Avian Medicine: Principles and application*. Winger's Publishing Inc., Lake Worth, FL.