

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E HISTOPATOLOGIA DA
CONJUNTIVA BULBAR DE CÃES ACOMETIDOS POR
CERATOCONJUNTIVITE SECA DECORRENTE DE CINMOSE.**

Denise Eliza de Almeida

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Dezembro – 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E HISTOPATOLOGIA DA CONJUNTIVA BULBAR DE CÃES ACOMETIDOS POR CERATOCONJUNTIVITE SECA E PORTADORES DE CINOMOSE.

RESUMO - Neste estudo avaliaram-se as repercussões da ceratoconjuntivite seca (CCS) sobre a conjuntiva bulbar de animais da espécie canina, acometidos por cinomose, como doença de base. Determinação da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-a e IFN- γ e histopatologia, relativas à conjuntiva bulbar, foram estudadas em dois grupos. O grupo cinomose (GPC) foi composto por cães com CCS e cinomose e o grupo controle (GSC) foi constituído por cães sem sinais oculares de CCS. As implicações histopatológicas da conjuntiva foram igualmente avaliadas. O grupo GPC mostrou diminuição dos valores do teste lacrimal de Schirmer e predomínio de hiperemia, secreção ocular e positividade para os testes de rosa Bengala e fluoresceína, quando comparado ao grupo controle. Houve predominância de inflamação de curso crônico na conjuntiva bulbar dos cães do GPC e na comparação entre os grupos. A densidade de células caliciformes no grupo GPC foi menor do que no grupo controle. Acantólise foi evidenciada em 60% dos cães com CCS e queratinização em 25% deles. A presença de acantólise, queratinização e corpúsculos de inclusão foi estatisticamente predominante no grupo GPC. A severidade dos sinais oftálmicos não se correlacionou aos achados histopatológicos. No GSC, a expressão relativa do gene IL-6 mostrou-se significativamente superior quando comparada à expressão dos outros genes estudados. No grupo GPC, a expressão relativa dos genes IL-2, IFN- γ e IL-4 foi estatisticamente menor quando comparada à das médias dos genes IL-6, IL-10, TNF-a e IL-1 β . Quando os grupos foram comparados entre si, a expressão dos genes IL-1 β , TNF-a e IL-10 foi estatisticamente maior no grupo GPC. No grupo GSC, identificou-se correlação negativa entre inflamação aguda e IL-6 e, no grupo GPC, correlação positiva entre inflamação crônica e TNF-a. Inflamação crônica, redução da densidade de células caliciformes, queratinização e corpúsculos de inclusão puderam ser evidenciados, à histopatologia conjuntival de cães com CCS e cinomose. Fator de necrose tumoral alfa e as interleucinas 1 e 10 exerceram participação crítica na

patogênese da ceratoconjuntivite seca de cães com cinomose. A severidade das lesões encontradas ao exame clínico oftálmico da superfície ocular correlacionou-se com a expressão elevada do TNF- α e da IL-1 β .

Palavras-chave: ceratoconjuntivite seca, cinomose, citocinas, cães.

CYTOKINES GENE EXPRESSION AND HISTOPATHOLOGY OF BULBAR CONJUNCTIVA FROM DOGS WITH KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA CARRYING DISTEMPER.

SUMMARY – This study aimed to investigate changes associated to keratoconjunctivitis sicca (KCS) on the bulbar conjunctiva of dogs with distemper. Gene expression of the cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ in the conjunctiva samples and histopathology was studied in two main groups. The distemper group (DG) was composed by dogs with KCS and distemper, and control group (CG) composed by dogs without ocular signs of KCS. Dogs from the DG showed lower values of Schirmer tear test and greater incidence of hyperemia, ocular secretion and on the rose Bengal and fluorescein tests compared to CG dogs. A chronic inflammatory profile on the conjunctiva of dogs from DG was significantly more prevalent compared to other inflammation levels and to CG group. In DG group, number of goblet cells was lower than CG dogs. Acantholysis and keratinization were observed in 60% and 25% of dogs with distemper, respectively. Acantholysis, keratinization and inclusion bodies were statistically predominant at DG group. The severity of the ophthalmologic findings did not correlate with the histopathological findings. Overall, gene expression of IL-6 was the highest of all cytokines measured in the CG group. In the DG group, IL-2, IFN- γ and IL-4 expression was lower than IL-6, IL-10, TNF- α e IL-1 β . Dogs from DG group showed significantly higher expression of IL-1 β , TNF- α and IL-10 compared to CG. In the CG group, a negative correlation between acute inflammation and IL-6 and, in the DG group, a positive correlation between chronic inflammation and TNF- α expression were identified. Chronic inflammation, goblet cells decrease, keratinization and inclusion bodies can be identified at conjunctival histopathology from dogs with KCS and distemper. Necrosis tumor factor alpha, and interleukins 1 and 10 act critically in the KCS pathophysiology of dogs with distemper. The lesions severity found at ocular surface clinical exams correlates with the increased expression of TNF- α and IL-1 β .

Keywords: keratoconjunctivitis sicca, distemper, cytokines, dogs.

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma oftalmopatia crônica e potencialmente prejudicial à visão. Ela é caracterizada pelo déficit na produção e aumento na evaporação do filme lacrimal. Hiperemia conjuntival, prurido ocular, quemose, sensação da presença de corpo estranho, blefarospasmo, fotofobia, ceratite com pigmentação e neovascularização corneanas, conjuntivite e visão turva são sinais clínicos associados à condição.

A cinomose, doença viral causada por um morbilivirus constituído por uma fita simples de RNA envolvida por um envelope lipoprotéico, que se incorpora à membrana celular e causa citólise imune-mediada das células infectadas, tem sido incriminada na gênese da CCS transitória ou permanente em cães. Da infecção, decorrem inflamação das glândulas lacrimais e diminuição da sua secreção. As conseqüências da xeroftalmia podem ser danosas para a superfície ocular, que passa a manifestar alterações como degeneração do epitélio conjuntival e metaplasia escamosa, com perda de células caliciformes.

A inflamação está envolvida na patogênese da ceratoconjuntivite seca. As alterações da superfície ocular podem ser o resultado de inflamação imune-mediada, que afeta tanto as glândulas lacrimais quanto a superfície ocular. Alguns autores admitem que a inflamação da superfície ocular é secundária à lesão crônica das células epiteliais, causada pela deficiência lacrimal, pela abrasão da conjuntiva ensejada pelas pálpebras e, possivelmente, pela ausência de componentes, como o fator de crescimento epidermal. Não obstante, outros sugerem que a inflamação presente na CCS desempenha papel primário na patogênese desta enfermidade.

A análise histopatológica da glândula lacrimal e da conjuntiva de seres humanos mostra a presença de infiltrados linfocitários, com predominância de células T. Linfócitos T CD4⁺ apresentam-se mais intensamente em estados inflamatórios, ao que se atribui a imunidade celular, como base da inflamação da superfície ocular na CCS. Decorrem disfunção e eventual destruição da glândula lacrimal e do epitélio conjuntival,

por citocinas pró-inflamatórias. As células T CD4⁺ diferenciam-se em células denominadas Th1 e Th2, com mecanismos de ação distintos, uma vez que produzem citocinas diferentes. As células Th1 secretam, predominantemente, interleucina (IL)-2, interferon (IFN) gama e fator de necrose tumoral (TNF) alfa, sendo as responsáveis pela resposta imune mediada por células. As células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10, auxiliando células B na produção de anticorpos, na resposta humoral. Desta forma, o tipo celular predominante, Th1 ou Th2, pode afetar sobremaneira o resultado da resposta imune.

Identifica-se a expressão aumentada de inúmeros mediadores da inflamação na superfície de olhos com CCS. Concentrações maiores de citocinas pró-inflamatórias foram relatadas no epitélio conjuntival e no filme lacrimal.

Em cães, infelizmente inexistem estudos relativos a estas condições, o que faz com que eventos fisiopatológicos, bem como mecanismos pelos quais a superfície ocular é lesada na CCS sejam ainda desconhecidos. Conhecer mais sobre o papel das citocinas inflamatórias, na quebra da homeostase da superfície ocular conseqüente ao déficit lacrimal, permitiria esclarecer questões obscuras, quanto à patogênese desta enfermidade. A determinação do real envolvimento de citocinas poderia, ainda, contribuir para que medidas profiláticas lograssem melhores resultados, relativamente ao manejo da CCS, que é uma enfermidade mórbida para a visão.

Objetivaram-se, portanto, a determinação da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-a e IFN- γ , na conjuntiva bulbar de cães com CCS decorrente de cinomose, a avaliação das implicações histopatológicas e sua correlação com os achados clínicos oftálmicos e com o perfil de citocinas encontrado. A possibilidade de desenvolvimento de novas alternativas para o manejo terapêutico da CCS foi igualmente considerada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma doença ocular comum, crônica progressiva e mórbida para a visão (KASWAN et al., 1984; MOORE, 1998; SALISBURY et al., 1995). Trata-se de uma condição onde a inadequada secreção ou evaporação excessiva do filme lacrimal causa danos às superfícies corneana e conjuntival, desencadeando sintomas de desconforto ocular (BARRERA et al., 1992; BEGLEY et al., 2003; KUNERT et al., 2002; MORGAN & ABRAMS, 1991; PFLUGFELDER et al., 2000; SANSOM & BARNETT, 1985).

Em seres humanos, a CCS afeta cerca de 10% da população entre 30 e 60 anos. Em cães, a enfermidade é com freqüência observada, notadamente em algumas raças, como Cocker Spaniel, Pug, Buldogue Inglês, Yorkshire Terrier, Pequinês e Schnauzer miniatura (MOORE, 1998).

Para o seu diagnóstico, o reconhecimento dos sinais clínicos concomitantemente ao teste lacrimal de Schirmer (STT1) devem ser considerados (KASWAN et al., 1984; SANSOM et al., 1995). Segundo MCLAUGHLIN et al. (1988), valores normais de STT1, em cães, encontram-se entre $21 \pm 4,2$ mm/min.

Pacientes com déficit lacrimal apresentam hiperemia conjuntival, prurido ocular, quemose, sensação da presença de corpo estranho, blefarospasmo, fotofobia, ceratite com pigmentação e neovascularização corneanas, conjuntivite e visão turva (AGUIRRE et al., 1975; DURSUN et al., 2002; KASWAN et al., 1984; KASWAN et al., 1985; KUNERT et al., 2002; LUBNIEWSKI & NELSON, 1990; SALISBURY et al., 1995; SANSOM et al., 1995; TSENG, 1994).

O mecanismo pelo qual o déficit lacrimal leva a alterações na superfície ocular pode ser secundário ao aumento da osmolaridade lacrimal, à dessecação e à pobre lubrificação da superfície epitelial (BARABINO et al., 2004; MARSH & PFLUGFELDER, 1999; RAPHAEL et al., 1988). Doença corneana progressiva, com malácia estromal, além de descemetocelose com resultante estafiloma, podem ser evidenciadas em casos de CCS (HOVDING, 1992; MOORE, 1998). GELLAT (1991) e KASWAN et al. (1989)

informaram sobre a ocorrência de conjuntivite bacteriana secundária, pigmentação, vascularização, queratinização e cicatrizes corneanas densas.

Inúmeros estudos sugerem que, a despeito da etiologia, a CCS é uma doença inflamatória imune-mediada da glândula lacrimal, que também acomete as glândulas lacrimais acessórias e tarsais, a córnea, a conjuntiva e as interconexões neuronais (GAO et al., 2004; PFLUGFELDER et al., 2000; STERN et al., 1998). Nesta enfermidade, a infiltração linfocítica progressiva, constituída, predominantemente, de linfócitos T CD4⁺, é característica na histopatologia da superfície ocular. Este evento pode ser identificado na presença de desordens sistêmicas auto-imunes, como a síndrome de Sjögren, ou na inflamação ocular imune-mediada local, observada em olhos secos sem complicações sistêmicas (BAUDOIN et al., 2002; JONES et al., 1994; PISELLA et al., 2000; STERN et al., 2002; TSUBOTA et al., 1999).

TSUBOTA et al. (1999) relataram a presença de monócitos e neutrófilos infiltrados no epitélio conjuntival, em seres humanos acometidos pela CCS. Em cães, nesta enfermidade, a glândula lacrimal da terceira pálpebra pode apresentar perda do parênquima secretor decorrente do infiltrado linfocítico abundante (CABRAL et al., 2005).

À histologia, o epitélio conjuntival normal é escamoso estratificado não queratinizado e a lâmina própria, firmemente aderida à placa tarsal, é dividida em camada superficial, composta por folículos linfóides, e camada profunda, formada por tecido fibroso, vasos sangüíneos e nervos (HENDRIX, 1998; JÉGOU & LIOTET, 1991). Histiócitos e melanócitos também são encontrados na lâmina própria (BOLZAN et al., 2005).

A quebra da homeostase da superfície ocular e a inflamação crônica decorrente da CCS (DANJO et al., 1994; KUNERT et al., 2002) podem ensejar metaplasia escamosa, condição patológica atribuída ao epitélio conjuntival, a qual é acompanhada por aumento da estratificação epitelial, ingurgitamento das células epiteliais superficiais e perda de células caliciformes (KUNERT et al., 2002; MARSH & PFLUGFELDER, 1999; MOORE & COLLIER, 1990; PFLUGFELDER et al., 1990; PFLUGFELDER et al., 1997; RALPH, 1975; RAPHAEL et al., 1988; RIVAS et al., 1992). Segundo PEIFFER et

al. (1998), em resposta à irritação crônica, a conjuntiva, não queratinizada, sofre metaplasia escamosa, passando a ser identificada como um epitélio escamoso estratificado queratinizado.

Células caliciformes estão presentes na camada epitelial da conjuntiva (HENDRIX, 1998; JÉGOU & LIOTET, 1991), distribuídas de forma heterogênea (MOORE et al., 1987). A maior densidade de células caliciformes pode ser encontrada na conjuntiva bulbar, a alguns milímetros do limbo e não imediatamente a ele (PFLUGFELDER et al., 1997). São células produtoras de mucina, que se constitui na camada mais profunda do filme lacrimal pré-ocular (GREINER et al., 1985; HENDRIX, 1998; KESSING, 1968; RALPH, 1975). Alguns autores encontraram evidências que sugerem que a mucina também seja derivada de outras células epiteliais, que não apenas as caliciformes (DILLY, 1985; GREINER et al., 1985; PFLUGFELDER et al., 1997). A habilidade do epitélio conjuntival em produzir muco é vital para a manutenção do filme lacrimal (GREINER et al., 1985). Assim, a integridade da camada mucosa do filme lacrimal pré-corneano é essencial para a manutenção da qualidade da visão e do conforto ocular. As alterações da superfície ocular na CCS estão, portanto, também associadas à produção anormal de mucina pelo epitélio conjuntival (PFLUGFELDER et al., 2000; RIVAS et al., 1992).

Desordens imune-mediadas (KASWAN et al., 1983; KASWAN et al., 1985; KASWAN et al., 1989; KASWAN & SALISBURY, 1990; MORGAN & ABRAMS, 1991; QUIMBY et al., 1979), virais (KASWAN et al., 1985; MATIN & KASWAN, 1985) e associadas à toxicidade induzida por fármacos (KASWAN et al., 1985; SALISBURY et al., 1995) são causas relatadas de ceratoconjuntivite seca bilateral. A condição imune-mediada é, freqüentemente, observada em seres humanos e em certas raças de cães (KASWAN et al., 1983), onde a enfermidade cursa à similitude da síndrome de Sjögren, que acomete os seres humanos (HICKS et al., 1998).

Em seres humanos, a CCS pode, ainda, estar associada a distúrbios do sistema imune decorrentes de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus humano da leucemia de células T (HTLV1) e, em cães, pelo vírus da cinomose

(AGUIRRE et al., 1975; GREEN et al., 1989; KASWAN et al., 1983; KASWAN et al., 1985; TISHLER et al., 1998).

A cinomose é causada por um morbilivirus da família *Paramyxoviridae*. Trata-se de um agente viral constituído por uma fita simples de RNA envolvida por um envelope lipoprotéico que se incorpora à membrana celular. Células infectadas pelo vírus são susceptíveis à citólise imune-mediada (GREENE & APPEL, 1998); são exemplos, as células dos tecidos nervoso e epitelial (MOORE & NASISSE, 1998).

Programas de vacinação têm diminuído a incidência da enfermidade, por produzirem imunidade parcial, no entanto, condições caracterizadas por sinais neurogênicos, respiratórios e digestivos têm sido ainda observadas (MARTIN, 1998).

A rota primária de infecção do vírus da cinomose inicia-se pelo trato respiratório, a partir do qual ele se dissemina ao tecido linfóide e dele para todo o organismo, permanecendo no tecido epitelial de animais debilitados (MOORE & NASISSE, 1998). A falha na pronta resposta imune implicará em rápida disseminação viral, também para o sistema nervoso central, resultando em encefalomielite aguda, sinais multissistêmicos (2 a 3 semanas pós-exposição) e elevada taxa de mortalidade (SCHERDING, 1998).

De acordo com alguns autores, o vírus da cinomose pode estar relacionado a inúmeras doenças que envolvem distúrbios imune-mediados, em seres humanos, como a esclerose múltipla (KROGH et al., 1991; SUMMERS et al., 1983) e a doença de Paget (MEE & SHARPE, 1993; MEE et al., 1995). Cães com artrite reumatóide apresentam níveis elevados de anticorpos contra o vírus da cinomose, no soro sanguíneo e no líquido sinovial (GREENE & APPEL, 1998).

Os tecidos oculares mais afetados pelo vírus da cinomose são o epitélio conjuntival, a glândula lacrimal, a retina e o nervo e tratos ópticos. Sinais de conjuntivite, retinocoroidite não granulomatosa e neurite óptica podem ser identificados (CARLTON & WILLIAM, 1982; HENDRIX, 1998; MARTIN & STILES, 1998; MOORE & NASISSE, 1998; RAPP & KÖLBL, 1995; RENDER et al., 1982). Corpúsculos de inclusão do morbilivirus já foram identificados na retina, no corpo ciliar e no epitélio conjuntival (CARLTON & WILLIAM, 1982; FAIRCHILD et al., 1967; KASWAN et al., 1985; MARTIN

& STILES, 1998; MOORE & NASISSE, 1998; RAPP & KÖLBL, 1995; RENDER et al., 1982).

A cinomose tem sido incriminada na gênese da CCS transitória ou permanente, em cães (KASWAN et al., 1985), por induzir à inflamação das glândulas lacrimais e conseqüente diminuição de sua secreção (KASWAN et al., 1985; MARTIN & KASWAN, 1985). Segundo KASWAN et al. (1984), à histologia, a glândula lacrimal da terceira pálpebra de cães com cinomose mostra-se com infiltrado linfoplasmocítico ocasional e neutrofílico, no tecido conectivo inter e intralobulbar, possivelmente decorrente de infecção bacteriana secundária. Além disso, à citologia conjuntival, inicialmente, células mononucleares podem ser visibilizadas e, posteriormente, encontra-se aumento do número de neutrófilos e plasmócitos e de debris celulares (LAVACH et al., 1977).

2.1 Vírus e imunidade

Os vírus são microorganismos intracelulares obrigatórios que se replicam no interior de células. A replicação viral estimula a produção de IFN pelas células infectadas. O IFN atua inibindo a replicação viral em células infectadas e livres de infecção. Células NK (*natural killer*) também atuam na infecção viral, destruindo células infectadas pelo vírus e produzindo IFN, o que constitui em um importante mecanismo de imunidade, no início do curso da infecção, previamente ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Na imunidade adaptativa contra infecções virais, anticorpos bloqueiam a ligação e a entrada do vírus nas células do hospedeiro. Além da atuação dos anticorpos, células T citotóxicas eliminam o agente viral destruindo as células infectadas. A maioria das células T citotóxicas vírus-específicas são do tipo T CD8⁺, que reconhecem antígenos virais em associação a moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) da classe I. A diferenciação das células T CD8⁺ requer citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ (ABBAS & LICHTMAN, 2005; CLOUGH & ROTH, 1997).

KRAKOWKA et al. (1987) relataram que, na infecção viral, as respostas imune celular e humoral podem ser determinadas pelo efeito supressor do próprio vírus.

Estudos avaliando o sangue total de 14 cães com cinomose, empregando RT-PCR, mostraram expressão elevada de IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e TGF (fator de crescimento transformante). De acordo com os autores, as citocinas poderiam induzir a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) nas células endoteliais, aumentando a permeabilidade da barreira sangue-cérebro para células inflamatórias, o que contribuiria para a progressão das lesões no sistema nervoso central. A IL-6 poderia exercer um papel importante na indução das lesões nervosas e a expressão de TGF poderia ser um pré-requisito para o desenvolvimento das lesões crônicas (GRÖNE et al., 1998).

O vírus da cinomose, quando utilizado em um modelo de infecção em camundongos para o estudo das lesões do sistema nervoso central, induziu aumento da expressão de citocinas produzidas por células T CD4⁺ Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-6, e redução da expressão de citocinas produzidas pelas Th2, como IL-4 e IL-10 (KHUTH et al., 2001). BENCSIK et al. (1996) demonstraram, em camundongos experimentalmente infectados intracranialmente pelo vírus da cinomose, que o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6 possuem funções pleiotrópicas no sistema nervoso central, e que a produção de citocinas pelas regiões afetadas é temporalmente e regionalmente específica.

Segundo GRÖNE et al. (1998), a expressão de citocinas está relacionada ao índice viral. Animais que apresentam imunossupressão pelo vírus da cinomose, especialmente em fases precoces da infecção, possuem uma redução da expressão de citocinas no sangue periférico. Alternativamente, de acordo com GRABER et al. (1995) e ZURBRIGGEN et al. (1986), a diminuição ou ausência da expressão de citocinas em cães com índice viral elevado poderia decorrer de um efeito adverso do vírus sobre a transcrição gênica das citocinas na circulação.

A imunossupressão nas infecções virais decorre, diretamente, da infecção celular pelo vírus ou, indiretamente, da alteração na produção de citocinas e da síntese e liberação de prostaglandinas. A imunossupressão pode ser identificada como consequência da infecção pelo morbilivirus, o qual modifica a síntese de aminoácidos e de proteínas em prol da replicação viral (KRAKOWKA et al., 1987).

2.2 Ceratoconjuntivite seca e inflamação

O olho apresenta características imunológicas únicas, em virtude de sua origem embriológica e da presença de fatores fisiológicos que modulam a resposta imune. Tecidos intra-oculares expostos a antígenos apresentam uma resposta imunológica atípica, uma vez que a ausência de vasos linfáticos, a presença de fatores protetores, como a barreira hemato-aquosa e imunomoduladores no humor aquoso, e do fenômeno conhecido como desvio imunológico da câmara anterior (ACAID), interagem e fazem do olho um sítio imunologicamente privilegiado (YAMAMOTO et al., 2006).

Na resposta imune intra-ocular a antígenos, a inflamação, de característica imunogênica inata ou adaptativa, como a presente na resposta imune sistêmica, ameaça a integridade da configuração anatômica e molecular do eixo visual. O ACAID possibilita ao olho receber proteção imune, evitando danos ao eixo visual provocados pelos efeitos imunes de uma possível inflamação no processo de eliminação antigênica (STREILEIN et al., 2002).

A superfície ocular, especificamente a conjuntiva, reage à presença antigênica de forma similar à promovida pelas mucosas do trato respiratório superior e do sistema digestivo (KIYONO, 2001). A conjuntiva, com presença de vasos sangüíneos e linfáticos, participa ativamente na defesa imune da superfície ocular contra agressões exógenas. O tecido conjuntival é abundante em células do sistema imune, além de vasos sangüíneos, o que o capacita a desenvolver respostas inflamatória e imune agressivas. Plasmócitos, linfócitos T, sendo em sua maioria CD8⁺, e B, encontram-se dispersos na conjuntiva e na glândula lacrimal, atuando como uma barreira de superfície e constituindo o tecido linfóide associado à conjuntiva (CALT) (YAMAMOTO et al., 2006). Na ausência de inflamação, poucas células T CD4⁺ e B estão presentes entre as células epiteliais conjuntivais. Células dendríticas CD1, macrófagos e mastócitos também podem ser identificados na conjuntiva (ENGLISH, 1998; WHITCUP, 2000).

Atualmente, admite-se que, na CCS, as alterações da superfície ocular sejam o resultado de inflamação imune-mediada, que afeta tanto as glândulas lacrimais quanto

a superfície ocular, e cujos mecanismos não estão, ainda, completamente esclarecidos (DURSUN et al., 2002; MARSH & PFLUGFELDER, 1999; YEH et al., 2003).

Alguns autores sugerem que a inflamação crônica da superfície ocular seja secundária à lesão das células epiteliais, causada pela deficiência lacrimal, pela abrasão conjuntival ensejada pelas pálpebras e, possivelmente, pela ausência de componentes como o fator de crescimento epidermal, na superfície ocular (BRIGNOLE et al., 2000; JONES et al., 1994). Outros admitem que a inflamação conjuntival presente na CCS desempenha papel primário na patogênese da enfermidade, uma vez que a diminuição da abrasão na superfície ocular, com o emprego de lacrimomiméticos e de antiinflamatórios não esteroidais, não reduz a expressão de marcadores inflamatórios na conjuntiva (AVUNDUK et al., 2003), mas apenas ameniza os sinais clínicos.

Na CCS, biópsias incisionais da glândula lacrimal de seres humanos têm demonstrado a presença de infiltrados linfocitários com predominância de células T, sendo a maioria CD4⁺. Células T CD8⁺, por sua vez, apresentam-se em menor número, juntamente com os linfócitos B (JABS et al., 2001). STERN et al. (2002) relataram, todavia, contingentes similares de células T CD4⁺ e de CD8⁺, em seres humanos afetados. HINGORANI et al. (1999) afirmaram que a quantidade de CD4⁺ na conjuntiva normal de seres humanos é pequena, havendo um aumento em estados inflamatórios. A presença destas células contribui para a disfunção e eventual destruição da glândula lacrimal, devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias. A imunidade celular seria, portanto, a causa de base para a inflamação da superfície ocular, na CCS (STERN et al., 2002; TSUBOTA et al., 1999). Células T CD4⁺ exercem papel significativo, mas não exclusivo, na patogênese da inflamação desta enfermidade (JABS et al., 2001). Elas diferenciam-se em células denominadas Th1 e Th2, com mecanismos de ação distintos, uma vez que produzem citocinas diferentes (GHIASI et al., 1999; JABS et al., 2001).

Citocinas são polipeptídeos solúveis produzidos em resposta à presença de microorganismos e de outros antígenos, que medeiam e regulam reações inflamatórias e imunes (ABBAS & LICHTMAN, 2005; GRÖNE et al., 1998). As células Th1 produzem, basicamente, interleucina (IL)-2, interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α , sendo primariamente responsáveis pela resposta imune-mediada por células. As

células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e auxiliam células B na produção de anticorpos na resposta humoral (GHIASI et al., 1999; JABS et al., 2001).

O tipo celular predominante, Th1 ou Th2, pode afetar sobremaneira o resultado da resposta imune. Aspectos críticos que determinam um estímulo imune incluem: a natureza molecular do antígeno, o grau e o tipo de inflamação associados à apresentação inicial do antígeno, a presença de uma resposta imune concomitante e o perfil genético do hospedeiro (ENGLISH, 1998).

Expressão aumentada de outros mediadores da inflamação tem sido identificada na superfície ocular de olhos com CCS. Aumento da concentração e atividade de proteases, como a plasmina e a metaloproteinase de matriz (MMP)-9, e de peroxidases lipídicas no filme lacrimal, assim como expressão aumentada de marcadores de ativação imune, como antígeno leucocitário humano (HLA-DR), receptor de membrana CD-40 e molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, pelo epitélio conjuntival, já foram notificados (BADOUIN et al., 1997; BRIGNOLE et al., 2000; DURSUN et al., 2002; JONES et al., 1994; KUNERT et al., 2000). A importância da inflamação, na patogênese do olho seco, é comprovada quando evidências de melhora dos sinais clínicos e sintomas são observadas com o emprego de terapia antiinflamatória (AVUNDUK et al., 2003; MARSH & PFLUGFELDER, 1999; STERN et al., 2002).

Segundo AVUNDUK et al. (2003), o emprego tópico de corticosteróides reduz a expressão de HLA-DR e aumenta a densidade de células caliciformes no epitélio conjuntival. Como o HLA-DR é estimulado por citocinas, entre elas o IFN- γ , o TNF- α , a IL-6 e a IL-1, sintetizáveis por linfócitos infiltrados na superfície ocular, os corticosteróides reduziram a expressão de HLA-DR, por induzirem à diminuição da produção de tais citocinas (AVUNDUK et al., 2003; HINGORANI et al., 1999; MARSH & PFLUGFELDER, 1999; TSUBOTA et al., 1999).

A terapia antiinflamatória também se mostra benéfica na redução da ativação da ICAM-1 (AVUNDUK et al., 2003). Dentre os componentes inflamatórios, existem evidências de que marcadores inflamatórios e de ativação imune, como a ICAM-1, exercem um papel central no processo inflamatório. Trata-se de uma molécula com função importante na interação célula-célula e na migração de linfócitos, através do

endotélio vascular, para o interior de tecidos, como o epitélio conjuntival e a substância própria (GAO et al., 2004; TSUBOTA et al., 1999). A ligação dos linfócitos ao endotélio vascular é mediada por proteínas de adesão, como as selectinas e as integrinas, e por quimiocinas. As integrinas são expressas em leucócitos e se fixam a ligantes estruturalmente relacionados com as imunoglobulinas, tais como as moléculas de adesão intercelular (CLOUGH & ROTH, 1998).

Correlação entre inflamação e apoptose, a qual afeta diretamente a renovação epitelial, tem sido admitida. Demonstrações de aumento da expressão de antígenos relacionados a apoptose, CD40 e Fas, dois receptores de membrana, também sustentam as evidências da participação da inflamação na patogênese do olho seco (BRIGNOLE et al., 2000). A liberação crônica de mediadores inflamatórios na superfície ocular suscita degeneração epitelial, uma vez que citocinas podem estimular a apoptose.

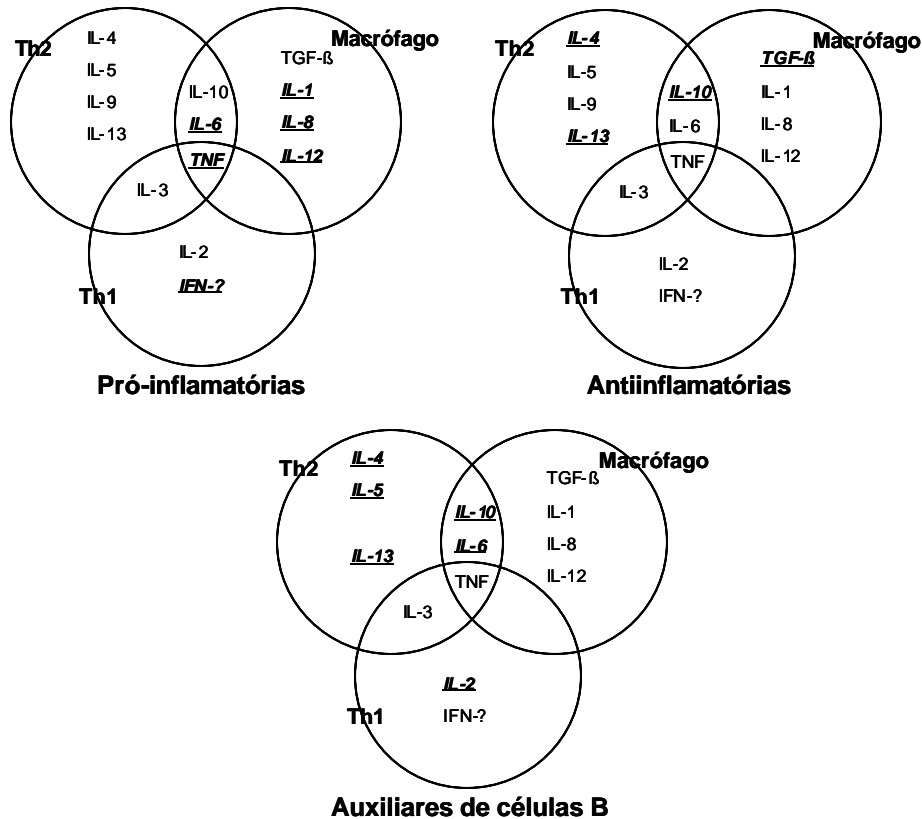
O interferon γ aumenta a expressão de Fas e CD40, moléculas de superfície das células T citotóxicas, nas células conjuntivais, estimulando a apoptose (De SAINT et al., 1999). Quando há inflamação, tem-se aumento da expressão de CD40, que pode ser observado em várias células e tecidos, inclusive no epitélio conjuntival, em casos de CCS (BOURCIER, et al., 2000). Além da apoptose, o CD40 está envolvido na estimulação linfocitária e na inflamação crônica (BOURCIER, et al., 2000; BRIGNOLE et al., 2000).

BRIGNOLE et al. (2000) e STERN et al. (1998) sugeriram haver distúrbios na regulação neuronal junto à superfície ocular e à glândula lacrimal de seres humanos com xerofalmia, decorrentes da secreção continuada de citocinas pró-inflamatórias, o que exacerbaria os danos à superfície ocular por diminuição do reflexo de lacrimejamento. Citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , medeiam a inibição da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e a norepinefrina (HURST et al., 1994). ZOUKHRI et al. (2002) relataram que a expressão aumentada de IL-1 β pode prejudicar a função secretora da glândula lacrimal, induzindo ao olho seco.

Em seres humanos, a expressão de citocinas vem sendo estudada na glândula lacrimal e na conjuntiva de pacientes com CCS (DURSUN et al., 2002; PFLUGFELDER

et al., 1999), com elevação nas concentrações de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 (KUNERT et al., 2002; PFLUGFELDER et al., 2002).

As principais fontes de síntese e função das citocinas estão apresentados a seguir, de acordo com o descrito por CLOUGH & ROTH, (1997).



As citocinas no interior de cada círculo indicam as que são produzidas por células T CD4⁺ Th1, Th2 e macrófagos. Observa-se sobreposição entre dois ou três tipos celulares para a síntese de uma citocina. As citocinas apresentadas em itálico e sublinhadas em cada seção são consideradas as principais mediadoras da resposta pró-inflamatória, antiinflamatória e auxiliar de células B.

2.3 Citocinas mediadoras e reguladoras de processos imune e inflamatório

2.3.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Citocina reguladora e mediadora da imunidade inata, o TNF- α é um mediador da resposta inflamatória aguda (ABBAS & LICHTMAN, 2005) e o principal no choque

séptico (GRÖNE et al., 1998). Trata-se de uma citocina produzida, principalmente, por macrófagos ativados e células T, em resposta a patógenos e a outros estímulos injuriantes (KEADLE et al., 2000; TRACEY, 2002). Os receptores de TNF- α são membros de uma grande família de proteínas, muitas das quais envolvidas nas respostas imune e inflamatória (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O TNF atua similarmente e de modo sinérgico à IL-1 (KEADLE et al., 2000). Sua principal função é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção, ativando estas células para a erradicação de microorganismos. Outrossim, faz com que células endoteliais vasculares expressem ICAM-1, levando à adesão de leucócitos à superfície endotelial vascular. Estimula a secreção de quimiocinas, que induzem à quimiotaxia e ao recrutamento de leucócitos, eicosanóides e óxido nítrico (ABBAS & LICHTMAN, 2005; TRACEY, 2002). Atua nos fagócitos mononucleares para estimular a secreção de IL-1 (TRACEY, 2002) e induz à apoptose de alguns tipos celulares (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

No olho, o TNF- α e a IL-1 estão associados à uveíte e à resposta da superfície ocular a diversas injúrias (KEADLE et al., 2000). Na CCS, expressão elevada de TNF- α foi encontrada no epitélio conjuntival de pacientes com síndrome de Sjögren (SOLOMON et al., 2001).

2.3.2 Interleucina 1 (IL-1)

A IL-1 age em conjunto e de forma semelhante ao TNF na imunidade inata e é um importante mediador da inflamação (ABBAS & LICHTMANN, 2005; SOLOMON et al., 2001). Trata-se de potente citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais, sendo sua gênese induzida por produtos bacterianos e outras citocinas (ABBAS & LICHTMAN, 2005; KEADLE et al., 2000). Ela induz à expressão de uma variedade de proteínas inflamatórias e outras citocinas, tais como: IL-6, IL-8 e TNF- α (GRÖNE et al., 1998; SOLOMON et al., 2001).

Duas formas de IL-1 podem ser encontradas: IL-1 α e IL-1 β . Ambas pró-inflamatórias e multifuncionais que, em geral, produzem efeitos similares (SOLOMON et al., 2001). O maior contingente de IL-1 encontrado na circulação é de IL-1 β (ABBAS &

LICHTMANN, 2005). Dentre suas funções estão a mediação da resposta inflamatória de fase aguda, a quimiotaxia, a ativação de células inflamatórias e apresentadoras de antígeno, a ação sobre células endoteliais, aumentando a expressão de ICAM-1, o auxílio na ativação de linfócitos e a estimulação da neovascularização (ABBAS & LICHTMAN, 2005; KEADLE et al., 2000; RUDNER et al., 2000).

Essa interleucina tem sido implicada na patogênese do choque séptico, na artrite reumatóide e na periodontite (SOLOMON et al., 2001). No olho, a expressão de IL-1a tem sido correlacionada à opacidade corneana após infecção por herpes vírus (KEADLE et al., 2000), à rosácea da superfície corneana e conjuntival, à ceratopatia bolhosa, ao ceratocone e à ulceração corneana. A IL-1a e a IL-1 β já foram encontradas no filme lacrimal de seres humanos com CCS (SOLOMON et al., 2001).

Na CCS, a expressão aumentada de IL-1 β no filme lacrimal e sua correlação com a severidade das lesões na superfície ocular, faz dela uma interleucina importante na patogênese da condição (SOLOMON et al., 2001). Na infecção ocular por *Pseudomonas aeruginosa*, a IL-1 β tem sido implicada na perfuração e destruição corneais (RUDNER et al., 2000; XUE et al., 2003; XUE et al., 2003a).

2.3.3 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos, células T ativadas, eosinófilos, mastócitos e queratinócitos, em resposta a microorganismos e citocinas como a IL-1 e o TNF. Ela atua nas imunidades inata e adaptativa (ABBAS & LICHTMANN, 2005). Na imunidade inata, ela estimula a síntese de proteínas de fase aguda e a proliferação de células T (GRÖNE et al., 1998). Na imunidade adaptativa, a IL-6, juntamente com a IL-10, estimula a multiplicação de linfócitos B, os quais se diferenciam em produtores de anticorpos (SANTOS-GOMES et al., 2002). Ela inibe a imunidade mediada por células (CHAMIZO et al., 2001).

Evidências de que a IL-6 está envolvida em processos infecciosos e inflamatórios da córnea têm sido reportadas. Sua produção pode, ainda, influenciar inúmeras atividades imunogênicas no interior do bulbo ocular. Ela possui atividade reguladora, inibindo a produção de IL-1 e de TNF e, possivelmente, reduzindo os prejuízos que

seriam induzidos à superfície ocular (COLE et al., 1999). Estudo quanto à expressão de citocinas, em córneas de camundongos com ceratite estromal herpética, demonstrou a participação de IL-6 e IL-1 α na patogênese da condição (STAATS & LAUSCH, 1993).

Na CCS, verificou-se redução da expressão de IL-6 após tratamento com ciclosporina, o que sugere tratar-se de condição que envolve processo inflamatório imune-mediado (TURNER et al., 2000). A expressão de IL-6, juntamente com IL-1 β e IFN- γ , apresentou-se elevada em estudo da glândula lacrimal (SAITO et al., 1993) e no filme lacrimal (TISHLER et al., 1998) de pacientes portadores de CCS e síndrome de Sjögren. A aplicação tópica de IL-6, em úlceras corneais de coelhos, facilitou a reparação epitelial, possivelmente por aumentar a expressão de integrinas (COLE et al., 1999; COLE et al., 2001; COLE et al., 2002).

2.3.4 Interleucina 10 (IL-10)

Citocina reguladora e mediadora da imunidade inata, a IL-10 é um inibidor de macrófagos e de células dendríticas ativadas, controlando reações de imunidades inata e mediada por células (ABBAS & LICHTMANN, 2005). Ela é um inibidor da resposta imune, com função imune reguladora na modulação da resposta inflamatória exacerbada e nas defesas contra microorganismos (COLE et al., 2003). A IL-10 é produzida por macrófagos e linfócitos T CD4⁺ Th2 (FUJIWARA et al., 2003). Atua sobre macrófagos inibindo-os, impedindo a secreção de IL-12 e a ativação de células T, induzindo o sistema imune ao seu estado de repouso, à medida que a infecção bacteriana é erradicada (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Outras citocinas reportadas como sendo reguladas pela IL-10 são IFN- γ , TNF- α e IL-6 (COLE et al., 2003). Por sua habilidade inibitória, o potencial terapêutico da IL-10 tem sido considerado (CALDER et al., 1999). Ela auxilia na resposta imune humoral e síntese de IgE (FUJIWARA et al., 2003).

No olho, o papel da IL-10 não está completamente compreendido. Na ceratite herpética, a IL-10 reduz a severidade da inflamação (TUMPEY et al., 1998). Nas uveítes, a IL-10 deprime a inflamação ocular exacerbada, de maneira dose-dependente (RUDNER et al., 2000). Na infecção experimental da córnea de camundongos por

Pseudomonas aeruginosa, a IL-10 exerceu papel importante na regulação de mediadores inflamatórios (COLE et al., 2003).

2.3.5 Interleucina 2 (IL-2)

A IL-2 é uma citocina reguladora e mediadora da imunidade adaptativa, a IL-2 é molécula indispensável para a ativação de macrófagos e imunidade mediada por células (CHAMIZO et al., 2001). Atua como fator de crescimento para linfócitos estimulados por antígeno e é responsável pela expansão clonal das células T, após o reconhecimento antigênico. Ela é produzida por linfócitos T CD4⁺ Th1 e, em menor quantidade, por células T CD8⁺ (FUJIWARA et al., 2003). A ativação das células T por antígenos e co-estimuladores incita a transcrição do gene da IL-2 e a síntese desta proteína. Ela promove a proliferação e a diferenciação de outras células do sistema imune, tais como as NK e as células B. A IL-2 potencializa a morte por apoptose das células T ativadas por antígeno (ABBAS & LICHTMANN, 2005).

Na ceratoconjuntivite atópica, a expressão de IL-2 pode estar aumentada (CALDER et al., 1999). Na ceratite estromal herpética, a IL-2, juntamente com o TNF- α e o IFN- γ , foram encontrados na córnea de ratos, caracterizando um perfil celular Th1. As células Th1 parecem estar envolvidas na imunopatogênese da lesão tecidual (NIEMIALTOWSKI & ROUSE, 1992).

2.3.6 Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 atua como a principal estimuladora para a produção de anticorpos IgE e o desenvolvimento de células Th2, a partir de linfócitos T CD4⁺ (ABBAS & LICHTMANN, 2005), auxiliando na resposta humoral (FUJIWARA et al., 2003). Ela é uma citocina reguladora e mediadora da imunidade adaptativa e é produzida por mastócitos, basófilos ativados, eosinófilos e linfócitos T CD4⁺ da subpopulação Th2 (ABBAS & LICHTMANN, 2005; CALDER et al., 1999). As citocinas envolvidas na resposta Th2 exercem papel fundamental no desencadeamento de doenças alérgicas (FUJIWARA et al., 2003). A IL-4 antagoniza os efeitos do IFN- γ sobre os macrófagos, inibindo reações mediadas por células (CHAMIZO et al., 2001).

Nas desordens crônicas da conjuntiva, a IL-4 pode ser vista em maior concentração (CALDER et al., 1999). Na ceratoconjuntivite vernal, a expressão de IL-4 encontra-se aumentada, sugerindo que o estado atópico da oftalmopatia seja regulado por células Th2 (CALDER et al., 1999).

2.3.7 Interferon γ (IFN- γ)

O IFN- γ é a principal citocina pró-inflamatória, secretada por linfócitos T CD4⁺ Th1, células NK e T CD8⁺ ativadora de macrófagos. Ele regula e medeia da imunidade adaptativa (GRÖNE et al., 1998).

Esta citocina exerce funções fundamentais na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células (CHAMIZO et al., 2001; FUJIWARA et al., 2003; SANTOS-GOMES et al., 2002). Ele possui considerável atividade antiviral, estando associado a respostas inflamatórias citolíticas (DEGEN et al., 2005). As células NK secretam o IFN- γ em resposta ao reconhecimento de antígenos (ABBAS & LICHTMANN, 2005) ou em resposta à IL-12 (DEGEN et al., 2005). O IFN- γ estimula a expressão de moléculas MHC de classe I e II. Adjunto, promove a diferenciação de células T CD4⁺ para a subpopulação Th1 e inibe a proliferação de Th2 (ABBAS & LICHTMANN, 2005), podendo inibir a expressão de IL-4 (CALDER et al., 1999).

Na ceratoconjuntivite atópica, a expressão de IFN- γ pelas células T CD4⁺ pode estar aumentada (CALDER et al., 1999). Em um estudo sobre a imunidade celular da córnea de camundongos que receberam enxertos corneais e tiveram rejeição ao tecido enxertado, o IFN- γ e a IL-2 encontraram-se expressos em níveis elevados, estando envolvidos na patogênese da rejeição aos enxertos e caracterizando perfil celular Th1 (SANO et al., 1998; VENTURA et al., 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 cães, machos ou fêmeas, sem raça definida, da rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

O experimento foi conduzido obedecendo-se a normas éticas propostas pela ARVO (*Association Research of Vision and Ophthalmology* - National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985), relativamente à utilização de animais em pesquisas oftálmicas, e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, conforme protocolo nº 005811.

Vinte animais sem CCS e aparentemente hígidos compuseram o grupo controle. Os exames obedeceram à rotina semiotécnica habitual balizada no teste lacrimal de Schirmer¹, biomicroscopia com lâmpada em fenda², provas da fluoresceína³ e rosa Bengala⁴, tonometria de aplanção⁵ e biomicroscopia binocular indireta⁶.

Estudaram-se outros vinte cães com cinomose e CCS secundária. A cinomose foi diagnosticada de consoante com a caracterização dos sinais clínicos, com a presença de pelo menos um dos sinais nervosos. Os animais pertencentes a este grupo foram, também selecionados com base no histórico de ausência vacinal. Sorologia para determinação de anticorpos contra o vírus da cinomose foi realizada empregando-se conjunto de reagentes apropriado⁷.

Consideraram-se como portadores de CCS aqueles animais cujos valores do teste lacrimal de Schirmer 1 eram inferiores a 8 mm/minuto (KASWAN et al., 1985) e

¹ Teste lacrimal de Schirmer – Ophthalmos, São Paulo, Brasil.

² Lâmpada de fenda – Kowa Optimed Inc., Tosu, Japão.

³ Fluoresceína – Ophthalmos, São Paulo, Brasil.

⁴ Teste Rosa Bengala – Ophthalmos, São Paulo, Brasil.

⁵ Tonômetro de aplanção (Tono-pen) – Mentor Ophthalmics, Norwell, Massachussets., EUA.

⁶ Oftalmoscópio binocular indireto Omega 180 – Heine Optotechnik, Herrsching, Alemanha.

⁷ Biogal, ImmunoComb, Organics do Brasil, São Paulo, Brasil.

que apresentavam alterações córneo-conjuntivais compatíveis com a condição. A exemplo do grupo anterior, neste, admitiram-se as mesmas etapas semiotécnicas oftálmicas.

3.1 Caracterização clínica da CCS, relativamente à quantificação de eventos clínicos

Parâmetros referentes à quemose, à blefarite, ao blefarospasmo, à hiperemia conjuntival e à secreção ocular foram estudados de acordo com critérios quali-quantitativos, onde nihil representou ausência dos sinais, (+) manifestação discreta dos mesmos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos. Somente os animais que receberam a classificação (++) e (+++) para a caracterização dos parâmetros estudados foram considerados positivos para os sinais.

3.2 Histopatologia da conjuntiva

Biópsias conjuntivais de um dos olhos de cada animal dos grupos cinomose e controle foram realizadas para a histopatologia. Relativamente aos com ceratoconjuntivite seca e cinomose, concebeu-se empregar o olho em piores condições clínicas. Para os cães do grupo controle, o olho esquerdo foi o escolhido para a consecução de biópsias conjuntivais.

A contenção dos animais e a exposição do bulbo do olho foram realizadas por um auxiliar. Amostras conjuntivais, de tamanho padrão aproximado de 3 x 4 mm, foram removidas do quadrante superonasal da conjuntiva bulbar a, aproximadamente, 5 mm do limbo (KUNERT et al., 2002; PFLUGFELDER et al., 1997) (Figura 1A). Previamente às manobras, a conjuntiva foi lavada com solução fisiológica e recebeu colírio anestésico⁸. Imediatamente à coleta, empregou-se pomada a base de neomicina⁹ sobre o ferimento ensejado pela biópsia, duas vezes ao dia, por 5 dias. Cada fragmento foi fixado em formol¹⁰ tamponado a 10% por até 72 horas e mantido em álcool¹⁰ a 70% até

⁸ Colírio anestésico, Cloridrato de tetracaína e fenilefrina, Allergan, Guarulhos, Brasil.

⁹ Epitezan pomada oftalmológica, Allergan, Guarulhos, Brasil.

¹⁰ Merck SA Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.

seu processamento. Posteriormente à fixação, realizaram-se desidratação e diafanização das amostras.

Após a diafanização, procedeu-se a inclusão das amostras em parafina e realizaram-se cortes em micrótomo, a uma espessura de cinco micrômetros (5 μ m). Ato contínuo, as amostras foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e pelo ácido periódico de Schiff (PAS), para o estudo à microscopia de luz (DURSUN et al., 2002).

À microscopia de luz, avaliou-se a presença de infiltrados inflamatórios, buscando-se caracterizar o grau de inflamação, a densidade de células caliciformes, a ocorrência de corpúsculos de inclusão de Lentz e de sinais de degeneração e queratinização conjuntivais.

Para a histopatologia, os cortes foram processados no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

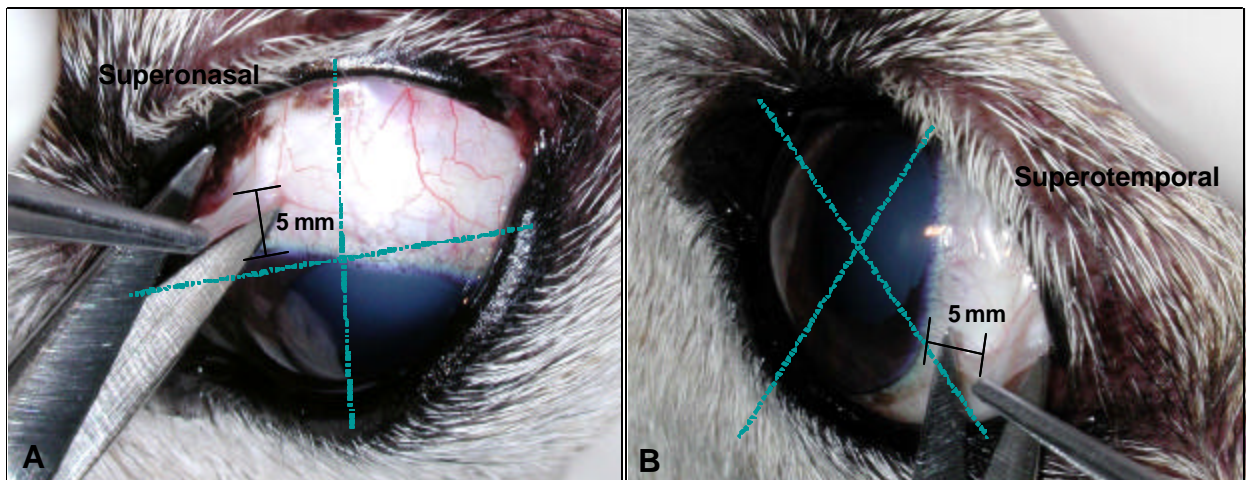


Figura 1. Imagem fotográfica do procedimento da biópsia conjuntival sendo realizado nos quadrantes superonasal (A) e superotemporal (B) da conjuntiva bulbar de cão. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

3.3 Coleta da conjuntiva bulbar para extração do RNA

Outras amostras foram coletadas, adotando-se os mesmos critérios do item anterior, no quadrante superotemporal ou superior da conjuntiva bulbar (KUNERT et al., 2002; ROSENBAUM et al., 1995) (Figura 1B). Os tecidos coletados sofreram congelamento rápido em nitrogênio líquido e foram estocados a -80°C até a sua utilização (GIULIETTI et al., 2001).

3.4 Avaliação da expressão gênica

3.4.1 Extração do RNA e transcrição reversa (RT-PCR)

Protocolos relativos à extração do RNA e processamento da reação de RT-PCR foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Previamente à extração, as amostras foram pesadas e o peso padronizado para 0,05 grama. A extração do RNA total foi realizada utilizando-se reagente TRIZOL LS¹¹ para amostras de conjuntiva, de consoante com as instruções do fabricante.

As amostras de conjuntiva foram, individualmente, maceradas com 1000 µL de reagente TRIZOL LS, utilizando-se um micropistilo. Acrescentaram-se 100 µL da mistura de clorofórmio¹⁰ e álcool isoamílico¹⁰, na proporção de 24:1, em cada amostra que, posteriormente, foi agitada por 15 segundos e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (TA). A seguir, elas foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos, à 4°C, e 500 µL do sobrenadante foram coletado e transferido para um microtubo de 1,5 mL. Ato contínuo, elas foram precipitadas em 500 µL de isopropanol¹⁰ e, após incubação por 10 minutos à TA, foram centrifugadas a 12.000 g por outros 15 minutos à 4°C. O isopropanol foi descartado, as amostras foram lavadas em 1000 µL de etanol (75%) e secas à TA. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 15 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) (0,1%). A concentração e a pureza (razão absorvância A260/A280) do RNA obtido foram analisadas à biofotometria¹².

Após a extração, 5 µL do RNA obtido destinaram-se à reação de transcriptase reversa, realizada em duplicata (CALDER et al., 1999; ADAMOVICZ & GAUSE, 1995; LUCIANO, 2003; XUE et al., 2003). Termociclador *PTC-200 Peltier Thermal Cycler*¹³ foi empregado para os ensaios de transcrição reversa. A mistura inicial da reação, constituída por 5 µL de RNA extraído, dNTP (2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato) (0,5 mM), 0,5 µg de *primer* Oligo dT12-18¹⁴, água-DEPC (0,1%), em quantidade suficiente

¹¹ Invitrogen™, GIBCO, ref. 10296010, São Paulo, Brasil.

¹² Biofotômetro, Eppendorf, Nova York, EUA.

¹³ MJ Research, Hercules, Califórnia EUA.

¹⁴ Invitrogen™, GIBCO, ref. 15508013, São Paulo, Brasil.

para completar um volume final de 10 μ L, foi incubada a 65°C por 5 minutos. Acrescentou-se, à mistura, tampão 5x da enzima Transcriptase Reversa [Tris-HCl (250 mM, pH 8,3), KCl (375 mM), MgCl₂ (15 mM)], DTT (10 mM), 40 U de inibidor de RNase recombinante RNaseout¹⁵, para posterior incubação a 42°C por 2 minutos. A seguir, 50 U da enzima transcriptase reversa SuperScript™ II RNase H- (*murine Moloney leukemia virus*)¹⁶ foram adicionados para incubação à 42°C, por 50 minutos, e a 70°C, por 15 minutos.

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação dos genes GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), IL-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4 foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica, em termociclador *PTC-200 Peltier Thermal Cycler*¹³. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, utilizados para amplificação de cada gene, a seqüência dos genes no Genbank, o tamanho dos fragmentos gerados e as referências nas quais os *primers* foram obtidos, estão descritos da Tabela 1.

¹⁵ Invitrogen™, GIBCO, ref. 10777019, São Paulo, Brasil.

¹⁶ Invitrogen™, GIBCO, ref. 18064014, São Paulo, Brasil.

Tabela 1. *Primers*, tamanho dos fragmentos gerados, seqüência no GeneBank e referência dos *primers* para amplificação dos genes de interesse. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

| Citocinas | <i>Primers</i> (5' ? 3') | Fragmento (bp) | Referência (GeneBank) |
|--------------------------------|--|----------------|--------------------------------------|
| GAPDH | GTGATGCTGGTGCTGAGTATG GTGATGGCATGGAC(G/T)GTGG | 282 | Chamizo et al., (2001) (AF054608) |
| IL-2 | GCTGGATTTACAGTTGCTTTTG AGGTAATCCATTTGTTCAG | 319 | Chamizo et al., (2001) (D30710) |
| IL-1β | CACAGTTCTCTGGTAGATGAGG TGGCTTATGTCCTGTAACCTGC | 262 | Hegemann et al., (2003) (Z70047) |
| TNF-α | GCCCAGACAGTCAAATCATC CTTGATGGCAGAGAGTAGGTTG | 302 | Chamizo et al., (2001) (X94932) |
| IL-6 | GAACTCCCTCTCCACAAGC TTCTTGTC AAGCAGGTCTCC | 325 | Chamizo et al., (2001) (U12234) |
| IL-10 | GAGCTCCGAGCTGCCTTC GATGAAGATGTCAAACCTCACTC | 374 | Chamizo et al., (2001) (U33843) |
| IFN-γ | CATTCAAAGGAGCATGGATACC CTTGATGGCAGAGAGTAGGTTG | 202 | Chamizo et al., (2001) (S41201) |
| IL-4 | CCTCCCAACTGATTCCAACCTC GATTTCTTCATAGAACAGGTC | 316 | Chamizo et al., (2001) (AF054833) |

Nas reações de PCR, utilizaram-se 2,5 μ L de cDNA proveniente da reação de transcrição reversa, sendo acrescentados a tampão da reação 10X [Tris- HCl (200 mM; pH 8,4), KCl (500 mM)], 1,5 mM MgCl₂, dNTP (0,2 mM)¹⁷, 10 pmol de um dos *primers* específicos para IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , previamente publicados (HEGEMANN et al., 2003; ROTTMAN et al., 1996; TANI et al., 2002), e 1,0 U de Taq DNA polimerase¹⁸, completando-se com água tratada com DEPC, para um volume final de 25 μ L. A RT-PCR do gene GAPDH foi realizada com cada amostra como um controle interno. Todas as amostras que tiveram expressão adequada de GAPDH foram consideradas como tendo amplificação adequada do RNA. As condições de amplificação, anelamento e extensão estão descritas na Tabela 2.

¹⁷ Invitrogen™, GIBCO, ref. 10297018, São Paulo, Brasil.

¹⁸ Invitrogen™, INVITROGEN, ref. 11615010, São Paulo, Brasil.

Tabela 2. Condições de termociclagem utilizadas na PCR para amplificação dos genes de interesse. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

| Etapa | GAPDH | IL-2 | IL-1β | TNFα | IL-6 | IL-10 | IFN-? | IL-4 |
|---------------------------|--------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| Inicial | 94°C/3min | 94°C/3min | 94°C/3min | 94°C/3min | 94°C/3min | 94°C/3min | 94°C/3min | 94°C/ 3min |
| Ciclos | 45 | 45 | 30-35 | 45 | 45 | 50 | 50 | 50 |
| Desnaturação | 94°C/10seg | 94°C/10seg | 94°C/1min | 94°C/10seg | 94°C/10seg | 94°C/10seg | 94°C/10seg | 94°C/ 10seg |
| Anelamento | 62°C/10seg | 54°C/10seg | 50°C/1min | 60°C/10seg | 60°C/10seg | 60°C/10seg | 64°C/10seg | 45°C/ 10seg |
| Extensão | 72°C/20seg | 72°C/20seg | 72°C/20seg | 72°C/20seg | 72°C/20seg | 72°C/20seg | 72°C/20seg | 72°C/ 20seg |
| Extensão Final | 72°C/7min | 72°C/7min | 72°C/10min | 72°C/7min | 72°C/7min | 72°C/7min | 72°C/7min | 72°C/ 7min |

3.4.3 Eletroforese e expressão gênica

A eletroforese foi realizada em gel de agarose¹⁹ a 1,0%, preparado com tampão TBE 0,5x [Tris (0,045 M), ácido bórico (0,045 M) e EDTA (0,001 M, pH 8,0)] e brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Alíquotas de 5 μL dos produtos amplificados foram adicionadas a 2 μL de tampão de diluição da amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol, 40% sacarose (p/v), Tris-HCl (10 mM, pH 7,8), EDTA (1M, pH 8,0)]. Em cada corrida, aplicou-se a escala de padrão de peso ou *ladder* com fragmentos de DNA de PHI-X174 RF DNA/HAE III FRAGMENT (0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)²⁰. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese com tampão TBE 0,5X a 80 V por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi posicionado em um transiluminador de UV²¹ e a imagem obtida, digitalizada em programa computacional Genelink (Genetools, versão 2.11.03²⁰). A amplificação do gene de interesse foi confirmada pela comparação da banda obtida com o tamanho esperado (GAPDH - 282bp, IL-2 - 319bp, IL-1 β - 262bp, TNF-a - 302 bp, IL-6 - 325bp, IL-10 - 374bp, IFN-? - 202bp, IL-4 - 316bp) e com o padrão de peso. A densidade de cada banda foi determinada por escaneamento densitométrico (valor da intensidade da banda, em pixels, subtraído do *background*)

¹⁹ Agarose, LE, Analytical Grade, Promega, ref. V3125, Madison, WI, EUA.

²⁰ Invitrogen™, GIBCO, ref. 15611015, São Paulo, Brasil.

²¹ Syngene, Synoptics Ltd, Cambrigde, Reino Unido.

através do programa de análise Quantity One® 1D ²². A quantidade relativa do gene de interesse foi calculada dividindo-se a intensidade da banda do gene-alvo pela intensidade da banda do GAPDH (gene de expressão constitutiva) da mesma amostra (COLE et al., 2003; DEGEN et al., 2005; KING, et al., 2000; LAU et al., 1998; LEE et al., 1998; RUDNER et al., 2000; THAKUR et al., 2002; XUE et al., 2003).

3.5 Análise estatística

A análise à estatística foi realizada empregando-se programas computacionais para Windows, Sigma Stat (SPSS Inc. 2003, Versão 3.0.1, Richmond, California, USA) e *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc. 1999-2001, Versão 8.2, Cary, NC, USA). Após a realização do teste de normalidade e verificando-se que os dados não se enquadravam em uma distribuição gaussiana, para determinação das diferenças das médias entre os grupos cinomose e controle, utilizaram-se o teste χ^2 seguido do teste de Fisher para os dados relativos aos achados clínicos e à histopatologia. Os dados relativos à expressão gênica foram avaliados pelo teste Mann-Whitney. Dentro de cada grupos, os achados relativos aos graus de inflamação e expressão gênica foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis, seguindo-se o método Student Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas, quando o nível de significância foi de 5%.

Coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado visando a determinação de possível correlação entre os sinais clínicos oftálmicos, achados à histopatologia das biópsias conjuntivais e expressão gênica de citocinas ($P < 0,05$).

²² The Discovery Series™, Bio-rad Laboratories Inc., Hercules, Califórnia, EUA.

4 RESULTADOS

4.1 Achados clínicos

O valor médio e o erro padrão, relativamente ao teste lacrimal de Schirmer, para o grupo dos animais com ceratoconjuntivite seca e cinomose foram de $2,15 \pm 0,49$ mm. Para o grupo dos animais controle, eles foram de $21,8 \pm 0,82$ mm. Observou-se diminuição significativa da média do valor de Schirmer do grupo cinomose quando este foi comparado ao grupo controle ($P = 0,026$) (Tabela 3, Figura 2A).

Tabela 3. Apresentação dos sinais clínicos, valores do teste lacrimal de Schirmer 1 e resultados dos testes rosa Bengala e fluoresceína de cães do grupo controle (GSC) e do grupo com ceratoconjuntivite seca portadores de cinomose (GPC). Jaboticabal, São Paulo, 2006.

| Animal | Quemose | | Blefarospasmo | | Hiperemia | | Secreção | | Schirmer | | Rosa Bengala | | Fluoresceína | |
|--------|---------|-----|---------------|-----|-----------|-----|----------|-----|----------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC |
| 1 | - | - | - | - | - | + | - | + | 26 | 0 | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - | + | 23 | 0 | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | + | 16 | 0 | - | + | - | - |
| 4 | - | - | - | + | - | + | - | + | 19 | 3 | - | + | - | + |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | + | 20 | 0 | - | + | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 | 5 | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | 18 | 3 | - | + | - | + |
| 8 | - | - | - | + | - | + | - | - | 22 | 0 | - | + | - | + |
| 9 | - | - | - | - | - | + | - | + | 25 | 0 | - | - | - | + |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | 22 | 2 | - | + | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 | 5 | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | + | 30 | 0 | - | + | - | + |
| 13 | - | - | - | - | - | + | - | + | 23 | 5 | - | + | - | + |
| 14 | - | - | - | - | - | + | - | - | 20 | 3 | - | - | - | - |
| 15 | - | - | - | - | - | + | - | + | 20 | 5 | - | + | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | + | 22 | 3 | - | + | - | - |
| 17 | - | - | - | - | - | - | - | + | 20 | 0 | - | + | - | + |
| 18 | - | + | - | - | - | + | - | + | 20 | 4 | - | + | - | - |
| 19 | - | - | - | - | - | - | - | + | 22 | 0 | - | + | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | + | - | + | 18 | 5 | - | + | - | - |

Para os sinais clínicos, (-) representa ausência de sinais e (+) manifestação moderada a intensa dos mesmos. Para o teste da fluoresceína, (+) representa positividade para o corante e (-) representa negatividade.

O exame oftálmico, à biomicroscopia com lâmpada de luz em fenda, permitiu verificar, no grupo de animais com CCS e cinomose, presença de quemose em 5% dos animais. O blefarospasmo, no grupo cinomose, foi identificado em 10% dos cães estudados. No grupo controle, quemose e blefarospasmo não foram identificados em nenhum cão estudado. Quando os parâmetros quemose e blefarospasmo foram avaliados à estatística, diferença entre os grupos cinomose e controle não foi verificada (Tabela 3, Figura 2B).

No grupo cinomose, hiperemia conjuntival discreta foi visibilizada em 45% dos cães. No grupo controle, nenhum animal apresentou hiperemia conjuntival. Quando os grupos foram comparados entre si, um aumento significativo da porcentagem de animais com hiperemia conjuntival pôde ser identificada no grupo cinomose ($P = 0,0012$) (Tabela 3, Figura 2C).

Secreção ocular foi observada, no grupo cinomose, em 70% dos animais. Nos animais do grupo controle, esta alteração não foi identificada. A porcentagem de animais que apresentaram secreção ocular no grupo cinomose foi estatisticamente maior do que no grupo controle ($P < 0,0001$) (Tabela 3, Figura 2C).

A impregnação pelo teste de rosa Bengala foi de moderada a severa em 70% dos cães do grupo cinomose. O teste da fluoresceína foi positivo em 35% destes. Ambos os testes foram negativos em 100% dos cães do grupo controle. O grupo cinomose apresentou um aumento significativo da porcentagem de animais positivos para o teste de rosa Bengala e fluoresceína ($P < 0,0001$; $P = 0,0083$) (Tabela 3, Figura 2D).

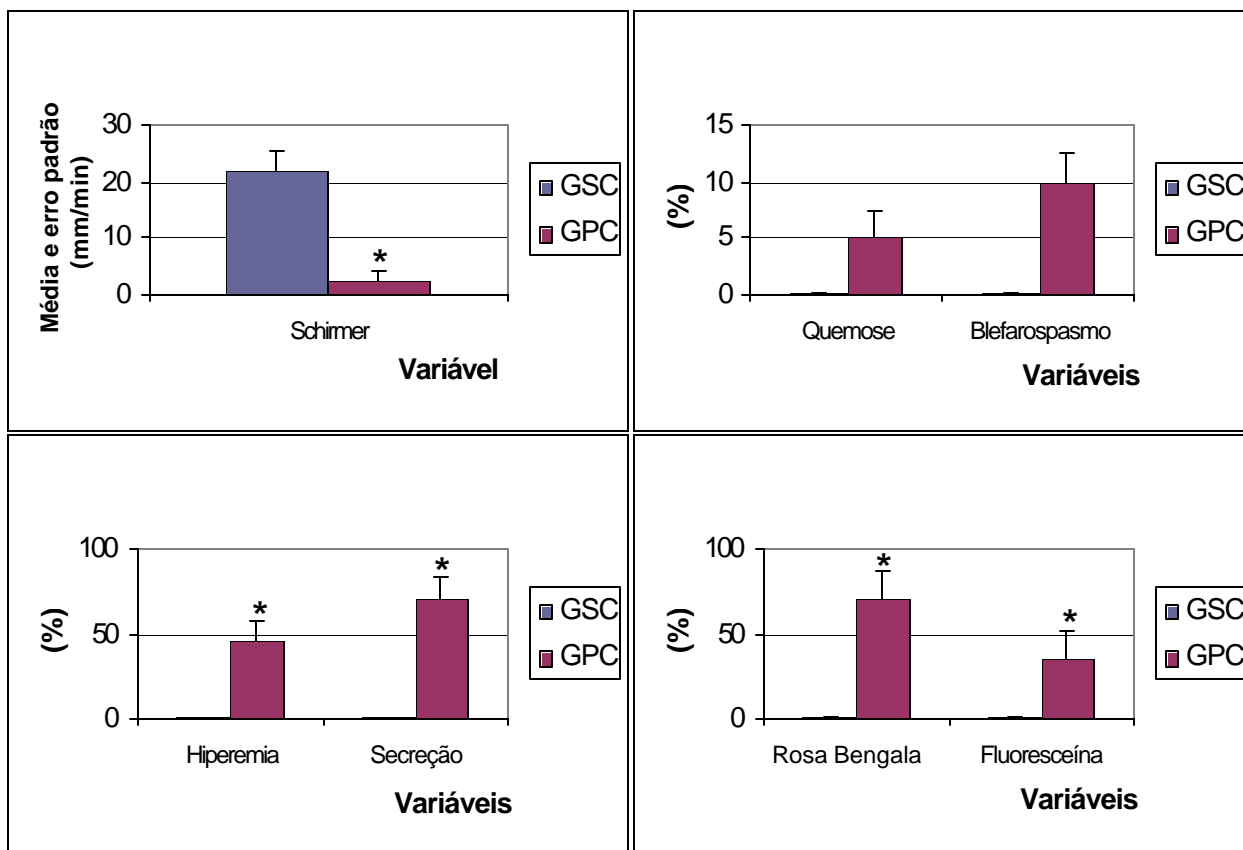


Figura 2. Sinais oftálmicos apresentados por cães do grupo controle (GSC) e do grupo cinomose (GPC). Em **(A)**, médias e erros padrão dos valores do teste lacrimal de Schirmer (mm); Em **(B)**, porcentagem de animais com presença de quemose e blefarospasmo; Em **(C)**, porcentagem de animais com presença de hiperemia e secreção ocular; Em **(D)**, porcentagem de animais com presença de impregnação pelos corantes rosa Bengala e fluoresceína. (*) Valor estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Jaboticabal, São Paulo, 2006.

4.2 Histopatologia

À microscopia de luz, observou-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, com predomínio de linfócitos e plasmócitos, caracterizando inflamação de curso crônico (Figura 3A). Em outros animais, infiltrado de polimorfonucleares pôde ser evidenciado, com predominância de neutrófilos e raros eosinófilos, caracterizando uma inflamação aguda (Figura 3B). Em outros cortes, observou-se a presença de ambos os tipos celulares, mono e polimorfonucleares, caracterizando um processo inflamatório sub-agudo (Figura 3C).

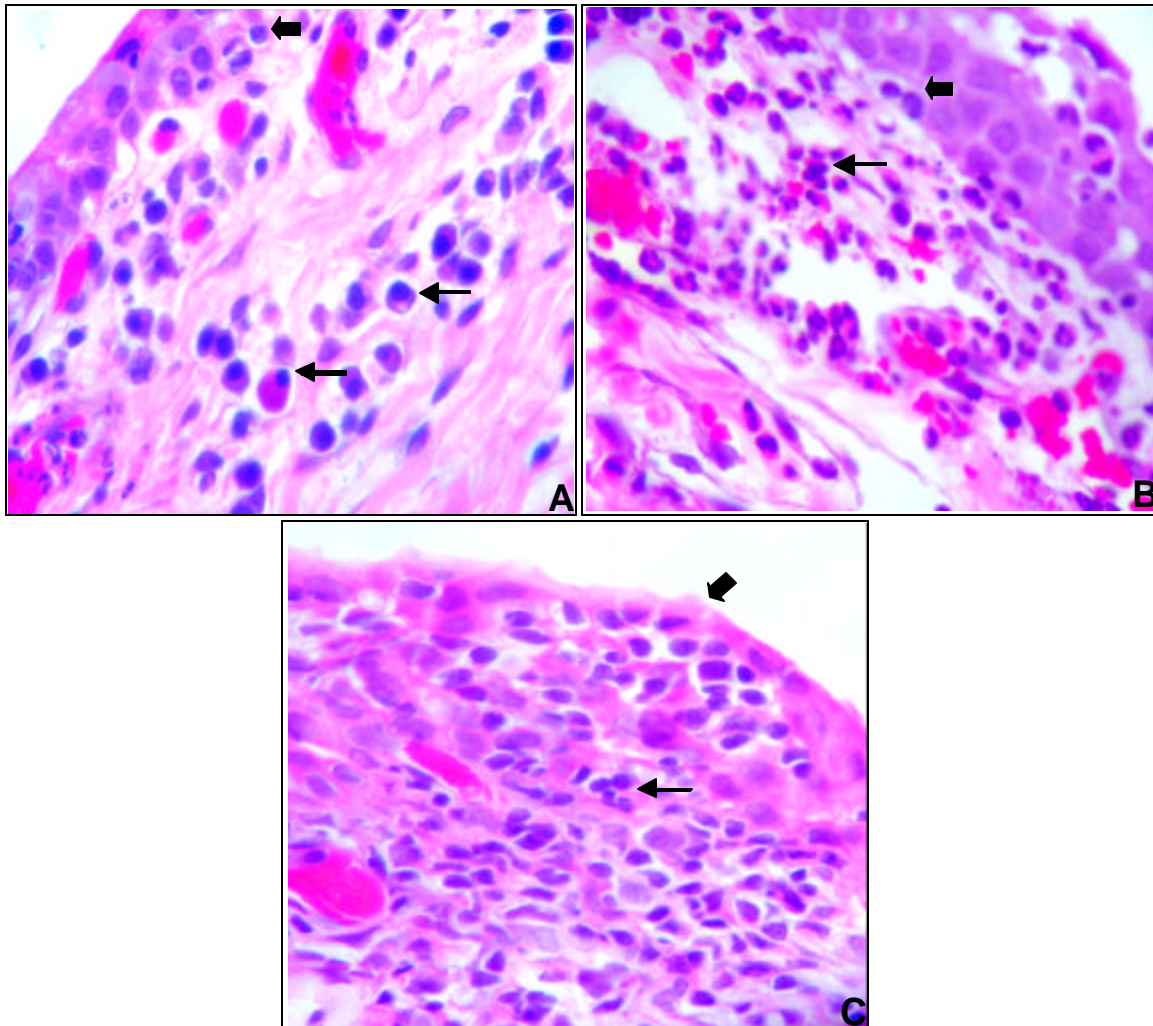


Figura 3. Fotomicrografia da conjuntiva bulbar, em condições inflamatórias, de cães com ceratoconjuntivite seca portadores de cinomose. Em **(A)**, presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário no epitélio (seta larga) e no estroma adjacente (seta). HE. 40X; Em **(B)**, presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear no epitélio (seta larga) e no estroma adjacente (seta). HE. 40X; Em **(C)**, degeneração epitelial (seta larga) e presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário no epitélio e polimorfonuclear no estroma adjacente (seta). HE. 40X; Em **(D)**, presença de células caliciformes repletas de muco (seta), no epitélio. PAS. 40X. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Infiltração inflamatória foi identificada na região epitelial, sub-epitelial e perivascular, apresentando-se de forma focal, multifocal ou difusa e discreta, moderada ou acentuada.

Quando os dados coletados foram dispostos em percentis, no grupo cinomose evidenciou-se inflamação crônica em 55% dos animais, aguda em 5%, sub-aguda em 20% e ausente em 20% dos cães estudados. No grupo controle, encontrou-se ausência

de inflamação em 65% dos cães, inflamação aguda em 20% e sub-aguda em 15% deles. Aumento significativo foi identificado, relativamente à inflamação crônica, quando o grupo cinomose foi comparado ao controle ($P = 0,003$). No grupo cinomose, predomínio de inflamação crônica foi observado relativamente à inflamação aguda e à sub-aguda ($P = 0,001$) (Tabela 4, Figura 4).

Tabela 4. Histopatologia da conjuntiva de cães do grupo controle (GSC) e do grupo com ceratoconjuntivite seca e portadores de cinomose (GPC). Jaboticabal, São Paulo, 2006.

| Animal | Inflamação | | | | | | Células caliciformes | | Queratinização | | Corpúsculo de inclusão | | Acantólise | |
|--------|------------|-----|---------|-----|-----------|-----|----------------------|-----|----------------|-----|------------------------|-----|------------|-----|
| | Aguda | | Crônica | | Sub-aguda | | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC |
| | GSC | GPC | GSC | GPC | GSC | GPC | | | | | | | | |
| 1 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | + |
| 2 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - | + | - | + |
| 5 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 6 | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + |
| 7 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + |
| 8 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + |
| 9 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 13 | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| 14 | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - |
| 15 | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| 17 | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 18 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + |
| 19 | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + |

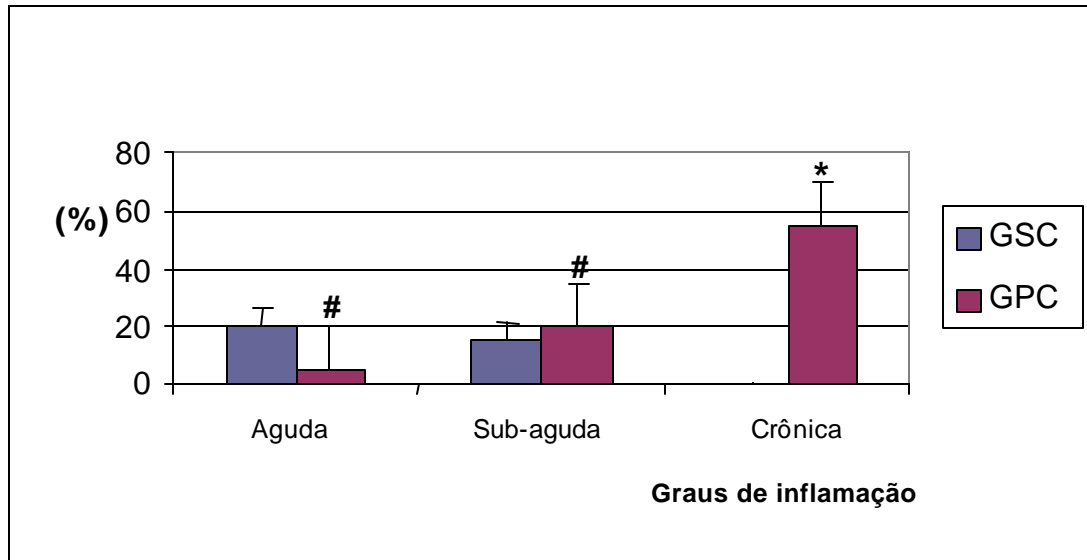


Figura 4. Médias e erros padrão dos graus de inflamação encontrados nos cortes histológicos de cães submetidos à biópsia conjuntival nos grupos controle (GSC) e cinomose (GPC). (*) Valor estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. (#) Valor estatisticamente significativo quando os graus de inflamação foram comparados à inflamação crônica, no grupo cinomose. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Células caliciformes puderam ser evidenciadas ao HE e ao PAS. Pelo HE, elas mostraram forma arredondada e sendo maiores, quando comparadas às epiteliais, com núcleo achatado e deslocado para a periferia e citoplasma abundante. Vacúolos citoplasmáticos, sem coloração, foram observados. Pelo PAS, células caliciformes ocupadas por conteúdo mucoso foram mais evidentes, mostrando tonalidade púrpura intensa (Figura 5A).

No grupo cinomose, a presença moderada a intensa de células caliciformes foi observada em 65% dos animais e discreta a ausente em 35% dos cães estudados. No grupo controle, a presença moderada a intensa pôde ser verificada em 100% dos animais. Quando os dados relacionados à presença de células caliciformes foram submetidos à análise estatística, a densidade das células mostrou-se estatisticamente diminuída no grupo cinomose ($P = 0,0083$) (Tabela 4, Figura 6).

Verificou-se acantólise e perda da coesão entre as células epiteliais, resultando em fissura intercelular (Figura 5B). No grupo cinomose, 60% dos animais apresentaram acantólise e no grupo controle nenhum deles a demonstrou. A porcentagem de

acantólise foi estatisticamente maior no grupo cinomose quando comparado ao grupo controle ($P < 0,0001$) (Tabela 4, Figura 6).

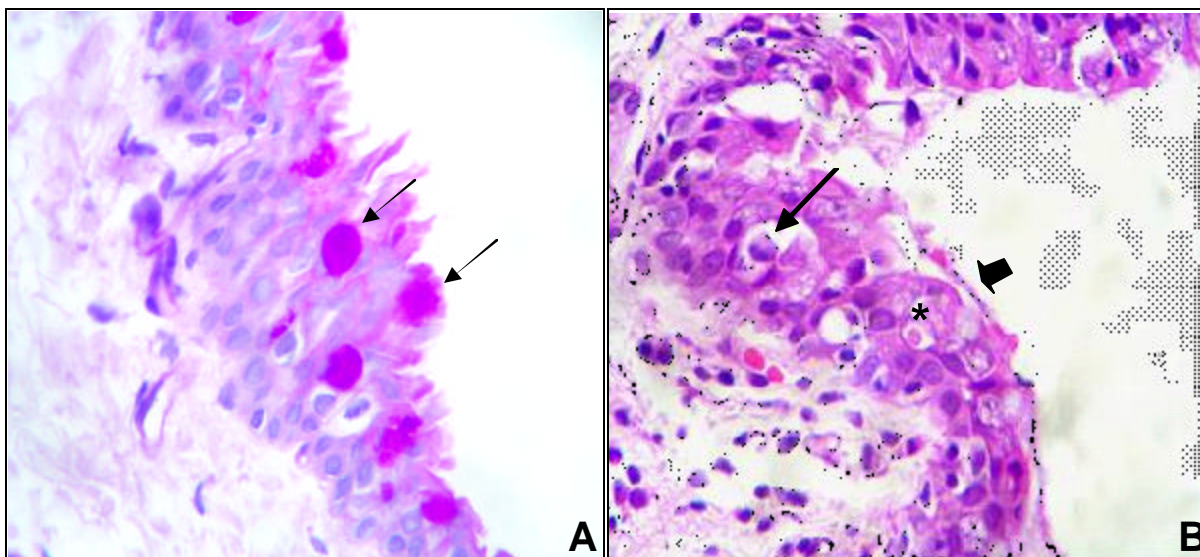


Figura 5. Fotomicrografia da conjuntiva bulbar de cães com ceratoconjuntivite seca portadores de cinomose. Em (A), presença de células caliciformes repletas de muco (seta), no epitélio. PAS. 40X. Em (B), acantólise (seta), degeneração epitelial acentuada (seta larga) e corpúsculo de inclusão viral de Lentz (asterisco). HE. 40X. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

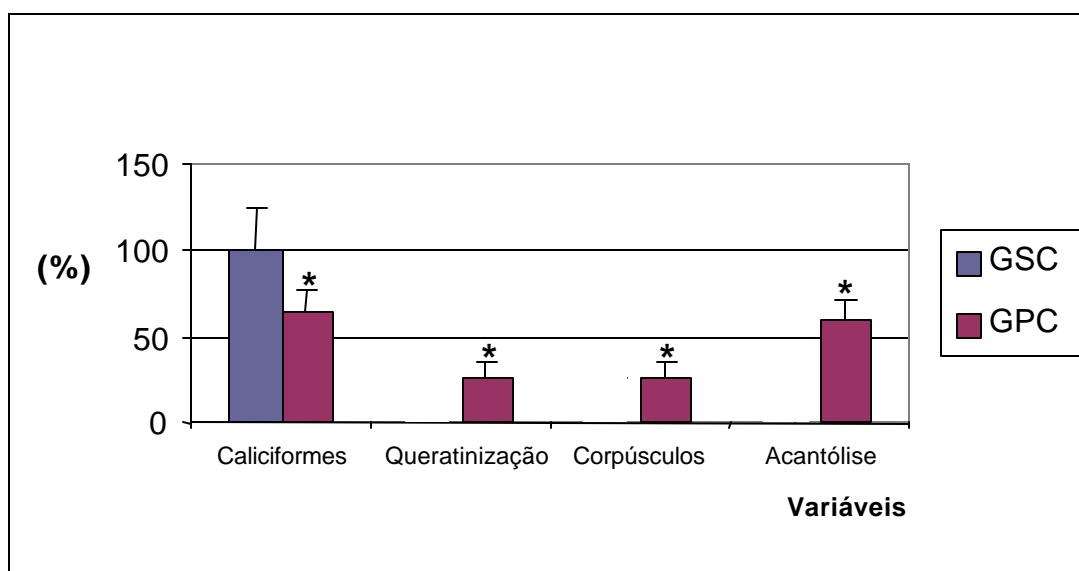


Figura 6. Porcentagem das variáveis encontradas nos cortes histológicos dos cães dos grupos controle (GSC) e cinomose (GPC). (*) Valor estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

No grupo cinomose, grânulos de melanina entremeados às células epiteliais e ao tecido conjuntivo frouxo (Figura 7A) foram observados. Degeneração epitelial pôde ser identificada junto às células epiteliais, as quais apresentavam núcleo mais alongado, citoplasma irregular e em forma que diverge do padrão normal de uma célula epitelial da conjuntiva (Figura 7B).

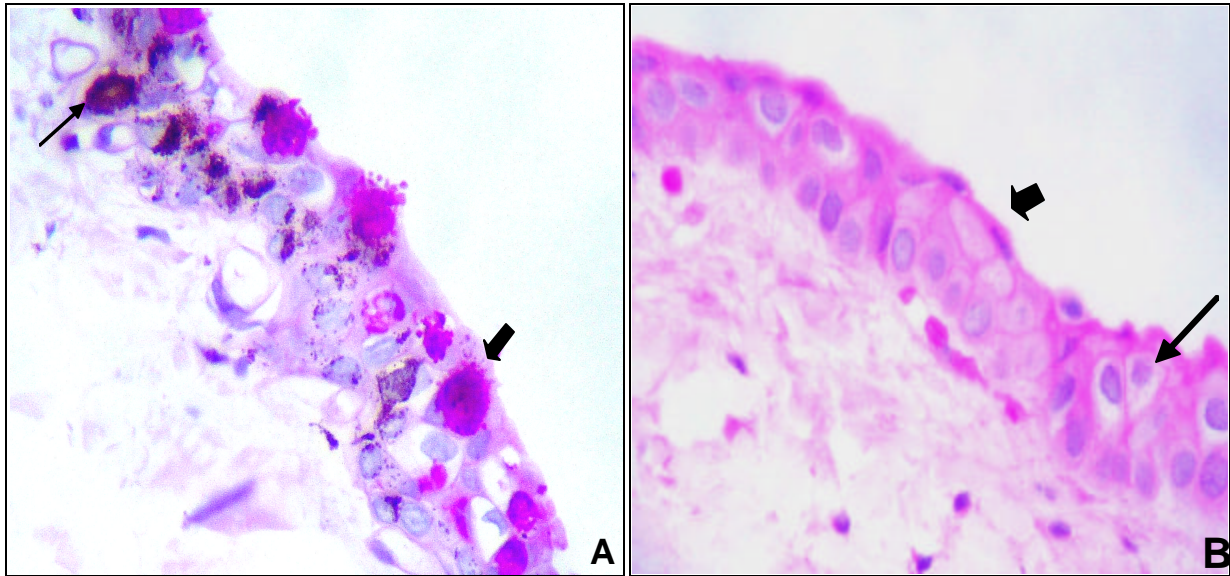


Figura 7. Fotomicrografia da conjuntiva bulbar de cães com ceratoconjuntivite seca portadores de cinomose. Em **(A)**, células caliciformes (seta larga) e melanócitos no epitélio (seta). PAS. 40X; Em **(B)**, degeneração de células epiteliais (seta) e hiperplasia do epitélio conjuntival (seta larga). HE. 40X. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Queratinização epitelial, de grau discreto a acentuado (Figura 8A) foi igualmente observada. No grupo cinomose, 25% dos animais apresentaram sinais de queratinização conjuntival e, no controle, nenhum deles apresentou a anormalidade. Diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos foi observada ($P = 0,0471$) (Tabela 4) (Figura 6).

Corpúsculos de inclusão (corpúsculos de Lenz) foram identificados em 25% dos animais do grupo cinomose (Tabela 4) (Figura 6). Estes se mostraram acidofílicos, com formato arredondado e bordas livres de pigmentação (Figura 8B). A porcentagem de animais que apresentaram corpúsculos de inclusão nos cortes histológicos foi ausente no grupo controle.

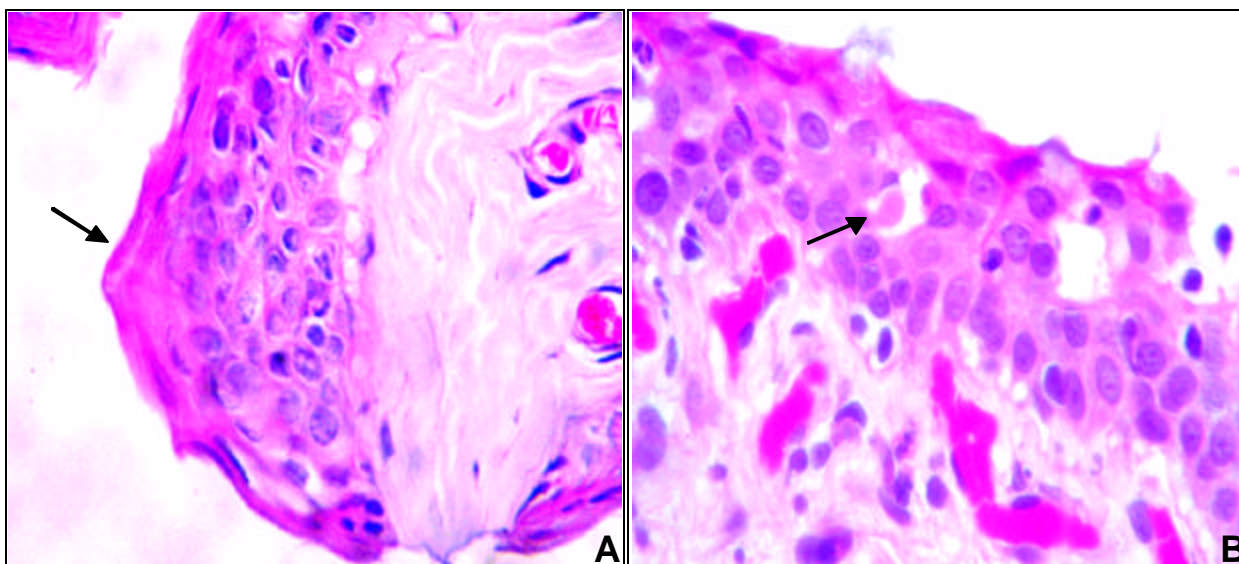


Figura 8. Fotomicrografia da conjuntiva bulbar de cães com ceratoconjuntivite seca portadores de cinomose. Em **(A)**, hiperqueratose e hiperplasia do epitélio conjuntival (seta). HE. 40X; Em **(B)**, presença de corpúsculos de inclusão viral de Lentz em células epiteliais (seta). HE. 40X. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

4.3 Avaliação da expressão gênica

4.3.1 Expressão gênica relativa

Os padrões de bandas em gel de agarose corados com brometo de etídeo para os genes GAPDH, IL-2, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4, expressos no grupo controle, estão descritos na Figura 9. Os resultados de expressão dos genes IL-2, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4, relativa ao gene GAPDH, para os animais do grupo controle estão descritos na Tabela 5 e na Figura 10.

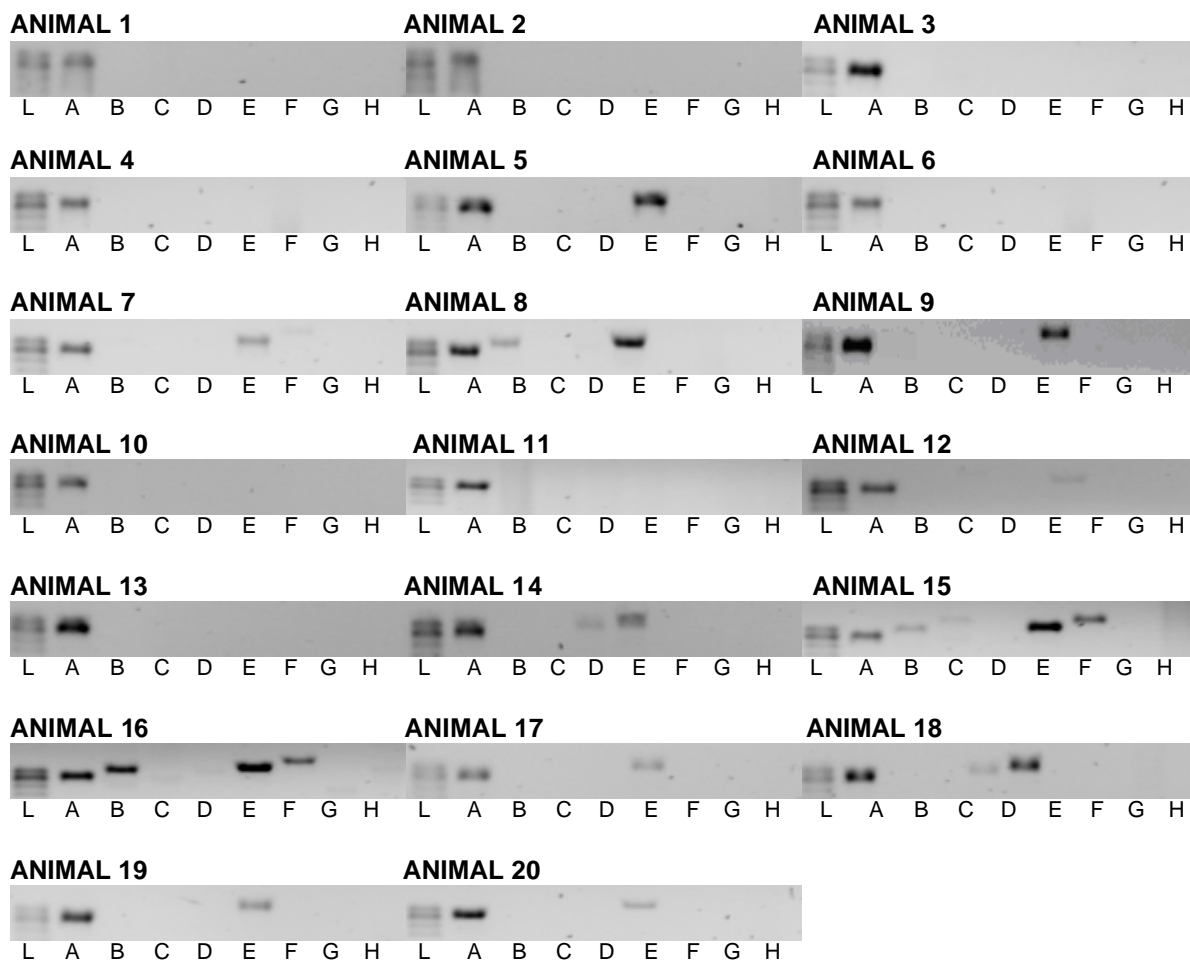


Figura 9. Padrão de bandas obtidas em gel de agarose corado com brometo de etídeo, do "ladder" (L) e dos genes GAPDH (A), IL-2 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IFN- γ (G), e IL-4 (H), nas amostras de conjuntiva bulbar dos animais (n = 20) que constituíram o grupo controle. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Tabela 5. Valores individuais, médias das relações e erros padrão entre as intensidades das bandas dos genes (IL-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva GAPDH (GAP), em cada amostra conjuntival coletada dos animais (n = 20) do grupo controle. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

| <i>Animal</i> | <i>IL-2/GAP</i> | <i>IL-1/GAP</i> | <i>TNF/GAP</i> | <i>IL-6/GAP</i> | <i>IL-10/GAP</i> | <i>IFN/GAP</i> | <i>IL-4/GAP</i> |
|-------------------------------|---------------------|------------------|---------------------|-----------------|---------------------|------------------|------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 1,22 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0,54 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0,30 | 0 | 0 | 1,06 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0,77 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0,25 | 0,60 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0,46 | 0 | 0 | 2,27 | 1,14 | 0 | 0 |
| 16 | 0,99 | 0 | 0 | 1,03 | 0,62 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0,54 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0,30 | 1,39 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0,43 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0,22 | 0 | 0 | 0 |
| Média \pm | 0,09 \pm | 0 ^(*) | 0,03 \pm | 0,50 \pm | 0,09 \pm | 0 ^(*) | 0 ^(*) |
| Ep | 0,05 ^(*) | | 0,02 ^(*) | 0,14 | 0,06 ^(*) | | |

(*) Valor estatisticamente menor, quando comparado ao valor de expressão relativa do gene IL-6.

Nas amostras de conjuntiva bulbar dos animais que constituíram o grupo controle, não se observou expressão dos genes IL-1 β , IFN- γ e IL-4. Os genes IL-2, TNF- α e IL-10 foram expressos, porém não houve diferença estatisticamente significativa quando as médias da expressão relativa foram comparadas entre si.

A média da expressão relativa do gene IL-6 mostrou-se significativamente superior ($P < 0,05$) para os animais do grupo controle, quando comparada às dos outros genes estudados.

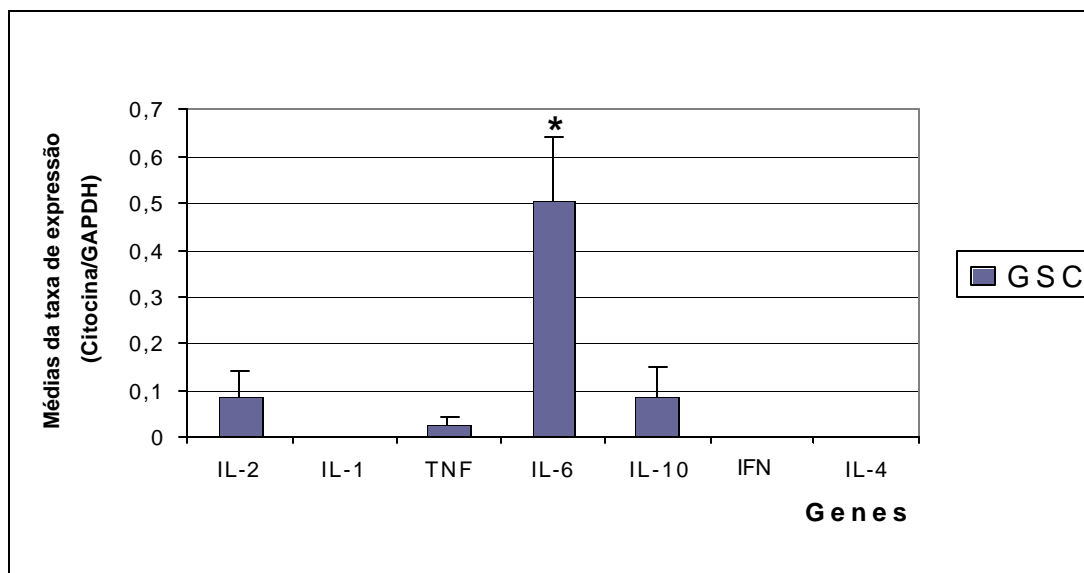


Figura 10. Médias e erros padrão dos valores das relações entre as intensidades das bandas dos genes estudados (IL-2, IL-1 β , TNF-a, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva GAPDH, nas amostras de conjuntiva do grupo controle (GSC). (*) Valor estatisticamente maior quando comparado ao valor de expressão relativa dos outros genes estudados. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Os padrões de bandas em gel de agarose corado com brometo de etídeo para os genes GAPDH, IL-2, IL-1, TNF-a, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4, expressos no grupo cinomose, estão descritos na Figura 11. Os resultados de expressão dos genes IL-2, IL-1, TNF-a, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4, relativa ao gene GAPDH, para os animais do grupo cinomose, estão descritos na Tabela 6 e na Figura 12.

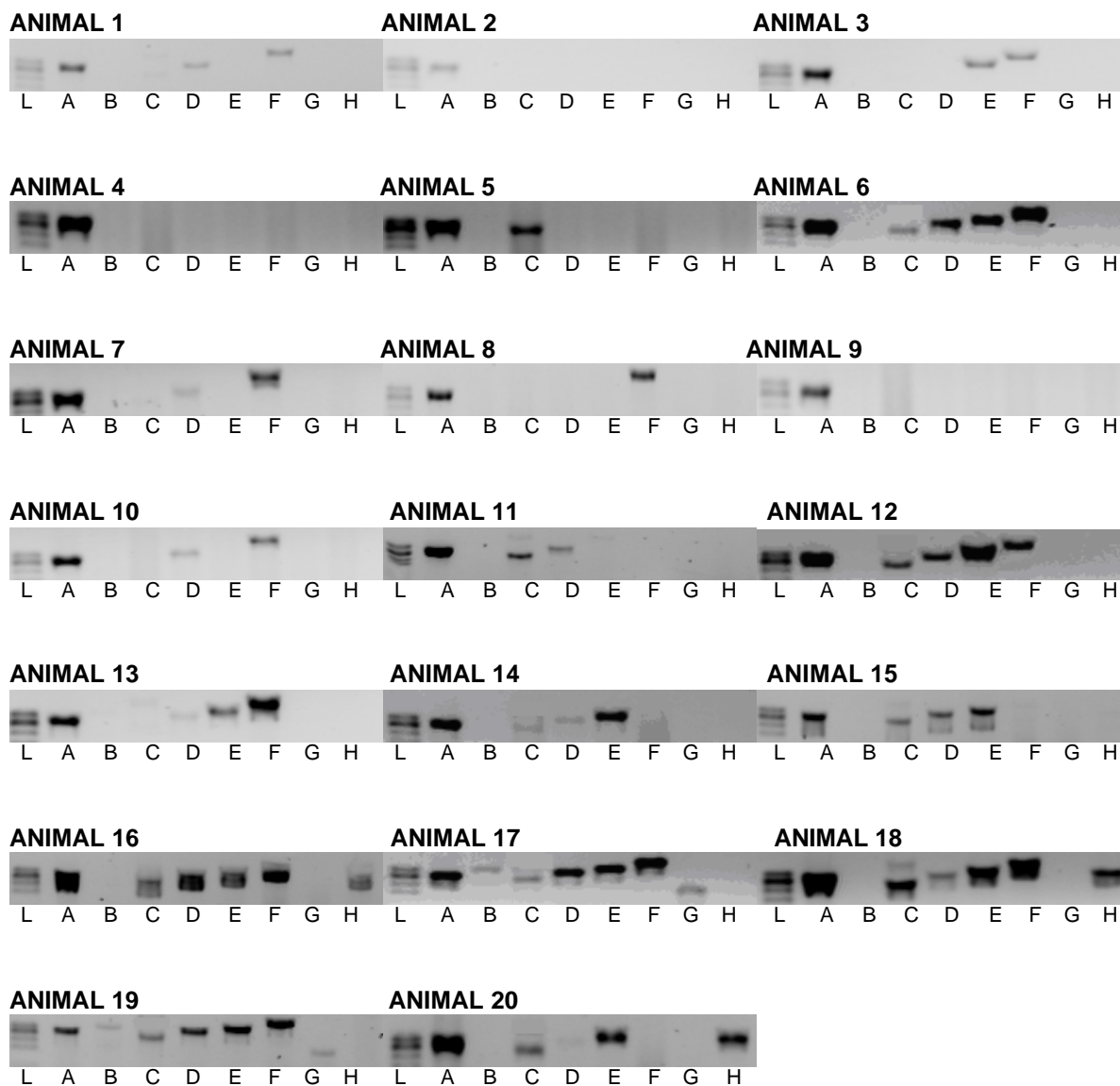


Figura 11. Padrão de bandas obtidas em gel de agarose corado com brometo de etídeo, do “ladder” (L) e dos genes GAPDH (A), IL-2 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IFN- γ (G), e IL-4 (H), nas amostras de conjuntiva bulbar dos animais (n = 20) que constituíram o grupo cinomose. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Tabela 6. Valores individuais e médias das relações entre as intensidades das bandas dos genes estudados (IL-2, IL-1 β , TNF-a, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva GAPDH (GAP), das amostras conjuntivais coletadas dos animais (n = 20) do grupo cinomose. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

| <i>Animal</i> | <i>IL-2/GAP</i> | <i>IL-1/GAP</i> | <i>TNF/GAP</i> | <i>IL-6/GAP</i> | <i>IL-10/GAP</i> | <i>IFN/GAP</i> | <i>IL-4/GAP</i> |
|-------------------------------|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0,30 | 0 | 0,54 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0,34 | 0,31 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0,92 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0,45 | 0,90 | 0,91 | 1,0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0,17 | 0 | 0,66 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,03 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0,46 | 0 | 1,03 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0,83 | 0,42 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0,75 | 1,0 | 1,01 | 1,0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0,47 | 1,01 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0,80 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0,47 | 0,65 | 1,34 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0,25 | 0,39 | 0,28 | 0,65 | 0 | 0,20 |
| 17 | 0,32 | 0,40 | 0,98 | 0,98 | 0,97 | 0,35 | 0 |
| 18 | 0 | 0,99 | 0,53 | 1,00 | 0,98 | 0 | 0,99 |
| 19 | 0,30 | 0,42 | 1,06 | 1,23 | 1,21 | 0,31 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,29 | 0 | 1,40 |
| Média \pm | 0,03 \pm | 0,30 \pm | 0,34 \pm | 0,42 \pm | 0,60 \pm | 0,03 \pm | 0,13 \pm |
| Ep | 0,02 ^(*) | 0,08 | 0,09 | 0,12 | 0,11 | 0,02 ^(*) | 0,03 ^(*) |

(*) Valores estatisticamente menores quando comparados aos valores de expressão relativa dos genes IL-1 β , TNF-a, IL-6 e IL-10.

Nas amostras de conjuntiva bulbar dos animais que constituíram o grupo cinomose, as médias de expressão relativa dos genes IL-6, IL-10, TNF-a e IL-1 β foram estatisticamente maiores, quando comparados às médias dos genes IL-2, IFN- γ e IL-4 (P < 0,05) (Tabela 6 e Figura 12).

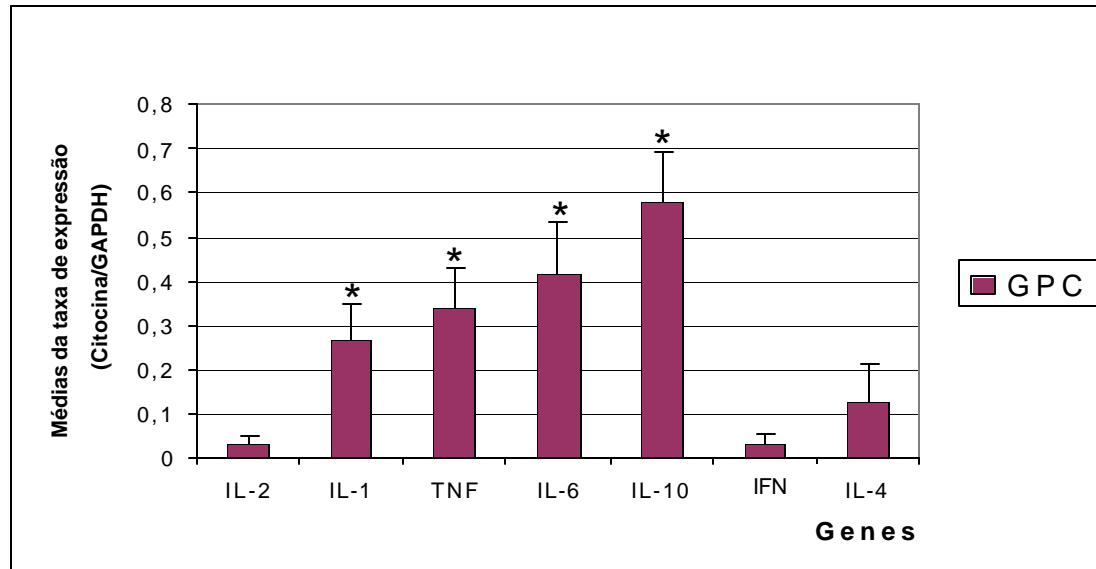


Figura 12. Médias e erros padrão dos valores das relações entre as intensidades das bandas dos genes estudados (IL-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva GAPDH, nas amostras de conjuntiva do grupo cinomose (GPC). (*) Valores estatisticamente maiores quando comparados aos de expressão relativa dos genes IL-2, IFN- γ , e IL-4. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

Quando as médias de expressão relativa do gene IL-1 β foram comparadas entre os grupos controle e cinomose, verificou-se expressão estatisticamente maior no grupo cinomose ($P = 0,015$). As expressões relativas das citocinas TNF- α ($P = 0,008$) e de IL-10 ($P = 0,016$) mostraram-se, igualmente, maiores no grupo cinomose, quando este foi comparado ao grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas não foram identificadas, quando os genes IL-2, IL-6, IFN- γ e IL-4 foram comparados entre os grupos (Figura 13).

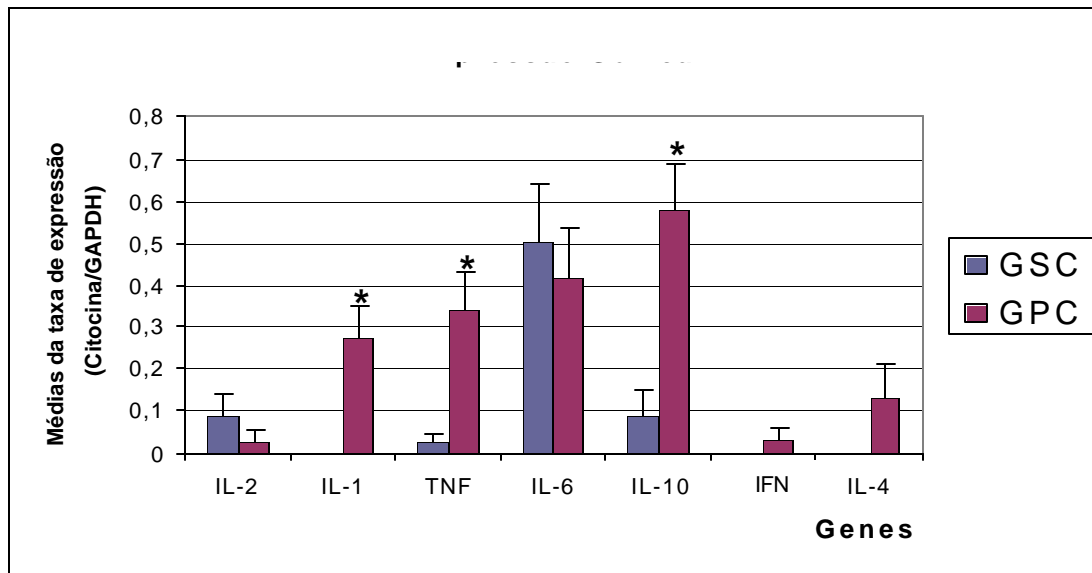


Figura 13. Médias e erros padrão dos valores das relações entre as intensidades das bandas dos genes estudados (IL-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-4) e a intensidade da banda do gene de expressão constitutiva GAPDH, nas amostras de conjuntiva dos grupos controle (GSC) e cinomose (GPC). (*) Diferença estatisticamente significativa do gene estudado entre os grupos. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

4.4. Correlações

No grupo controle, os sinais oftálmicos não se correlacionaram estatisticamente aos achados à histopatologia. Neste grupo, inflamação aguda foi verificada em 20% dos cães estudados e inflamação sub-aguda em 15%. Estes animais não apresentaram sinais clínicos de quemose, blefarospasmo, hiperemia e secreção ocular. Os cães também apresentaram valores negativos para os testes de rosa Bengala e fluoresceína e valores normais do teste lacrimal de Schirmer.

A expressão gênica relativa da IL-6, no grupo controle, foi estatisticamente maior do que os outros genes estudados. Correlação negativa entre a expressão de IL-6 e inflamação aguda foi verificada ($r = -0,5$, $P = 0,02$)

No grupo cinomose, a presença de hiperemia, secreção ocular, positividade para os testes de rosa Bengala e fluoresceína e valores reduzidos do teste lacrimal de Schirmer não puderam ser correlacionadas estatisticamente com a presença de inflamação crônica, à histopatologia, porém, clinicamente, a presença destes eventos estava relacionada. Estes animais também apresentaram diminuição da densidade de células calciformes, presença de queratinização, acantólise e corpúsculos de inclusão.

Embora as expressões relativas dos genes TNF- α , IL-1 β e IL-10 tenham estado aumentadas no grupo cinomose, quando comparada à expressão dos genes IL-2, IFN e IL-4, apenas o TNF- α foi correlacionado positivamente à presença de inflamação crônica ($r = 0,47$, $P = 0,038$).

Os perfis de sinais oftálmicos encontrados nos grupos estudados, assim como de achados histopatológicos e expressão gênica estão dispostos na Figura 14.

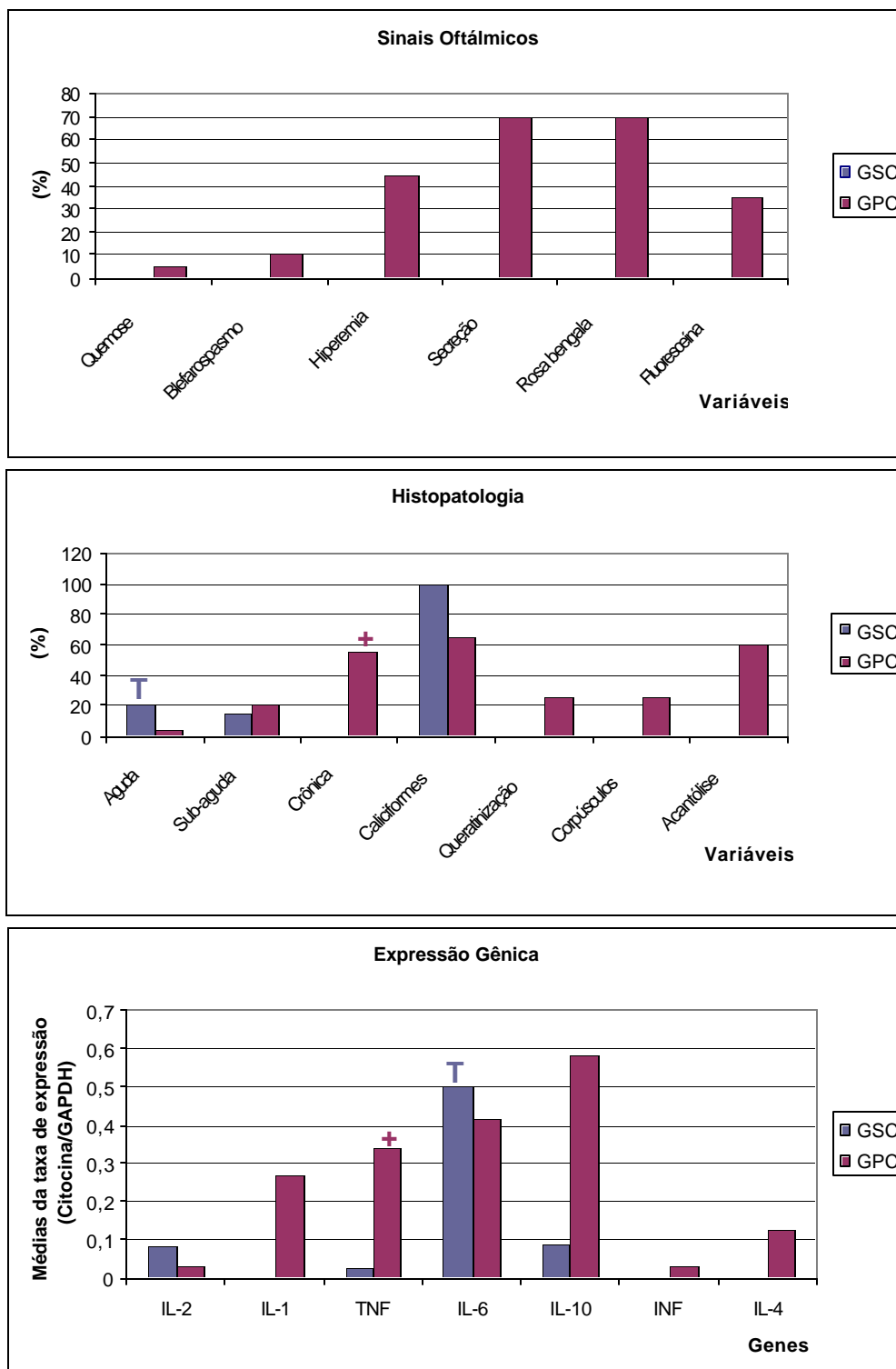


Figura 14. Perfis das porcentagens (%) de ocorrência dos sinais oftálmicos e achados histopatológicos e das médias da taxa de expressão gênica (Citocina/GAPDH) nos grupos controle (GSC) e cinomose (GPC). Jaboticabal, São Paulo, 2006. (+) Correlação positiva entre as variáveis inflamação crônica e expressão de TNF-a no grupo cinomose, (T) correlação negativa entre as variáveis inflamação aguda e expressão de IL-6 no grupo controle.

5 DISCUSSÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma enfermidade freqüentemente encontrada nos cães. Ela é caracterizada por déficit lacrimal, que enseja danos às superfícies corneal e conjuntival (BARRERA, 1992; BEGLEY et al., 2003; KUNERT et al., 2002; PFUGFELDER et al., 2000). Nos últimos 25 anos, não há enfermidade em córnea e superfície ocular que tenha sido mais estudada que a CCS (PFLUGFELDER et al., 2000).

Neste trabalho, estudaram-se animais com CCS secundária à cinomose. Os resultados do teste da lacrimal Schirmer foram inferiores no grupo cinomose, comparativamente ao controle. A diminuição significativa dos valores do Schirmer reproduz o que fora mostrado por GREEN et al. (1989), KASWAN et al. (1983), KASWAN et al. (1985), MARTIN (1999) e TISHLER et al. (1998), que descreveram a cinomose como uma doença viral que acomete a glândula lacrimal, induzindo a quadros de inflamação com CCS secundária.

Outros sinais oftálmicos foram evidenciados neste experimento, tais como hiperemia conjuntival e secreção ocular, comuns na CCS. A presença deles foi maior no grupo cinomose, quando comparado ao grupo controle. Autores como KUNERT et al. (2002), LUBNIEWSKI & NELSON (1990), SALISBURY et al. (1995) e WILCOCK (1993) reportaram-se a estes, entre outros sinais oftálmicos, como decorrentes do déficit lacrimal.

A xeroftalmia causa não apenas desconforto ocular, mas também desencadeia alterações histopatológicas à córnea e conjuntiva (BARRERA, 1992; BEGLEY et al., 2003; KUNERT et al., 2002; PFUGFELDER et al., 2000), por aumento da osmolaridade lacrimal, dessecação e pobre lubrificação da superfície ocular (BARABINO et al., 2004; MARSH & PFUGFELDER, 1999; RAPHAEL et al., 1988).

A realização da histopatologia permitiu verificar alterações na conjuntiva bulbar dos cães da pesquisa. O procedimento pôde ser realizado mediante instilação de colírio anestésico, como o fora por RALPH (1975). As biópsias foram realizadas no quadrante

superonasal, a aproximadamente 5 mm do limbo, como proposto por KUNERT et al. (2002) e PFLUGFELDER et al., (1997).

No grupo cinomose, a presença de células, notadamente macrófagos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, ratificaram a ocorrência de exsudação inflamatória. Evidências de que a inflamação participa na patogênese da ceratoconjuntivite seca são cada vez mais reportadas (KUNERT et al., 2000; KUNERT et al., 2002; MARSH & PFUGFELDER, 1999; PFLUGFELDER et al., 1990; PFUGFELDER et al., 2000; RAPHAEL et al., 1988; TURNER et al., 2000). Inflamação crônica foi encontrada em 55% dos animais, os quais apresentavam infiltrado inflamatório mononuclear, com predomínio de linfócitos e plasmócitos. KUNERT et al. (2000), KUNERT et al. (2002), PFLUGFELDER et al. (1990), PFUGFELDER et al. (2000), POWER et al. (1993), RAPHAEL et al. (1988) e RIVAS et al. (1992) reportaram a predominância de linfócitos, especificamente os linfócitos T, de permeio a plasmócitos, no epitélio conjuntival de pacientes com CCS. RIVAS et al. (1992) afirmaram, ainda, que quando a inflamação se torna crônica, decorre importante aumento no percentil de linfócitos. PFLUGFELDER et al. (2000) relataram que a inflamação crônica da superfície ocular exerce papel decisivo na patogênese da CCS. Os autores afirmaram, ainda, que a inflamação crônica decorre do déficit lacrimal. A correlação entre os valores do teste lacrimal de Schirmer e a presença de inflamação não pôde ser estatisticamente confirmada. Não obstante, os animais do grupo cinomose, que apresentaram valores reduzidos do teste lacrimal de Schirmer, mostraram maior incidência de inflamação crônica.

No grupo controle, 20% dos animais apresentaram inflamação aguda, com predominância de neutrófilos e raros eosinófilos. Em 15% dos cães, decorreu inflamação sub-aguda, com presença de células mono e polimorfonucleares. Ao exame oftálmico, todavia, os animais que compuseram este grupo não apresentaram sinais clínicos sugestivos de inflamação. Segundo RIVAS et al. (1992), correlação entre a intensidade da inflamação e os sinais clínicos oftálmicos não pode ser estabelecida. Os autores relataram que irritantes locais e estados alérgicos podem estar presentes em

animais sem alterações oftálmicas visibilizáveis, contribuindo para um quadro histopatológico de inflamação.

Na CCS, a inflamação crônica na superfície ocular pode induzir a uma metaplasia escamosa. A presença de acantólise, queratinização, ingurgitamento de células epiteliais e degeneração epitelial encontrados no grupo cinomose caracterizaram um quadro de metaplasia escamosa, como resultado do déficit lacrimal na conjuntiva, à similitude do que fora mostrado em pesquisas de outros autores (KUNERT et al., 2002; MARSH & PFUGFELDER, 1999; PFLUGFELDER et al., 1990; PFLUGFELDER et al., 1997; RALPH, 1975; RAPHAEL et al., 1988; RIVAS et al., 1992). Segundo PEIFFER et al. (1998) e WILCOCK (1993), em resposta à irritação crônica da superfície ocular decorrente do déficit lacrimal, a conjuntiva, não queratinizada, sofre metaplasia escamosa, passando a ser identificada como um epitélio escamoso estratificado queratinizado. Em nosso experimento, em 25% dos animais, à histopatologia, houve queratinização e em 60% deles acantólise, ratificando o que fora encontrado na literatura.

PFUGFELDER et al. (1990) verificaram forte correlação entre a exsudação inflamatória e a metaplasia escamosa da conjuntiva bulbar. Tal correlação não foi estatisticamente identificada no presente estudo, entretanto, no grupo cinomose, 80% dos animais exibiram inflamação com sinais histopatológicos de metaplasia escamosa, com queratinização, acantólise ou ambos.

Outro evento que se associa à metaplasia escamosa é a perda de células caliciformes (BARABINO et al., 2004; KUNERT et al., 2002; MARSH & PFUGFELDER, 1999; PFLUGFELDER et al., 1990; PFLUGFELDER et al., 1997; RALPH, 1975; RAPHAEL et al., 1988; RIVAS et al., 1992). De consoante com o que fora descrito por esses autores, os dados obtidos na presente pesquisa mostraram que a densidade de células caliciformes encontrou-se diminuída na conjuntiva bulbar dos animais do grupo cinomose, comparativamente ao grupo controle. Células caliciformes produzem mucina, que é um dos componentes da lágrima (KESSING, 1968). RIVAS et al. (1992) afirmaram que a densidade diminuída das células caliciformes poderia indicar a severidade da doença ocular. PFLUGFELDER et al. (2000) relataram que a produção

reduzida de muco também está associada à patogênese da CCS. Nos cães do grupo cinomose, cujos valores do Schirmer estavam diminuídos, havia densidade reduzida de células caliciformes, maior acantólise e queratinização, e presença de células inflamatórias.

O emprego do rosa Bengala na superfície ocular é oportuno para a avaliação da severidade das lesões (DANJO et al., 1994). BARABINO et al. (2004) e TSENG (1994) afirmaram que o corante se fixa às células epiteliais conjuntivais e corneais pouco ou não protegidas pelo filme lacrimal. Em 70% dos animais do grupo cinomose, houve impregnação, de moderada a severa, pelo corante. Os animais do grupo controle não apresentaram sinais de impregnação. Correlação entre os escores do teste de rosa Bengala e a severidade das lesões conjuntivais, à histopatologia, puderam ser clinicamente identificadas, porém, à estatística, tal não pôde ser comprovada.

Há como admitir que o vírus, por ação direta sobre a glândula lacrimal, tenha desencadeado a diminuição da secreção lacrimal e perda da densidade de células caliciformes, por quebra da homeostase da superfície lacrimal, com diminuição da produção de muco. Uma vez que o muco diminui os efeitos da evaporação sobre a porção aquosa da lágrima, sua redução pode ter contribuído sobremaneira para a ocorrência das alterações, à histopatologia, vistas no presente estudo, corroborando DANJO et al. (1994), PFLUGFELDER et al. (2000) e RIVAS et al. (1992).

A fluoresceína é um corante vital hidrossolúvel utilizado para se avaliar a integridade do epitélio corneano (BARABINO et al., 2004). O teste foi positivo em 35% dos cães do grupo cinomose. A presença de úlceras corneais nestes animais corrobora o que fora descrito por MOORE (1999). Segundo o autor, na CCS, o déficit lacrimal e a inflamação crônica podem desencadear doença corneana progressiva, com malácia estromal, uma vez que a nutrição e a lubrificação corneais estão comprometidas.

Na cinomose, corpúsculos de inclusão do morbilivirus podem ser encontrados no epitélio conjuntival (JEGOU & LIOTET, 1991; MARTIN & STILES, 1998; MOORE & NASISSE, 1998; RAPP & KÖLBL, 1995; RENDER et al., 1982). Na presente pesquisa, 25% dos animais com CCS, portadores de cinomose, submetidos ao procedimento de biópsia, apresentaram, à histopatologia, corpúsculos permeando o epitélio conjuntival,

de característica basofílica e formato arredondado, à similitude do que fora descrito por JEGOU & LIOLET (1991). Embora este achado tenha sido encontrado em 25% e não em 100% dos animais da presente pesquisa, por sua simplicidade operacional, há como admitir que o procedimento possa ser realizado rotineiramente, conferindo maior acurácia ao diagnóstico da cinomose.

Grânulos de melanina, entremeados às células epiteliais e ao tecido conjuntivo frouxo, puderam ser observados em ambos os grupos, a exemplo do que fora mostrado por BOLZAN et al. (2005), quando avaliou, à citologia conjuntival por impressão e à histopatologia, conjuntivas de animais normais.

Segundo KASWAN et al. (1984), correlação entre achados clínicos e histopatológicos pôde ser verificada em apenas 8% dos casos (n = 33). DANJO et al. (1994) não encontraram correlação entre os achados histopatológicos e a severidade das lesões. No presente estudo, os resultados obtidos foram comprobatórios. Achados clínicos e histopatológicos não se correlacionaram estatisticamente.

A expressão gênica foi avaliada pelo método RT-PCR semi-quantitativo, conforme descrito por COLE et al. (2003), DEGEN et al. (2005), KING et al. (2000), LAU et al. (2006), LEE et al. (1999), RUDNER et al. (2000), THAKUR et al. (2002) e XUE et al. (2003). A RT-PCR semi-quantitativa normaliza a quantidade relativa do produto da PCR, derivado do DNA complementar gerado a partir do RNA extraído da amostra tecidual, com a de um gene de expressão constitutiva. Empregou-se o GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), um gene expresso constitutivamente em inúmeros tecidos, como proposto por CHAMIZO et al. (2001), DEGEN et al. (2005), HEGERMANN et al. (2003), LAU et al. (2006) e LEE et al. (1999). Com este método de avaliação, gerou-se um valor de abundância relativa, expresso como citocina/GAPDH, o que permitiu a quantificação relativa dos genes estudados. O GAPDH foi também utilizado como controle positivo de referência, para a variação de concentração e de qualidade do RNA (CHAMIZO et al., 2001). Concentração e qualidade do RNA poderiam interferir sobremaneira na reação de transcrição reversa e no processo de amplificação, fornecendo falsas diferenças na expressão de uma citocina específica,

entre as amostras estudadas (CHAMIZO et al., 2001; GRÖNE et al., 1996; GRÖNE et al., 1998).

O envolvimento de citocinas na destruição da superfície ocular na CCS tem sido cada vez mais estudado (DURSUN et al., 1994; KUNERT et al., 2002; PFLUGFELDER et al., 1999; PFLUGFELDER et al., 2002). Na cinomose, GRÖNE et al. (1998) relataram expressão elevada de IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e TGF, no sangue de cães infectados. Estudo adjunto, realizado com infecção pelo paramixovírus em camundongos, mostrou aumento da expressão de citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IFN- γ , e expressão reduzida de IL-4 e IL-10 (KHUTH et al., 2001).

Na presente pesquisa, a expressão e a semi-quantificação de citocinas na conjuntiva bulbar foram avaliadas em animais aparentemente normais, sem sinais oftálmicos, e em cães com ceratoconjuntivite seca, portadores de cinomose. Os resultados indicaram que os níveis aumentados de citocinas inflamatórias no epitélio conjuntival podem exercer papel decisivo na patogênese da CCS.

Para avaliação das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , utilizaram-se *primers* previamente descritos por CHAMIZO et al. (2001) e HEGERMANN et al. (2003). Durante otimização das reações, obteve-se expressão das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ com as mesmas condições de amplificação, anelamento e extensão descritos pelos autores, porém, para a IL-4, com a temperatura de anelamento de 60°C (CHAMIZO et al., 2001), não se obteve qualquer expressão. Entretanto, à temperatura de 45°C, obteve-se a expressão desta interleucina. As citocinas estudadas foram escolhidas com base nos achados da literatura referentes à relevância destas na patogênese da ceratoconjuntivite seca e de outras enfermidades da superfície ocular.

Com a obtenção dos valores de expressão gênica relativa das citocinas estudadas para cada animal, observou-se que, no grupo cinomose, a IL-6 (0,42) foi significativamente expressa, comparativamente à expressão das outras citocinas. Níveis elevados de IL-6 já foram relatados no epitélio conjuntival (BADOUIN et al., 1997; JONES et al., 1994; RAPHAEL et al., 1988) e no filme lacrimal (PFLUGFELDER et al., 1999; TISHLER et al., 1998) de seres humanos com CCS. A IL-6 é uma citocina

pró-inflamatória que atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (ABBAS & LICHTMANN, 2005; FUJIWARA et al., 2003). Ela é, ainda, uma citocina multifuncional que atua concomitantemente com outras citocinas, como a IL-10, e possui atividade reguladora inibindo a produção de IL-1 e TNF (COLE et al., 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002). Sua gênese pode influenciar inúmeras atividades imune-mediadas no olho (COLE et al., 1999). A IL-6 parece exercer função decisória na regulação do recrutamento de leucócitos para a superfície ocular, controlando a expressão de ICAM-1 (COLE et al., 2003; HOB DEN et al., 1999). O recrutamento rápido e efetivo de células polimorfonucleares para a superfície ocular aparenta exercer papel protetor e é dependente da produção, em níveis satisfatórios, de IL-6 (COLE et al., 2003).

De acordo com TURNER et al. (2000), na CCS, a expressão de IL-6 elevou-se, em olhos de seres humanos com xerofthalmia, quando comparada à de olhos normais. Na presente pesquisa, o mesmo não pôde ser confirmado. No grupo controle, observou-se, também, expressão elevada de IL-6 (0,50 - valor de expressão relativa), comparativamente a expressão reduzida ou nula das demais citocinas estudadas. Segundo COLE et al. (1999) e CUBITT et al. (1995), a IL-6 é produzida constitutivamente em níveis reduzidos pelas células da córnea, o que capacita esta estrutura a elevar, rapidamente, níveis desta interleucina. Tal condição poderia sugerir que a IL-6 estaria também presente, de forma constitutiva, na conjuntiva bulbar, justificando a sua expressão também no grupo controle. Condição adjunta, que justificaria níveis elevados de IL-6 na conjuntiva de pacientes sem alterações oftálmicas detectáveis ao exame clínico, foi a ocorrência de células inflamatórias em 35% dos animais do grupo controle (inflamação aguda em 20% e sub-aguda em 15%). Neutrófilos polimorfonucleares, presentes em quadros de exsudação aguda e sub-aguda, são os primeiros a migrar para o local agredido. SIQUEIRA & DANTAS (2000) relataram que a IL-6 é um dos mediadores inflamatórios indutores desta migração.

O influxo de células inflamatórias para o local da lesão é mediado, em grande parte, por IL-6, TNF-a e IL-1, os quais aumentam a permeabilidade vascular e induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (ABBAS & LICHTMAN, 2005; GRÖNE et al., 1998; TRACEY, 2002). A propósito, no presente estudo,

identificou-se, também, expressão elevada de IL-1 e de TNF-a na conjuntiva dos cães do grupo cinomose.

O TNF-a atua de modo sinérgico à IL-1 (KEADLE et al., 2000). Além disso, age nos fagócitos mononucleares estimulando a secreção de IL-1 (TRACEY, 2002). SOLOMON et al. (2001) relataram a participação da IL-1 β e do TNF-a na CCS, em pacientes com síndrome de Sjögren. Os autores sugeriram haver correlação positiva entre a expressão elevada destas citocinas e a severidade das lesões na superfície ocular, o que pôde ser confirmado neste experimento.

O grupo cinomose apresentou, juntamente com a expressão elevada de IL-1 β e TNF-a, quadros significativamente mais intensos, quando comparado ao grupo controle, de hiperemia, secreção ocular, impregnação pelos corantes rosa Bengala e fluoresceína e condições histopatológicas de inflamação crônica, com metaplasia escamosa.

O conceito de que a inflamação pode alterar a diferenciação epitelial normal é reconhecido, também, em outras enfermidades como na epidermite por psoríase, cujos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, encontram-se elevados (PFLUGFELDER et al., 1999). Forte correlação entre inflamação e apoptose de células epiteliais, incluindo as da superfície ocular, foi descrita por BRIGNOLE et al. (2000) e TSUBOTA et al. (1999). Os autores afirmaram que a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e de TNF-a, poderia estimular a apoptose, ensejando degeneração epitelial. Tais mediadores poderiam, ainda, desencadear esta degeneração por interferir com as conexões neuronais que regulam a homeostase da superfície ocular (BRIGNOLE et al., 2000; STERN et al., 1998; ZOUKHRI et al., 2002).

A expressão elevada das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF-a, nos pacientes com ceratoconjuntivite seca decorrente de cinomose, poderia ser justificada pelo fato de que, independentemente da causa de base para a xeroftalmia, a deficiência lacrimal crônica resulta em estimulação nervosa contínua e excessiva, induzindo a uma inflamação de causa neurogênica, com ativação de células T e subsequente liberação de citocinas na glândula e filme lacrimais, bem como na conjuntiva (AVUNDUK et al., 2003; LEE et al., 2006; STERN et al., 2002). Células epiteliais corneais e conjuntivais são capazes de

produzir IL-6, IL-1 β e TNF-a, os quais estimulam a produção do fator de crescimento neuronal, um mediador que exerce papel significativo na CCS, e participam na inflamação local imune-mediada (LEE et al., 2006).

Neste sentido, o estudo de BRIGNOLE et al. (2000), que evidenciou, por citometria de fluxo, a presença de marcadores inflamatórios na conjuntiva de seres humanos portadores de ceratoconjuntivite seca auto-imune, com diagnóstico de Sjögren ou decorrente de outras causas que não auto-ímmunes, e a expressão elevada de antígenos inflamatórios relacionados à apoptose (CD40), comprova que as células epiteliais, mesmo em casos de CCS de causa não auto-imune, estão diretamente envolvidas no quadro inflamatório imunogenicamente mediado.

Segundo BRIGNOLE et al. (2000) e JONES et al. (1994), em pacientes com CCS, que não de origem auto-imune, o déficit lacrimal induziria a um quadro de inflamação crônica da superfície ocular, decorrente da injúria crônica das células epiteliais, abrasão mecânica exercida pelas pálpebras e, possivelmente, ausência do fator de crescimento epidermal. Entretanto, STERN et al. (2002) relataram que a irritação crônica decorrente do déficit lacrimal não seria a única entre as causas de alterações da superfície ocular nos pacientes com CCS de origem não auto-imune, uma vez que a reatividade para moléculas do MHC II, na superfície de linfócitos e de células epiteliais conjuntivais, já havia sido encontrada. A expressão destes antígenos não seria, então, apenas o resultado da irritação, mas um forte indicativo de resposta imune-mediada. Os autores afirmaram que pacientes com ceratoconjuntivite seca decorrentes de outras causas que não auto-ímmunes, cursam com inflamação imune-mediada, à similitude dos pacientes com diagnóstico de Sjögren.

STERN et al. (2002) identificaram, ainda, infiltração linfocitária conjuntival, independentemente da causa, com presença de células T CD4⁺ e CD8⁺, indicando que a inflamação da superfície ocular teria um componente celular comum. Os autores também identificaram a expressão elevada de ICAM-1, uma integrina que é capaz de exacerbar a resposta inflamatória imune-mediada. A constatação de múltiplos marcadores de inflamação imune-mediada, em qualquer das condições, sugere, também, uma patofisiologia comum.

Com base no que fora proposto por STERN et al. (2002), poder-se-ia sugerir que a etiologia viral da CCS não teria alterado o perfil de expressão gênica obtido no presente estudo, estando a inflamação imune-mediada da superfície ocular exercendo papel primário para as alterações conjuntivais encontradas.

Na presente pesquisa encontrou-se expressão elevada de IL-10 nos cães com ceratoconjuntivite seca. A IL-10 é uma citocina inibidora da resposta imune, com função reguladora da resposta inflamatória exacerbada (COLE et al., 2003), inibindo macrófagos e a ativação de células T, induzindo o sistema imune a um estado de repouso (ABBAS & LICHTMAN, 2005). No olho, o papel da IL-10 não está completamente compreendido (TUMPEY et al., 1998). Segundo COLE et al. (2003), trata-se de uma citocina que regula, para menos, a expressão de TNF- α , IL-6 e IFN- γ , em ceratites por *Pseudomonas aeruginosa*. De conformidade com estes mesmos autores, a IL-10 é um importante modulador da angiogênese na infecção corneana, uma vez que regula a ação do TNF- α , do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de quimiocinas, os quais estão envolvidos com a gênese de vasos sanguíneos.

No presente estudo, a expressão elevada de IL-10 poderia estar atuando na regulação das citocinas TNF- α . No grupo cinomose, 35% dos cães apresentaram ulceração corneana. Neles, a IL-10 ainda estaria atuando na regulação da angiogênese. Naqueles animais em que havia inflamação crônica, vista à histopatologia, há como supor que a IL-10 estaria regulando, para menos, a expressão de mediadores inflamatórios na superfície ocular.

As citocinas IL-4, IL-2 e IFN- γ foram expressas em concentrações mínimas nos animais do grupo cinomose. A qualidade do RNA obtido pôde ser demonstrada pela amplificação do gene constitutivo GAPDH, em todas as amostras empregadas na pesquisa e pelas leituras espectrofotométricas, de tal forma que a ausência ou expressão diminuída das citocinas IL-4, IL-2 e IFN- γ não decorreria da degradação do RNA obtido a partir do tecido conjuntival. Poder-se-ia, então, considerá-las como pouco importantes na patogênese da ceratoconjuntivite seca. Entretanto, a expressão reduzida destas citocinas poderia refletir limitações da pesquisa, na forma como fora

concebida, por ter se valido de cães com CCS naturalmente infectados por uma enfermidade viral, em estágios variados da doença, com cargas virais antigênicas, resposta imune e idades distintas, conforme proposto por GRÖNE et al. (1998), que avaliaram a expressão do RNAm em amostras de sangue total de cães naturalmente infectados por cinomose. KRAKOWKA et al. (1987), em um estudo utilizando cepas R252 do vírus da cinomose para infecção de cães, observaram uma redução na habilidade de macrófagos e monócitos em produzir citocinas durante estágios de viremia. Os autores também observaram depressão da blastogênese e na capacidade de síntese e liberação de imunoglobulinas, assim como falha na produção e na resposta a citocinas. Aumento da produção de prostaglandinas foi identificado em cães durante fases tardias da infecção. As prostaglandinas inibem a função de linfócitos T, a blastogênese, a resposta citotóxica e a produção de IL-2. Tratam-se de condições que podem ter influenciado a expressão das citocinas IL-4, IL-2 e IFN-?. Estudos em condições controladas de infecção, certamente, forneceriam respostas mais fidedignas.

Reconhece-se que o tipo celular predominante na resposta imune mediada por células Th afeta sobremaneira o resultado desta resposta (ENGLISH, 1998), porém, em nosso estudo, a expressão significativa das citocinas IL-6, TNF-a, IL-1 e IL-10 impossibilitou a determinação de um perfil celular Th1 ou Th2. A IL-6 é produzida não apenas por células T CD4⁺ Th2, mas também por outras como monócitos e células próprias da superfície ocular, o que faz com que esta citocina não possa ser considerada um marcador exclusivo de resposta imune do tipo Th2. O TNF-a é também uma citocina que pode ser gerada por macrófagos, células endoteliais e epiteliais, células T CD4⁺ Th1 e Th2. A IL-10 é produzida por células T CD4⁺ Th2 e por macrófagos. Reconhece-se, todavia, que a IL-1 não possui participação de linfócitos em sua produção (CLOUGH & ROTH, 1997; ONGKOSUWITO et al., 1998).

O presente estudo sugere, ainda, a improvável participação de linfócitos TCD4⁺, indutores de respostas imunes, na patogênese da inflamação conjuntival de cães com cinomose. A assertiva decorre da ausência ou reduzida expressão de IL-2, IL-4 e IFN-?, que são produzidas quase que exclusivamente por linfócitos Th1 (IL-2 e IFN-?) e Th2 (IL-4) (CLOUGH & ROTH, 1997).

A participação da IL-6 na patogênese das lesões da superfície ocular na CCS de cães parece também improvável, uma vez que a sua expressão se deu de forma similar nos grupos cinomose e controle. Condição adjunta que comprovaria a hipótese é a correlação negativa, vista ao teste de Spearman, entre a expressão de IL-6 e a presença de inflamação aguda ($r = -0,5$, $P = 0,025$). A expressão elevada de IL-6 na conjuntiva dos animais do grupo controle não decorreria, portanto, da inflamação aguda encontrada em 20% dos cães, mas sim da sua constante produção pelas células residentes da superfície ocular, como fora proposto por COLE et al. (1999).

Pode-se inferir que as citocinas IL-1 β , TNF-a e IL-10 têm participação decisória na patogênese da CCS de cães portadores de cinomose. Correlação positiva entre a inflamação crônica da conjuntiva e a expressão do TNF-a foi encontrada à estatística ($r = 0,466$, $P = 0,038$). Da observação, poder-se-ia admitir a hipótese de que o TNF-a, juntamente com a IL-1 β , a qual tem sua secreção estimulada por este esse mediador (TRACEY, 2002), atuariam na patogênese e severidade das lesões encontradas na superfície ocular na CCS. Contrariamente, a IL-10 agiria inibindo a exsudação inflamatória, conforme descrito por TUMPEY et al. (1998), ao estudarem a participação da IL-10 na ceratite herpética. A IL-10 reduziria, ainda, a expressão de TNF-a e, conseqüentemente, de IL-1 β .

O TNF-a e a IL-1 β já foram descritos como partícipes da resposta da superfície ocular a injúrias (KEADLE et al., 2000). Na CCS, sua expressão mostrou-se aumentada na conjuntiva de pacientes com Sjögren (SOLOMON et al., 2001).

Em resumo, o perfil diferenciado de citocinas encontrado no grupo controle e naquele com cinomose, sugere que a produção de TNF-a, IL-1 e IL-10 desempenha papel relevante na ceratoconjuntivite seca de cães portadores de cinomose. Admiti-se, todavia, a necessidade de estudos futuros buscando-se a expressão de antígeno MHC II pelas células conjuntivais, para que se estabeleça a real participação dos linfócitos T CD4⁺ na gênese destas citocinas. O controle da carga antigênica viral igualmente auxiliaria na determinação da possível participação do vírus no perfil gênico encontrado na conjuntiva dos cães com CCS portadores de cinomose. A concepção de um terceiro grupo, composto por cães com ceratoconjuntivite seca, mas livres de cinomose,

contribuiria para se estabelecer a real participação do vírus nas lesões conjuntivais, sua interferência no perfil gênico encontrado e a origem das alterações da superfície ocular. Pesquisas futuras devem ser realizadas para que tais considerações sejam esclarecidas.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com esta pesquisa, na forma como foi concebida e executada, permite-se concluir que:

- a interleucina 6 exerce uma papel protetor na conjuntiva de cães;
- o fator de necrose tumoral alfa e as interleucinas 1 e 10 exercem participação crítica na patogênese da ceratoconjuntivite seca de cães com cinomose;
- o fator de necrose tumoral alfa e a interleucina 1 contribuem para a severidade das lesões conjuntivais de cães com ceratoconjuntivite seca decorrente de cinomose;
- a interleucina 10 protege a superfície ocular de cães com ceratoconjuntivite seca decorrente de cinomose, podendo apresentar um potencial terapêutico para esta enfermidade;
- cães com ceratoconjuntivite seca decorrente de cinomose apresentam, predominantemente, inflamação conjuntival crônica e metaplasia escamosa do epitélio conjuntival;
- a severidade das lesões, encontradas ao exame clínico oftálmico da superfície ocular de cães com ceratoconjuntivite seca e cinomose, não se correlaciona com os achados histopatológicos.
- A presença de inflamação conjuntival crônica correlaciona-se com a maior expressão de TNF- α .

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMANN, A. H. Citocinas. In: _____. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 11, p. 251-282.

ADAMOVICZ, J.; GAUSE, W. C. RNA purification. In: DIEFFENBACH, O. W.; DUEKSLER, G. S. **A laboratory manual**. USA: CSHL, 1995. p. 287-311.

AGUIRRE, G.; CARMICHAEL, L.; BISTNER, S. Corneal endothelium in viral induced anterior uveitis. **Archives of Ophthalmology**, v. 93, p. 219-224, 1975.

ARVO, Association for research in vision and ophthalmology. **National Institutes of Health Publications**. Sarasota - Flórida, 1985. n. 85-23. 4p.

AVUNDUK, A. M.; AVUNDUK, M. C.; VARNELL, E. D.; KAUFMAN, H. E. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 4, p.593-602, 2003.

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

BARRERA, R.; MAÑÉ, M. C.; RODRIGUEZ, J. F.; JIMÉNEZ, A. Keratoconjunctivitis sicca and diabetes mellitus in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 12, p. 1967-1968, 1992.

* Redigidas conforme as normas ABNT NBR 6023.

BAUDOUIN, C.; BRIGNOLE, F.; BECQUET, F.; PISELLA, P. J.; GOGUEL, A. Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, p. 1458-1464, 1997.

BEGLEY, C. G.; CHALMERS, R. L.; ABETZ, L.; VENKATARAMAN, K.; MERTZANIS, P.; CAFFERY, B. A.; SNYDER, C.; EDRINGTON, T.; NELSON, D.; SIMPSON, T. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 11, p. 4753-4761, 2003.

BENCSIK, A.; MALCUS, C.; AKAOKA, H.; GIRAUDON, P.; BELIN, M. F.; BERNARD, A. Selective induction of cytokines in mouse brain infected with canine distemper virus: structural, cellular and temporal expression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 65, n. 1, p. 1-9, 1996.

BOLZAN, A. A.; BRUNELLI, A. T. J.; CASTRO, M. B.; SOUZA, M. A.; SOUZA, J. L.; LAUS, J. L. Conjunctival impression cytology in dogs. **Veterinary Ophthalmology**. v. 8, n. 6, p. 401-405, 2005.

BOURCIER, T; DE SAINT-JEAN, M.; BRIGNOLE, F.; GOGUEL, A.; BAUDOUIN, C. Expression of CD40 and CD40 ligand in the human conjunctival epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 1, p. 120-126, 2000.

BRIGNOLE, F; PISELLA, P.; GOLDSCHILD, M.; SANT JEAN, M.; GOGUEL, A.; BAUNDOUIN, C. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 6, p. 1356-1363, 2000.

CABRAL, V. P.; LAUS, J. L.; DAGLI, Z. M. L.; PEREIRA, G. T.; TALIERI, I. C.; MONTEIRO, E. R.; MAMEDE, F. V. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands' macroscopic and morphometric characteristics. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 391-397, 2005.

CALDER, V. L.; JOLLY, G.; HINGORANI, M.; ADAMSON, P.; LEONARDI, A.; SECCHI, A. G.; BUCKLEY, R. J.; LIGHTMAN, S. Cytokine production and RNAm expression by conjunctival T-cell lines in chronic allergic eye disease. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 1214-1222, 1999.

CARLTON, A.; WILLIAM, A. V. Canine distemper inclusions in the ciliary body. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 2, p. 164-165, 1982.

CHAMIZO, C.; RUBIO, J. M.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells zby a single tube RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 83, p. 191-202, 2001.

CLOUGH, N. C.; ROTH, J. A. Effector mechanisms. In: _____. **Understanding immunology**. St. Louis: Mosby, 1997. cap. 4, p. 79-143.

COLE, N.; BAO, S.; WILLOX, M.; HUSBAND, A. J. Expression of interleukin-6 in the cornea in response to interaction with different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2497-2502, 1999.

COLE, N.; KROCKENBERGER, M.; BAO, S.; BEAGLEY, K. W.; HUSBAND, A. J.; WILLCOX, M. Effects of exogenous interleukin-6 during *Pseudomonas aeruginosa* central infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 4116-4119, 2001.

COLE, N.; BAO, S.; STAPLETON, F.; THAKUR, A.; HUSBAND, A. J.; BEAGLEY, K. W.; WILLCOX, M. D. P. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in IL-6 deficient mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 130, p. 165-172, 2002.

COLE, N.; KROCKENBERGER, M.; STAPLTON, F.; KHAN, S.; HUME, E.; HUSBAND, A. J.; WILLCOX, M. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in interleukin-10 gene knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1328-1336, 2003.

CUBITT, C. L.; LAUSCH, R. N.; OAKES, J. E. Differences in interleukin-6 gene expression between cultured human corneal epithelial cells and keratocytes. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, v. 36, p. 330-336, 1995.

DANJO, Y.; LEE, M.; HORIMOTO, K.; HAMANO, T. Ocular surface damage and tear lactoferrin in dry eye syndrome. **Acta Ophthalmologica**, v. 72, p. 433-437, 1994.

De SAINT JEAN, M.; BRIGNOLE, F.; FELDMANN, G.; GOGUEL A.; BAUDOUIN, C.; Interferon- γ induces apoptosis and expression of inflammation related proteins in Chang conjunctival cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, v. 40, p. 2199-2212, 1999.

DEGEN, W. G. J.; VAN DAAL, N.; ROTHWELL, L.; KAISER, P.; SCHIJNS, V. E. J. C. Th1/Th2 polarization by viral and helminthes infection in birds. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 163-167, 2005.

DILLY, P. N. On the nature and the role of the subsurface vesicles in the outer epithelial cells of the conjunctiva. **British Journal of Ophthalmology**, v. 69, p. 477-481, 1985.

DURSUN, D.; WANG, M.; MONROY, D.; LI, D.; BALAKRISHNA, L. L.; STERN, M. E.; PFLUGFELDER, S. C. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 3, p. 632-638, 2002.

ENGLISH, R. V. Immune response and the eye. In: GELATT, K. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. cap. 6, p. 239-258.

FAIRCHILD, G. A.; WYMAN, M.; DONOVAN, E. F. Fluorescent antibody technique as a diagnostic test canine distemper infection: detection of viral antigen in epithelial tissues of experimentally infected dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 28, n. 124, p. 761-768, 1967.

FUJIWARA, S.; YASUNAGA, S.; IWABUCHI, S.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from dogs experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 93, p. 9-20, 2003.

GAO, J.; MORGAN, G.; TIEU, D.; SCHWALB, T.A.; LUO, J.Y.; WHEELER, L.A.; STERN, M.E. ICAM-1 expression predisposes ocular tissue to immune-based inflammation in dry eye patients and Sjögrens syndrome-like MRL-lpr mice. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 823-835, 2004.

GELLAT, K. N. Canine lacrimal and nasolacrimal diseases. In: _____. **Veterinary Ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 280-288.

GHIASI, H.; CAI, S.; SLANINA, S. M.; PERNG, G.; NESBURN, A. B.; WECHSLER, S. L. The role of interleukin (IL)-2 and IL-4 in herpes simplex virus type 1 ocular replication and eye disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1086-1093, 1999.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GRABER, H. U.; MÜLLER, C. F.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes. **Acta Neuropathologica**, v. 90, p. 312-318.

GREEN, J. E.; HINRICHS, S. H.; VOGEL, J.; JAY, G. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. **Nature**, v. 341, n. 7, p. 72-74, 1989.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998. cap. 3. p. 9-22.

GREINER, J. V.; WEIDMAN, T. A.; KORB, D. R.; ALLANSMITH, M. R. Histochemical analysis of secretory vesicles in nongoblet conjunctival epithelial cells. **Acta Ophthalmologica**, v. 63, p. 89-92, 1985.

GRÖNE, A.; WECKMANN, M. T.; CAPEN, C. C.; ROSOL, T. J. Canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) complementary DNA: polymerase chain reaction amplification, cloning, partial sequences analysis, and use as loading control in ribonucleases protection assays. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 254-257, 1996.

GRÖNE, A.; FRISK, A. L.; BAUMGARTNER, W. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, n. 1, p. 11-27, 1998.

HEGEMANN, N.; WONDIMU, A.; ULLRICH, K.; SCHMIDT, M. F. G. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, p. 199-204, 2003.

HENDRIX, V. H. Diseases and surgery of the canine conjunctiva. In: GELATT, K. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. cap. 18, p. 621, 1998.

HICKS, S.; CORFIELD, A. P.; KASWAN, R. L.; HIRSH, S.; STERN, M.; BARA, J.; CARRINGTON, S. D. Biochemical analysis of ocular surface mucin abnormalities in dry eye: the canine model. **Experimental Eye Research**, v. 67, p. 709-718, 1998.

HINGORANI, M.; CALDER, V.; BUCKLEY, R. J.; LIGHTMAN, S. The immunomodulatory effect of topical cyclosporine A in atopic keratoconjunctivitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 2, p. 392-399, 1999.

HOVDING, G. The central corneal thickness in keratoconjunctivitis sicca. **Acta Ophthalmologica**, v. 70, p. 108-110, 1992.

HURST, S. M.; COLLINS, S. M. Mechanism underlying tumor necrosis factor- α suppression of norepinephrine release from rat mesenteric plexus. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 1123-1129, 1994.

JABS, D. A.; PREDERGAST, R. A.; RORER, E. M.; HUDSON, A. P.; WHITTUM-HUDSON, J. A. Cytokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 11, p. 2567-2571, 2001.

JÉGOU, J. P.; LIOTET, S. The benefit of conjunctival scraping cytology in the biological diagnosis of conjunctivitis in the dog and cat. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 26, n. 6, p. 567-580, 1991.

JONES, T. J.; MONROY, D.; JI, Z.; ATHERTON, S. S.; PFLUGFELDER, S. C. Sjögren syndrome: cytokine and Epstein-barr viral gene expression within the conjunctival

epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, n. 9, p. 3493-3504, 1994.

KASWAN, R. L.; MARTIN, C. L.; DAWE, D.L. Rheumatoid factor determination in 50 dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 10, 1983.

KASWAN, R. L.; MARTIN, C. L.; CHAPMAN Jr, W. L. Keratoconjunctivitis sicca: histopathologic study of nictitating membrane and lachrymal gland from 28 dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 112-118, 1984.

KASWAN, R. L.; MARTIN, C. L.; DAWE, D. L. Keratoconjunctivitis sicca: Immunological evaluation of 62 dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 2, p. 376-383, 1985.

KASWAN, R. L.; SALISBURY, M. A.; WARD, D. A. Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca, a useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with cyclosporine eye drops. **Archives of Ophthalmology**, v. 107, p. 1210-1216, 1989.

KASWAN, R. L.; SALISBURY, M. A. A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca treatment with ophthalmic cyclosporine. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 20, p. 583-613, 1990.

KEADLE, T. L.; USUI, N.; LAYCOCK, K. A.; MILLER, J. K.; PEPOSE, J. S.; STUART, P. M. Il-1 and TNFa are important factors in the pathogenesis of murine herpetic stromal keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 1, p. 96-102, 2000.

KESSING, S. V. Mucous gland system of the conjunctiva. **Acta Ophthalmologica (Copenh.) Supplement**, v. 95, p. 1-133, 1968.

KING, W. J.; COMER, R. M.; HUDDE, T.; LARKIN, D. F. P.; GEORGE, A. J. T. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation. **Transplantation**, v. 70, n. 8, p. 1225-1233, 2000.

KIYONO, H. Mucosal immune system: close encounter in the uncharted world of immunology. **Ophthalmology**, v. 5, p. 215-222, 2001.

KHUTH, S. T.; AKAOKA, H.; PAGENSTECHE, A.; VERLAETEN, O.; BELIN, M. F.; GIRAUDON, P.; BERNARD, A. Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 8268-8285, 2001.

KRAKOWKA, S.; RINGLER, S.S.; LEWIS, M.; OLSEN, R.G.; AXTHELM, M.K. Immunosuppression by canine distemper virus: modulation of in vitro immunoglobulin synthesis, interleukin release and prostaglandin E2 production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, p. 181-201, 1987.

KROGH, E. K.; ARLIEN-SOEBORG, P.; HALBERG, P. Sjögren's syndrome in patients with multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 84, p. 68-69, 1991.

KUNERT, K. S.; TISDALE, A. S.; STERN, M. E.; SMITH, J. A.; GIPSON, I. K. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effects of conjunctival lymphocytes. **Archives Ophthalmology**, v. 118, n. 11, p. 1489-1496, 2000.

KUNERT, K. S.; TISDALE, A. S.; GIPSON, I. K. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. **Archives Ophthalmology**, v. 120, p. 330-337, 2002.

LAU, K. M.; LEAV, I.; HO, S. M. Rat estrogen receptor- α and $-\beta$, and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the Noble rats. **Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 424-427, 2006.

LAVACH, J. D.; THRALL, M. A.; BENJAMIM, M. M.; SEVERIN, G. A. Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 170, p. 722-727, 1977.

LEE, K. F.; LAU, K. M.; HO, S. M. Effects of cadmium on metallothionein-I and metallothionein-II mRNA expression in rat ventral, lateral, and dorsal prostatic lobes: quantification by RT-PCR. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 154, p. 20-27, 1999.

LEE, H. K.; RYU, I. H.; SEO, K. Y.; HONG, S.; KIM, H. C.; KIM, E. K. Topical 0.1% prednisolone lowers nerve growth factor expression in keratoconjunctivitis sicca patients. **Ophthalmology**, v. 113, n. 2, p. 198-205, 2006.

LUBNIEWSKI, A. J.; NELSON, J. D. Diagnosis and management of dry eye and ocular surface disorders. **Ophthalmology Clinics of North America**, v. 3, p. 575-594, 1990.

LUCIANO, R. L. **Desenvolvimento da técnica de RT-PCR-ELISA para a detecção do vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI)**. 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MARSH, P.; PFLUGFELDER, S. C. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren syndrome. **Ophthalmology**, v. 106, n. 4, p. 811-816, 1999.

MARTIN, C. L. Ocular manifestations of systemic disease. In: GELLAT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. cap. 37, p. 1401-1448.

MARTIN, C. L.; KASWAN, R. L. Distemper-associated keratoconjunctivitis sicca. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 21, p. 355-359, 1985.

MARTIN, C. L.; STILES, J. Ocular infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998. cap. 93, p. 663-664.

McLAUGHLIN, S. A.; BRIGHTMAN II, A. H.; HELPER, L. C.; PRIMM, N. D.; BROWN, M. G.; GREELEY, S. Effect of removal of lachrymal and third eyelid glands on Schirmer tear test results in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 7, p. 820-822, 1988.

MEE, A. P.; SHARPE, P. T. Dog's distemper and paget's disease. **Bioessays**, v. 15, n. 12, p. 783-789, 1993.

MEE, A. P.; HOYLAND, P. B.; BENNETT, D.; SHARPE, P. T. Canine bone marrow cell cultures infected with canine distemper virus: an in vitro model of paget's disease. **Bone**, v. 17, (4 Supl.), p. 461-466, 1995.

MOORE, C. P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: GELLAT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. cap. 16. p. 583-607.

MOORE, C. P.; WILSMAN, N. J.; NORDHEIN, E. V.; MAJORS, L. J.; COLLIER, L. L. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, n. 12, p. 1925-1932, 1987.

MOORE, C. P.; COLLIER, L. L. Ocular surface disease associated with loss of goblet cells in dogs. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 26, p. 458-465, 1990.

MOORE, C. P.; NASISSE, M. P. Clinical microbiology. In: GELATT, K. **Veterinary Ophthalmology** 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. cap. 7, p. 263-264.

MORGAN, R. E.; ABRAMS, K. L. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 8, p. 1043-1046, 1991.

NIEMIALTOWSKI, M. G.; ROUSE, B. T. Predominance of Th1 cells in ocular tissues during herpetic stromal keratitis. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 9, p. 3035-3039, 1992.

ONGKOSUWITO, J. V.; FERON, E. J.; VAN DOORNIK, C. E. M.; LELIJ, A. V.; HOYNG, C. B.; HEIJ, E. C.; KIJLSTRA, A. Analysis of immunoregulatory cytokines in ocular fluid samples from patients with uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 13, p. 2659-2665, 1998.

PEIFFER, R. L.; XILCOCK, B. P.; DUBIELZIC, R. R.; RENDER, J. A.; WHITELEY, H. E. Fundamentals of veterinary ophthalmic pathology. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. cap. 9, p. 355-426.

PFLUGFELDER, S. C.; HUANG, A. J. W.; FEUER, W.; CHUCHOVSKI, P. T.; PEREIRA, I. C.; TSENG, S. C. G. Conjunctival features of primary Sjögren's syndrome. **Ophthalmology**, v. 97, n. 8, p. 985-991, 1990.

PFLUGFELDER, S. C.; TSENG, S. C. G.; YOSHINO, K.; MONROY, D.; FELIX, C.; REIS, B. L. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose Bengal staining in patients with ocular irritation. **Ophthalmology**, v. 104, n. 2, p. 223-235, 1997.

PFLUGFELDER, S. T.; JONES, D.; JI, Z.; AFONSO, A.; MONROY, D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. **Current Eye Research**, v. 19, n. 3, p. 201-211, 1999.

PFLUGFELDER, S. C.; SOLOMON, A.; STERN, M. E. The diagnosis and management of dry eye. A twenty-five-year review. **Cornea**, v. 19, n. 5, p. 644-649, 2000.

PISELLA, P. J.; BRIGNOLE, F.; DEBBASCH, C.; LOZATO, P. A.; GARCHER, C. C.; BARA, J.; SAIAG, P.; WARNET, J. M.; BAUDOUIN, C. Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca. **Ophthalmology**, v. 107, n. 10, p. 1841-1849, 2000.

POWER, W. J.; MULLANEY, P.; FARREL, M.; COLLUM, L. M. Effect of topical cyclosporine A on T cells in patients with secondary Sjögren syndrome. **Cornea**, v. 12, p. 507-511, 1993.

QUIMBY, F. W.; SCHWARTZ, R. S.; POSKITT, T.; LEWIS, R. M. A disorder of dogs resembling Sjögren's syndrome. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 471-476, 1979.

RALPH, R. A. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 14, n. 4, p. 299-302, 1975.

RAPHAEL, M.; BELLEFQIH, S.; PIETTE, J. C. H.; HOANG, P.L.; DEBRE, P.; CHOMETTE, G. Conjunctival biopsy in Sjögren's syndrome: correlations between histological and immunohistochemical features. **Histopathology**, v. 13, p. 191-202, 1988.

RAPP, E.; KÖLBL, S., Ultra structural study of unidentified inclusions in the cornea and iridocorneal angle of dogs with pannus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 6, p. 779-785, 1995.

RENDER, J. A.; CARLTON, W. W.; VESTRE, W. A. Canine distemper inclusions in the ciliary body. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 2, p. 164-165, 1982.

RIVAS, L.; OROZA, M. A.; PEREZ-ESTEBAN, A.; MURUBE-DEL-CASTILLO, J. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 230, p. 329-334, 1992.

ROSENBAUM, J. T.; PLANCK, S. R.; HUANG, X.; RICH, L.; ANSEL, J. C. Detection of mRNA for the cytokines, interleukin-1 and interleukin-8, in corneas from patients with pseudophakic bullous keratopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, n. 10, p. 2151-2155, 1995.

ROTTMAN, J. B.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. A reverse transcription-quantitative competitive chain reaction (RT-qPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic animals. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 242-248, 1996.

RUDNER, X. L.; KERNACKI, K. A.; BARRET, R. P.; HAZLETT, L. Prolonged elevation of IL-1 in *Pseudomonas aeruginosa* ocular infection regulates macrophage-inflammatory

protein-2 production, polymorphonuclear neutrophil persistence, and corneal perforation. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 6576-6582, 2000.

SAITO I.; TERAUCHI K.; SHIMUTA M.; NISHIMURA S.; YOSHINO K.; TAKEUCHI T.; TSUBOTA K.; MIYASAKA N. Expression of cell adhesion molecules in the salivary and lacrimal glands of Sjögren's syndrome. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 7, n. 3, p. 180-187, 1993.

SALISBURY, M A. R.; KASWAN, R. L.; BROWN, J. Microorganisms isolated from corneal surface before and during topical cyclosporine treatment in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 7, p. 880-883, 1995.

SANO, Y.; OSAWA, H.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. Cytokine expression during orthotropic corneal allograft rejection in mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 10, p. 1953-1957, 1998.

SANSOM, J.; BARNETT, K. C. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 26, n. 6, p. 121-131, 1985.

SANSOM, J.; BARNETT, W. N.; SCHULTE-NEUMANN, A.; CLERC, B.; JEGOU, J. P.; HAAS, V.; WEINGARTEN, A. Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical field trial. **The Veterinary Record**, v. 137, n. 11, p. 504-507, 1995.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SCHERDING, R. G. Cinomose. In: BIRCHARD, S. J., SCHERDING, R. G. **Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998. cap. 6, p. 120-123.

SIQUEIRA, J. F.; DANTAS, C. J. S. In: _____. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Editora Médica Científica, 2000. cap. 2. p. 73-83.

SOLOMON, A.; DURSUN, D.; LIU, Z.; MACRI, A.; PFLUGFELDER, S. C. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 10, p. 2283-2292, 2001.

STAATS, H. F.; LAUSH, R. N. Cytokine expression in vivo during murine herpetic stromal keratitis. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 1, p. 277-283, 1993.

STERN, M.E.; BEUERMAN, R.W.; FOX, R.I.; GAO, J.; MIRCHEFF, A.K.; PFLUGFELDER, S.C. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. **Cornea**, v. 17, p. 584-59, 1998.

STERN, M. E.; GAO, J.; SCHWALB, T. A.; NGO, M.; TIEU, D. D.; CHAN, C.; REIS, B. L.; WHITCUP, S. M.; THOMPSON, D.; SMITH, J. A. Conjunctival T-cell subpopulation in Sjögren and non-sjögren's patients with dry eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 8, p. 2609-2614, 2002.

STREILEIN, J. W.; SHARMILA, M.; TAKEUCHI, M.; KEZUKA, T. The eye's view of antigen presentation. **Human Immunology**, v. 63, p. 435-43, 2002.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. G. Does virus persist in uvea in multiple sclerosis, as in canine distemper encephalomyelitis? **The Lancet**, n. 13, p. 372-375, 1983.

TANI, K.; MORIMOTO, M.; HAYASHI, T.; INOKUMA, H.; OHNISHI, T.; HAYASHIYA, S.; NOMURA, T.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Evaluation of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells from dogs with canine demodicosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 6, p. 513-518, 2002.

THAKUR, A.; XUE, M.; STAPLETON, F.; LLOYD, A. R.; WAKEFIELD, D.; WILLCOX, M. D. P. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines correlates with outcome of acute experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 2187-2197, 2002.

TISHLER, M.; YARON, I.; GEYER, O.; SHIRAZI, I.; NAFTALIEV, E.; YARON, M. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with sjögren syndrome. **Ophthalmology**, v. 105, n. 12, p. 2327-2329, 1998.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 19/26, p. 853-859, 2002.

TSENG, S. C. Evaluation of the ocular surface in dry eye conditions. **International Ophthalmology Clinics**, v. 34, p. 57-69, 1994.

TSUBOTA, K.; FUKAGAWA, K.; FUJIHARA, T.; SHIMMURA, S.; SAITO, I.; SAITO, K.; TAKEUCHI, T. Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 1, p. 28-34, 1999.

TUMPEY, T. M.; CHENG, H.; COOK, D. N.; SMITHIES, O.; OAKES, J. E.; LAUSCH, R. N. Absence of macrophage inflammatory protein-1a prevents the development of blinding herpes stromal keratitis. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3705-3710, 1998.

TURNER, K.; PFLUGFELDER, S. C.; JI, Z.; FEUER, W. J.; STERN, M.; REIS, B. L. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. **Cornea**, v. 19, p. 492-496, 2000.

VENTURA, A. C. S.; ENGELMANN, C. D.; BÖHNKE, M. Endotoxins modulate the autocrine function of organ cultured donor corneas and increase the incidence of endothelial cell death. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 12, p. 1093-1098, 1997.

WHITCUP, S. M. The double-edged ocular immune response. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 11, p. 3243-3248, 2000.

XUE, M. L.; THAKUR, A.; WILLCOX, M. D. P.; ZHU, H.; LLOYD, A. R.; WAKEFIELD, D. Role and regulation of CXC-chemokines in acute experimental keratitis. **Experimental Eye Research**, v. 76, p. 221-231, 2003.

XUE, M. L.; WAKEFIELD, D.; WILLCOX, M. D. P.; LLOYD, A. R.; GIROLAMO, N. D.; COLE, N.; THAKUR, A. Regulation of MMPs and TIMPs by IL-1 β during corneal ulceration and infection. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 5, p. 2020-2025, 2003(a).

YAMAMOTO, J. H.; HAYASHI, S.; SCARPI, M. J.; GOMES, J. A. P.; DUA, H. S.; BELFORT Jr, R. Imunologia do olho. In: GOMES, J. A. P.; ALVES, M. R. **Superfície ocular**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 25-35.

YEH, S.; SONG, X. J.; FARLEY, W.; LI, Q.; STERN, M. E.; PFLUGFELDER, S. C. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 1, p. 124-129, 2003.

ZOUKHRI, D.; HODGES, R. R.; BYON, D.; KUBLIN, C. L. Role of pro-inflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 5, p. 1429-1436, 2002.

ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; DUMAS, M. Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro. **Laboratory Investigative**, v.54, p. 424-431, 1986.

APÊNDICE A

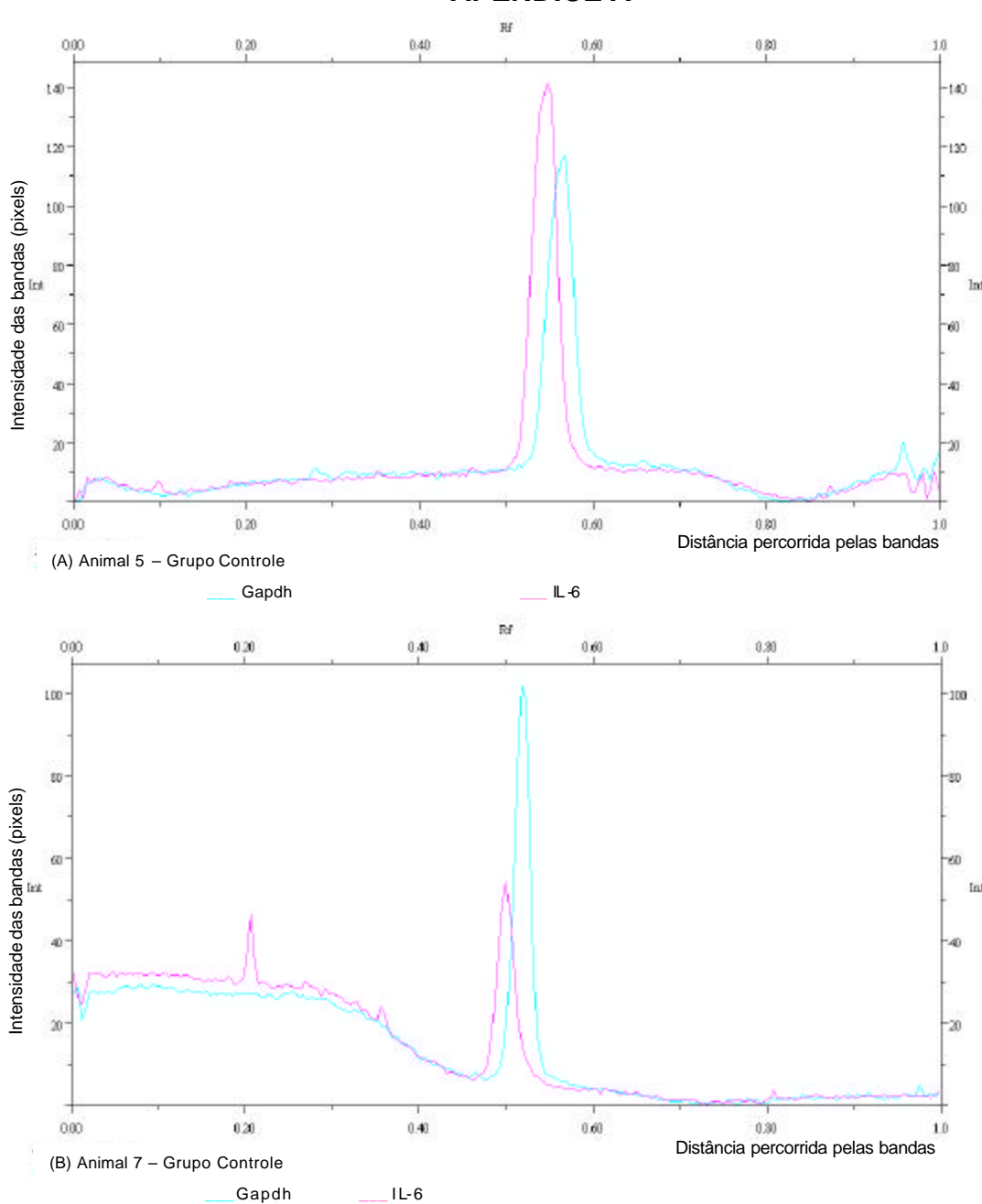


Figura 1A. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 5 **(A)** e 7 **(B)**, pertencentes ao grupo controle.

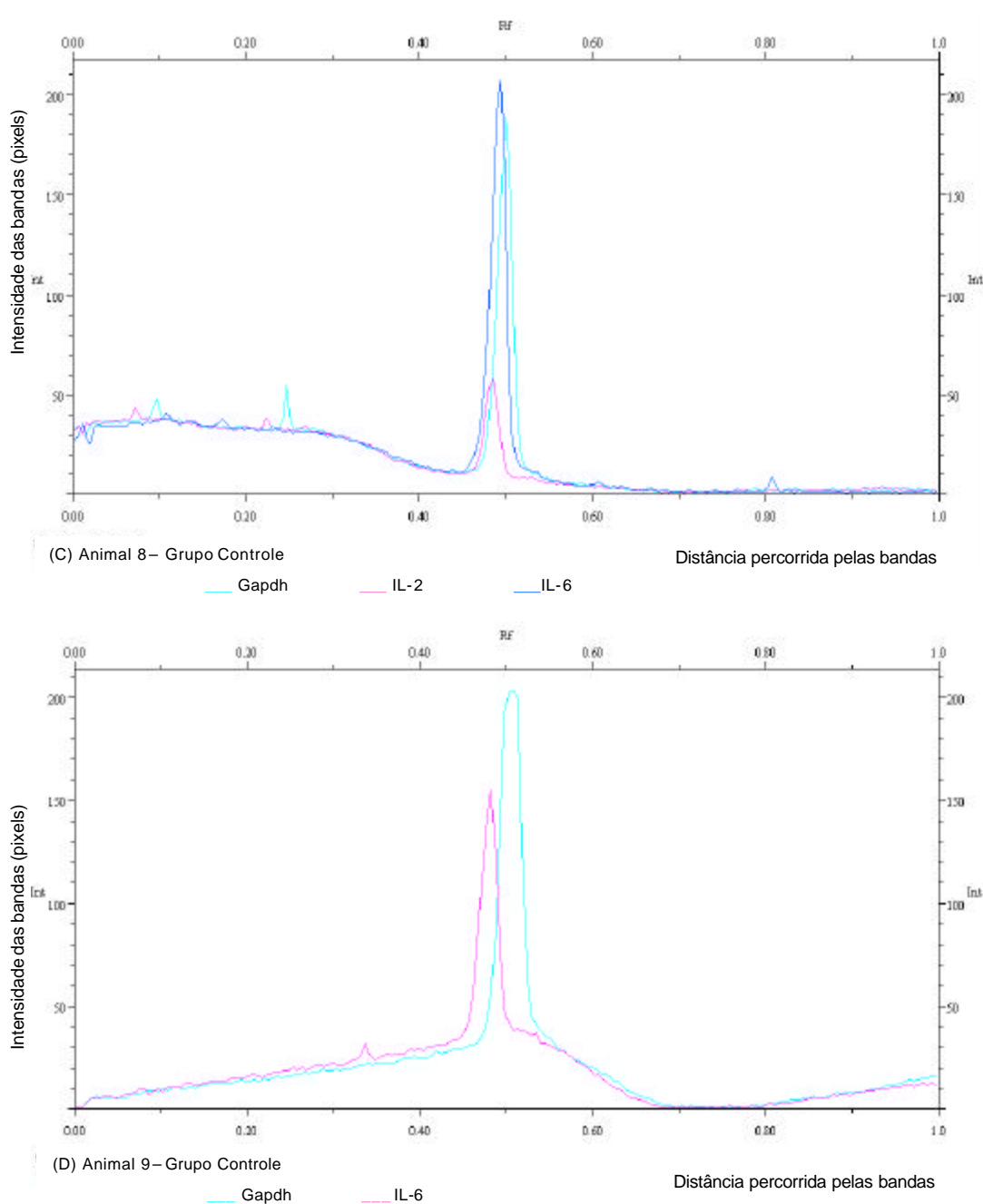


Figura 2A. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int), eixo Y, e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf), eixo X, no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrado nos animais 8 (C) e 9 (D), pertencentes ao grupo controle.

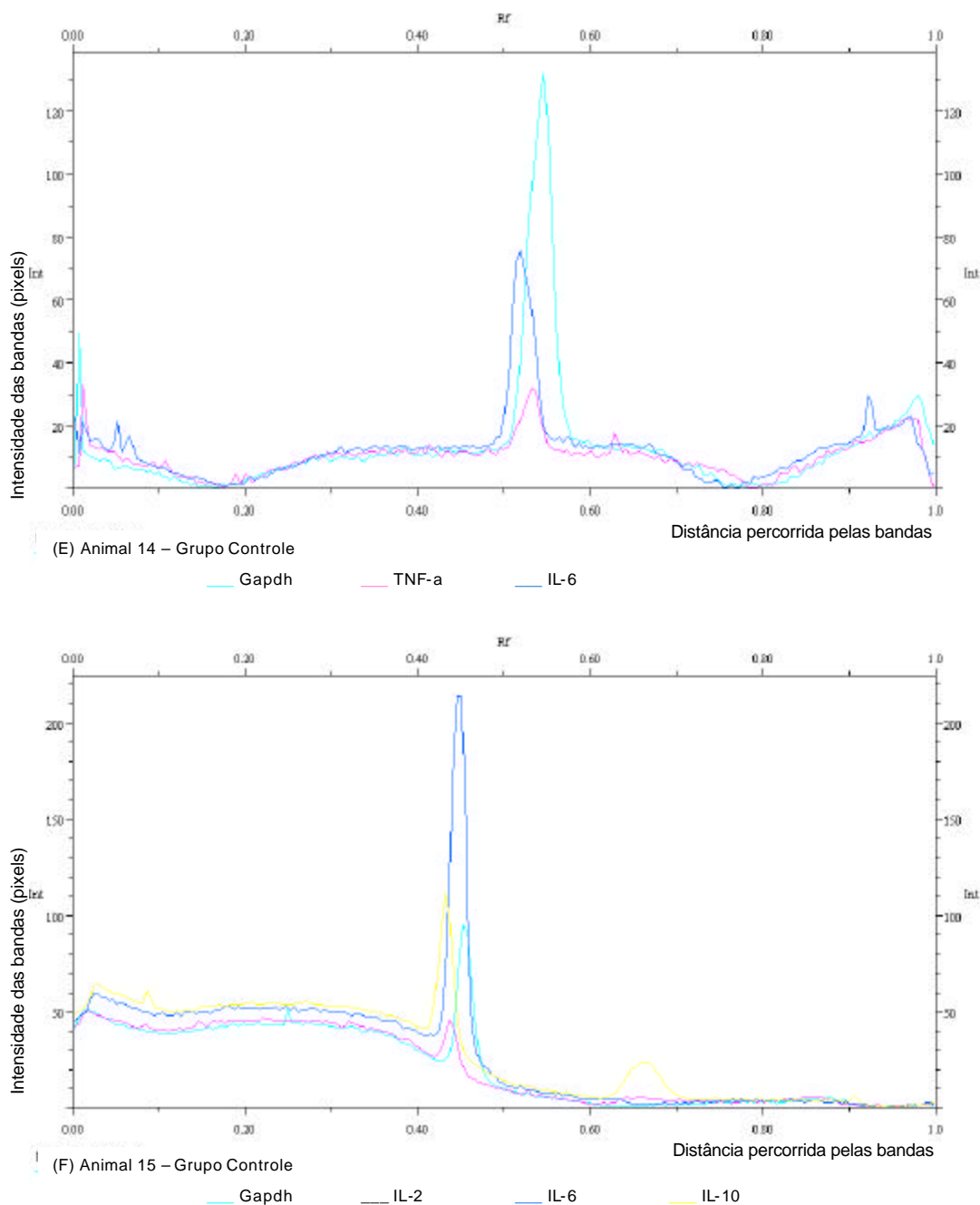


Figura 3A. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 14 (E) e 15 (F), pertencentes ao grupo controle.

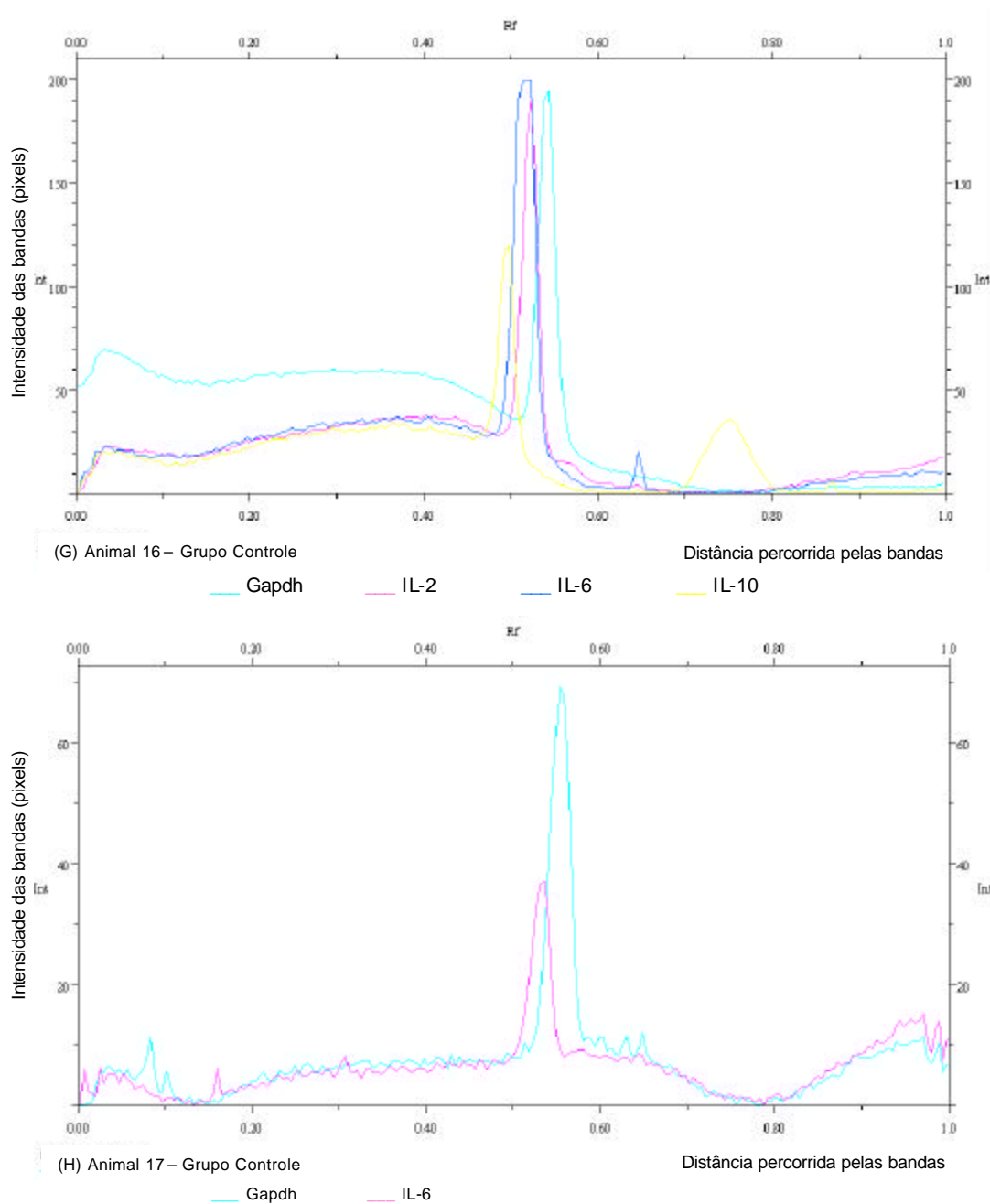


Figura 4A. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 16 (G) e 17 (H), pertencentes ao grupo controle.

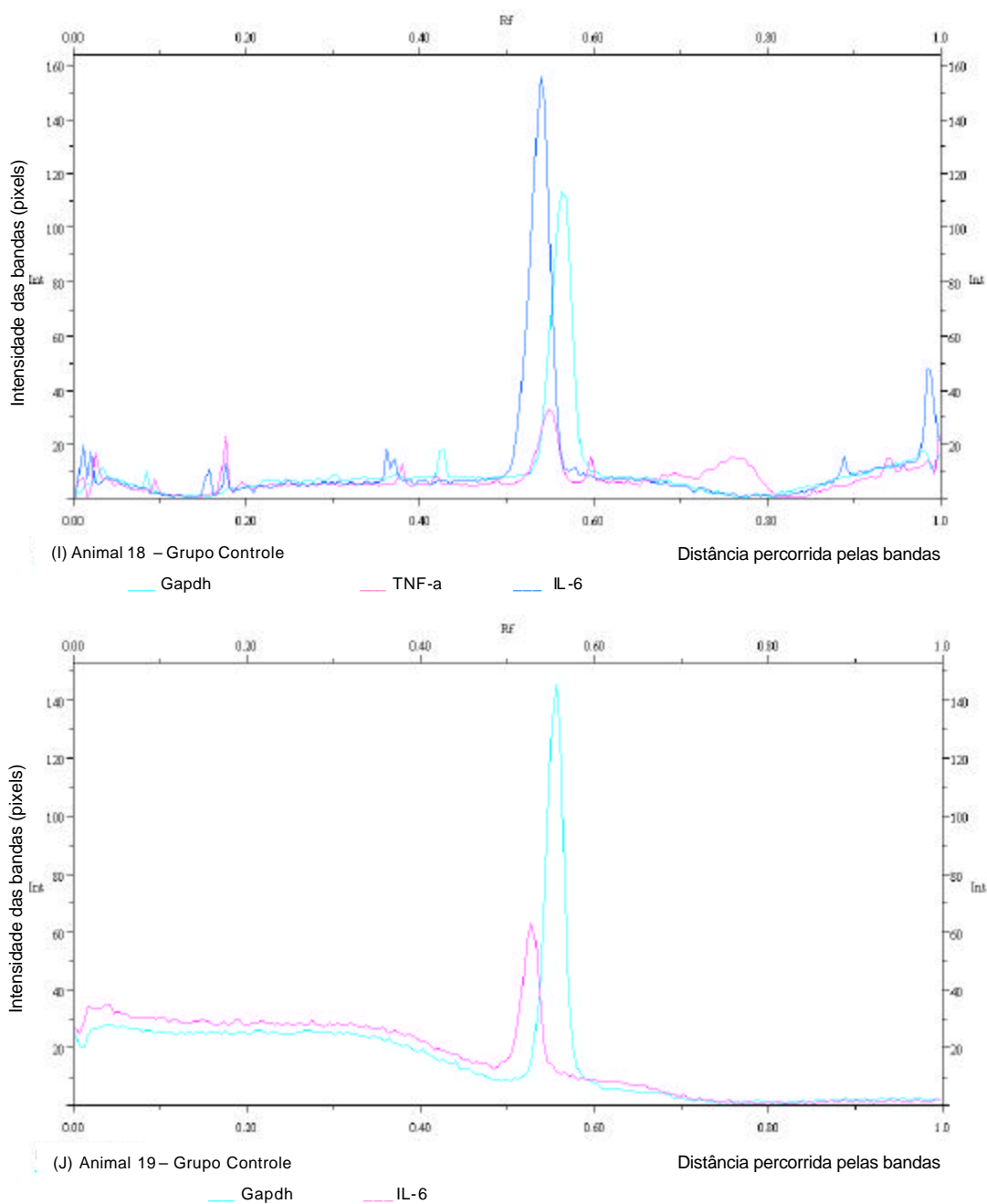


Figura 5A. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 18 (I) e 19 (J), pertencentes ao grupo controle.

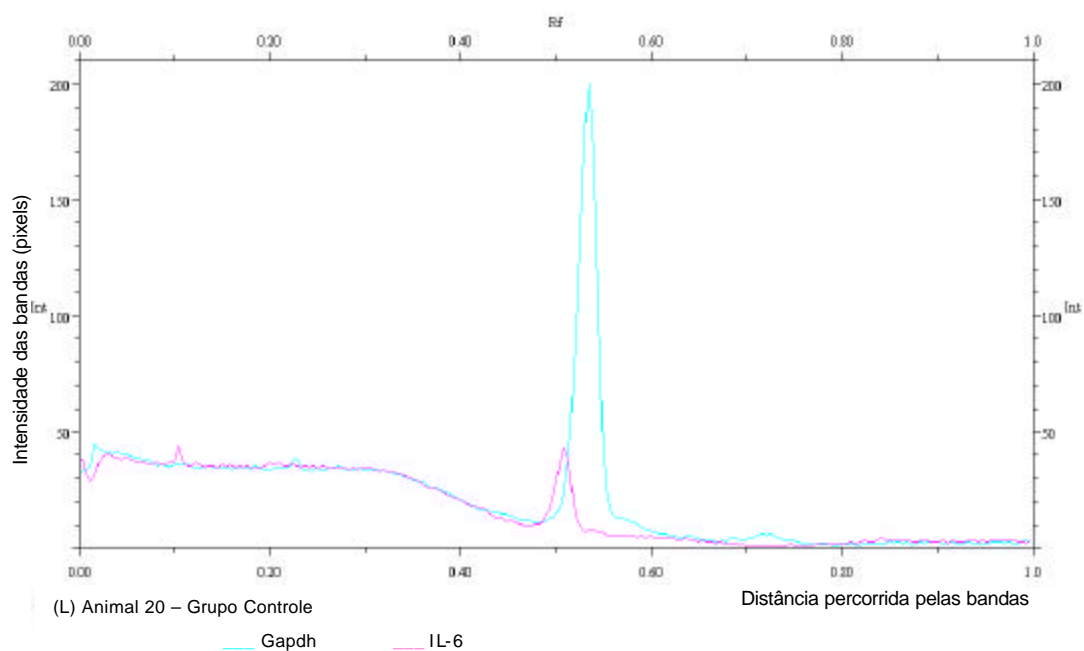


Figura 6A. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados no animal 20 (**L**), pertencente ao grupo controle.

APÊNDICE B

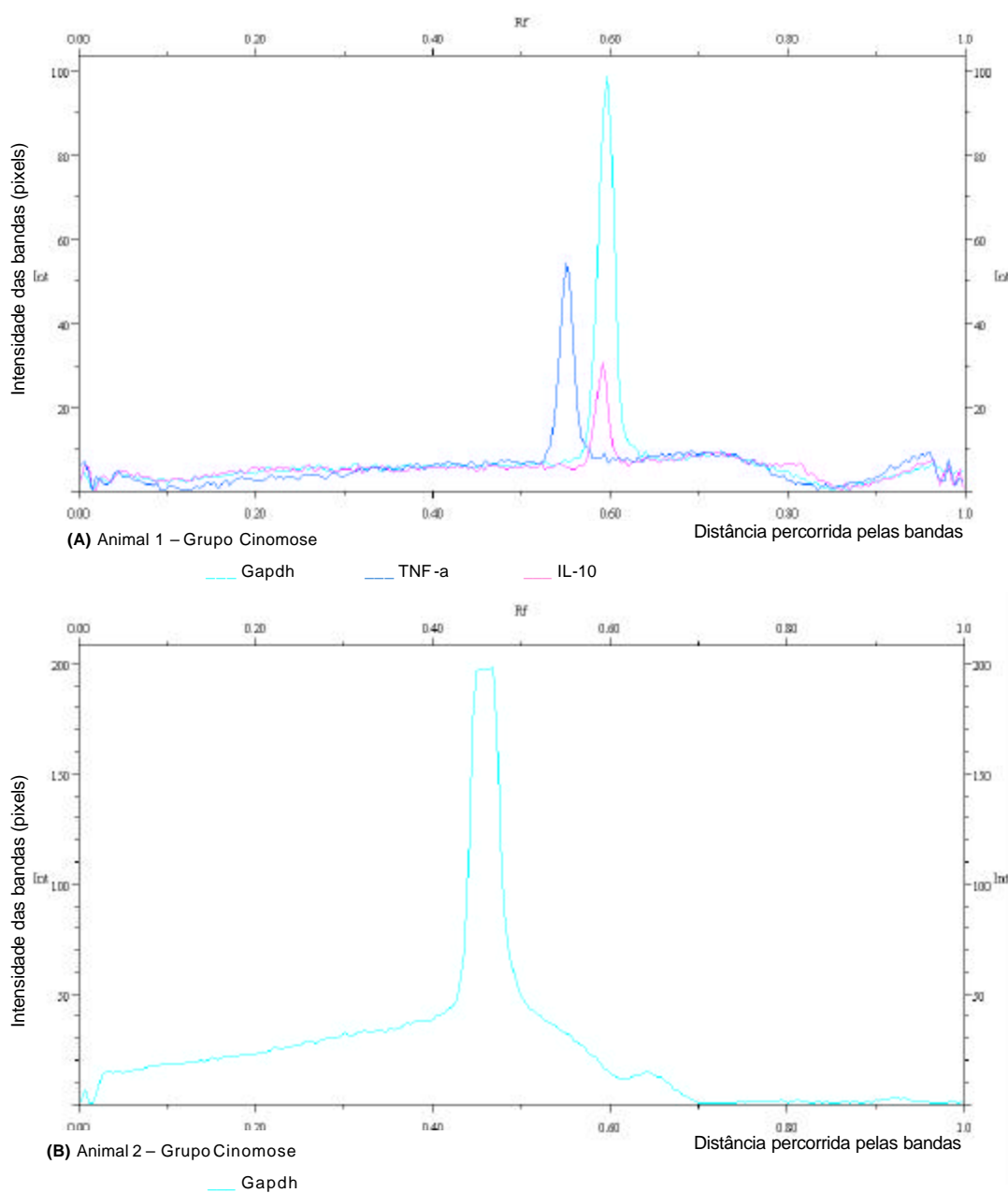


Figura 1B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrado no animal 1 **(A)** e perfil do gene constitutivo encontrado no animal 2 **(B)**, pertencentes ao grupo cinomose.

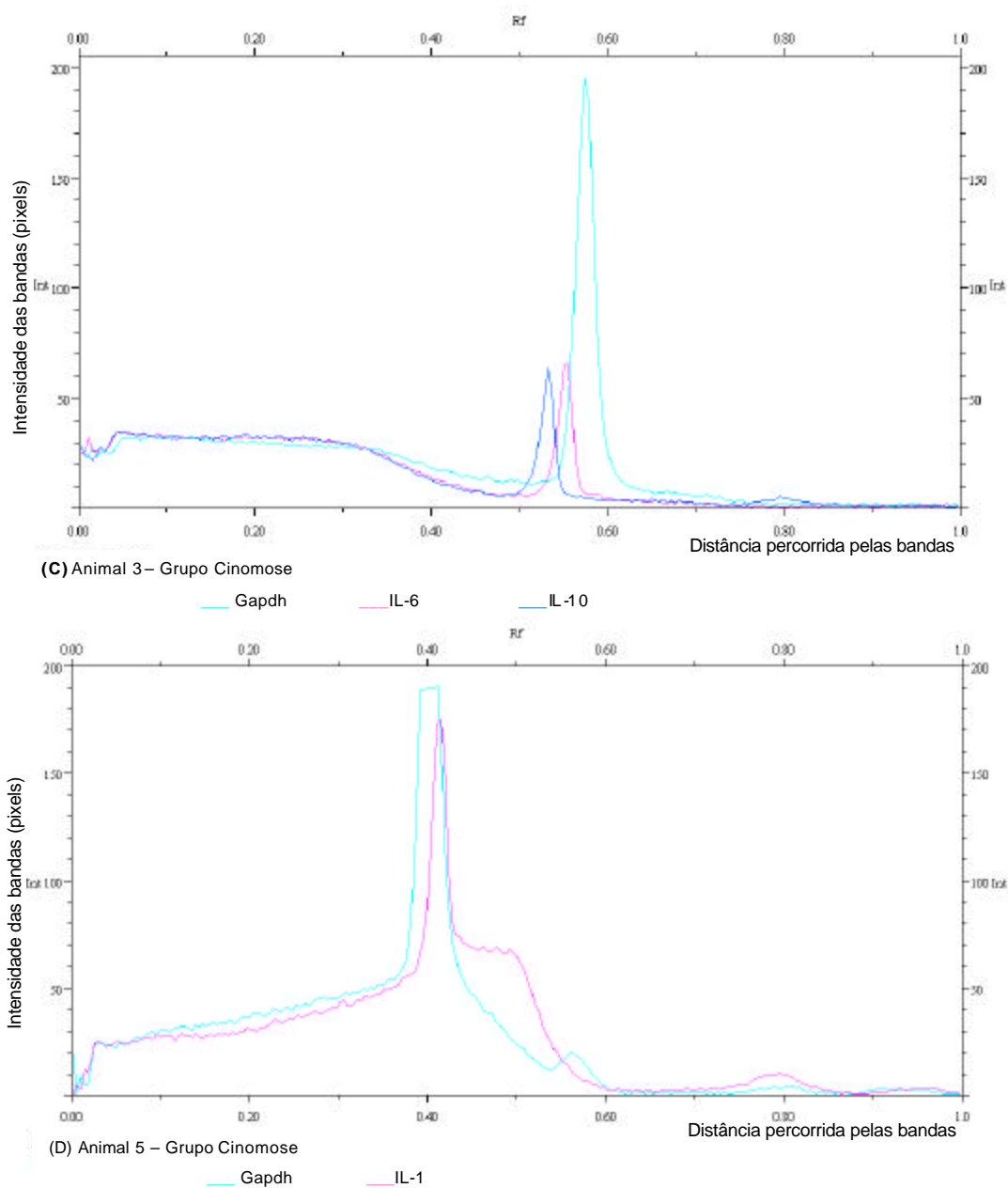


Figura 2B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrado nos animais 3 (C) e 5 (D), pertencentes ao grupo cinomose.

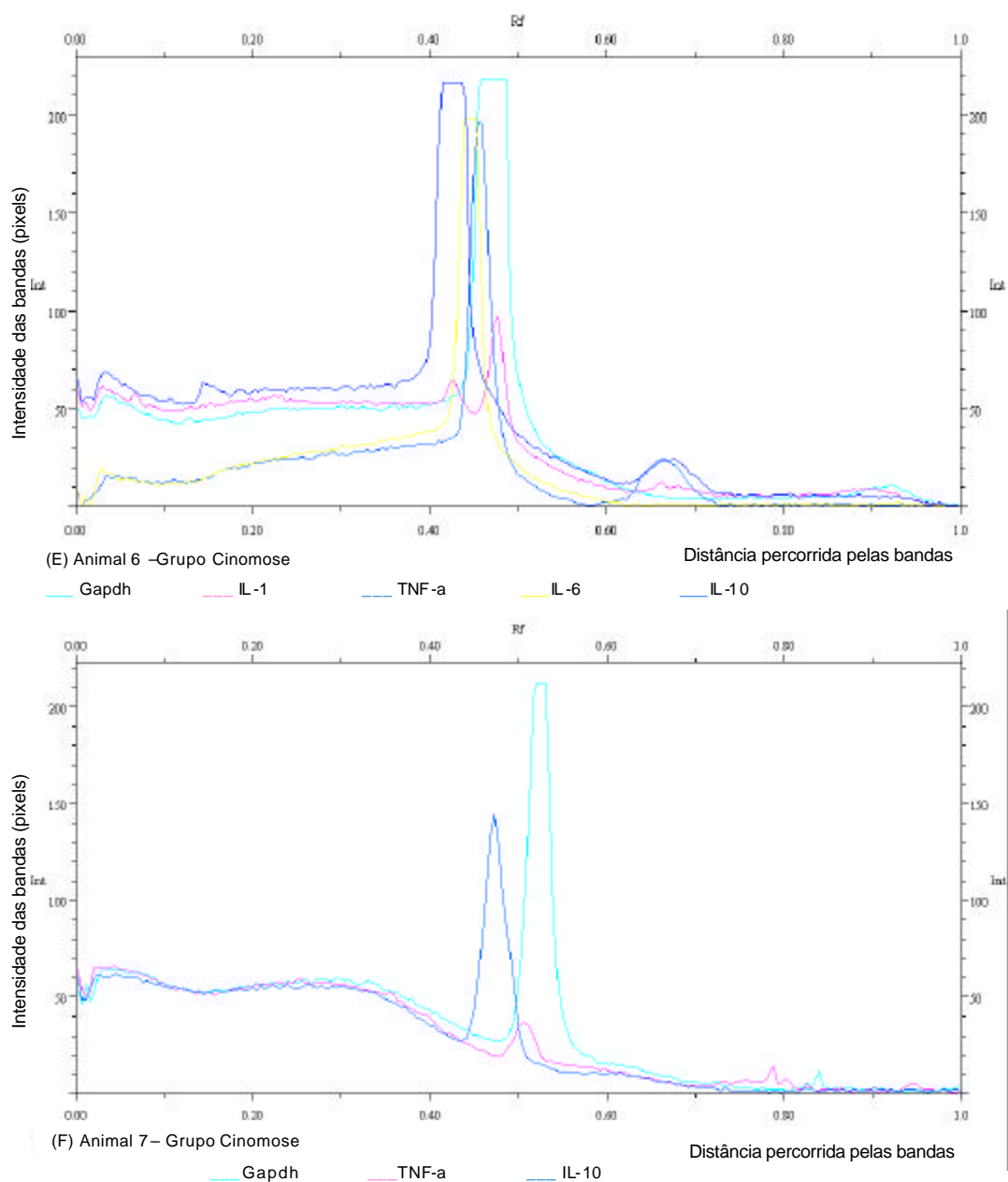


Figura 3B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo gapdh e de citocinas encontrados nos animais 6 (E) e 7 (F), pertencentes ao grupo cinomose.

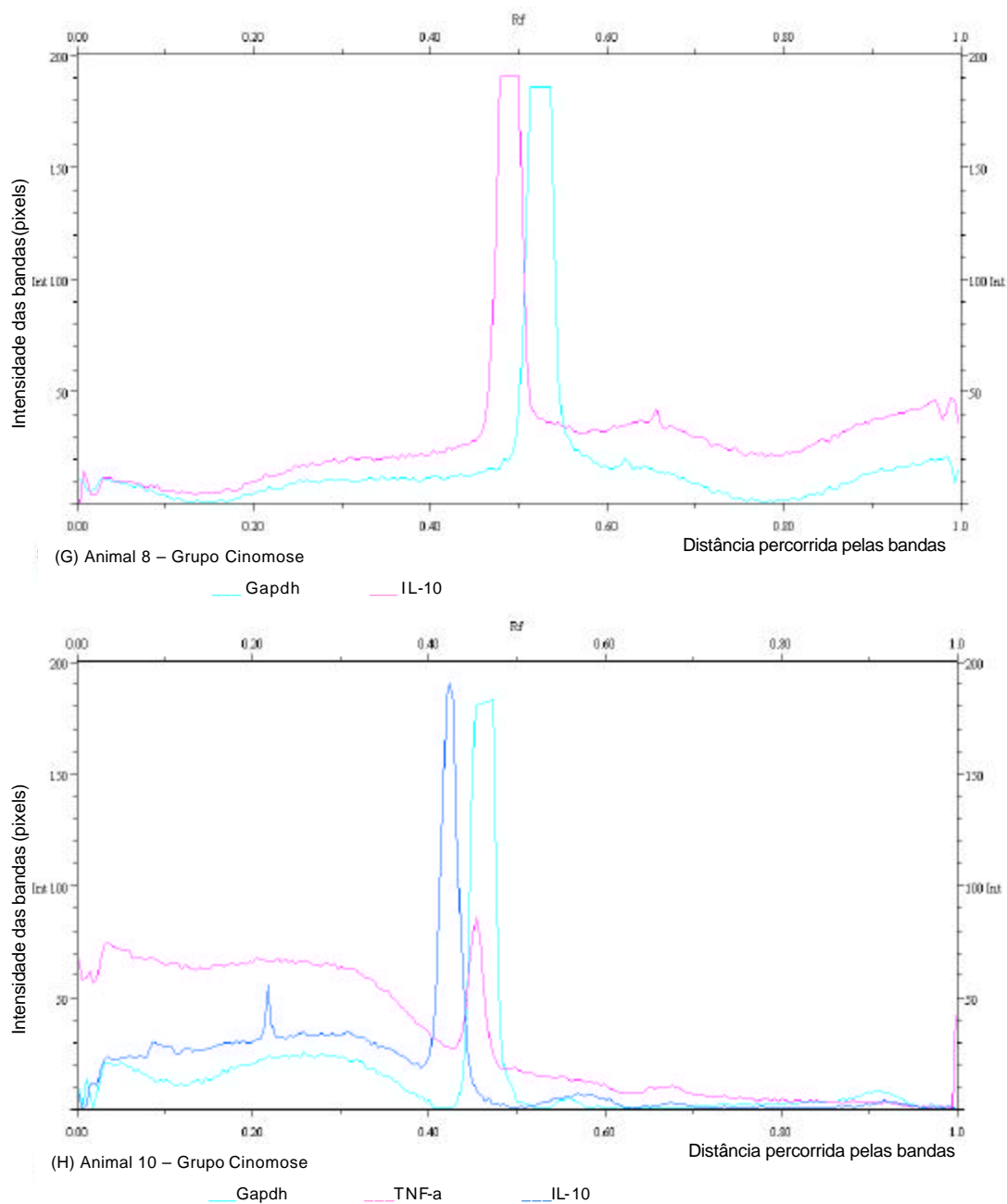


Figura 4B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontradas nos animais 8 (G) e 10 (H), pertencentes ao grupo cinomose.

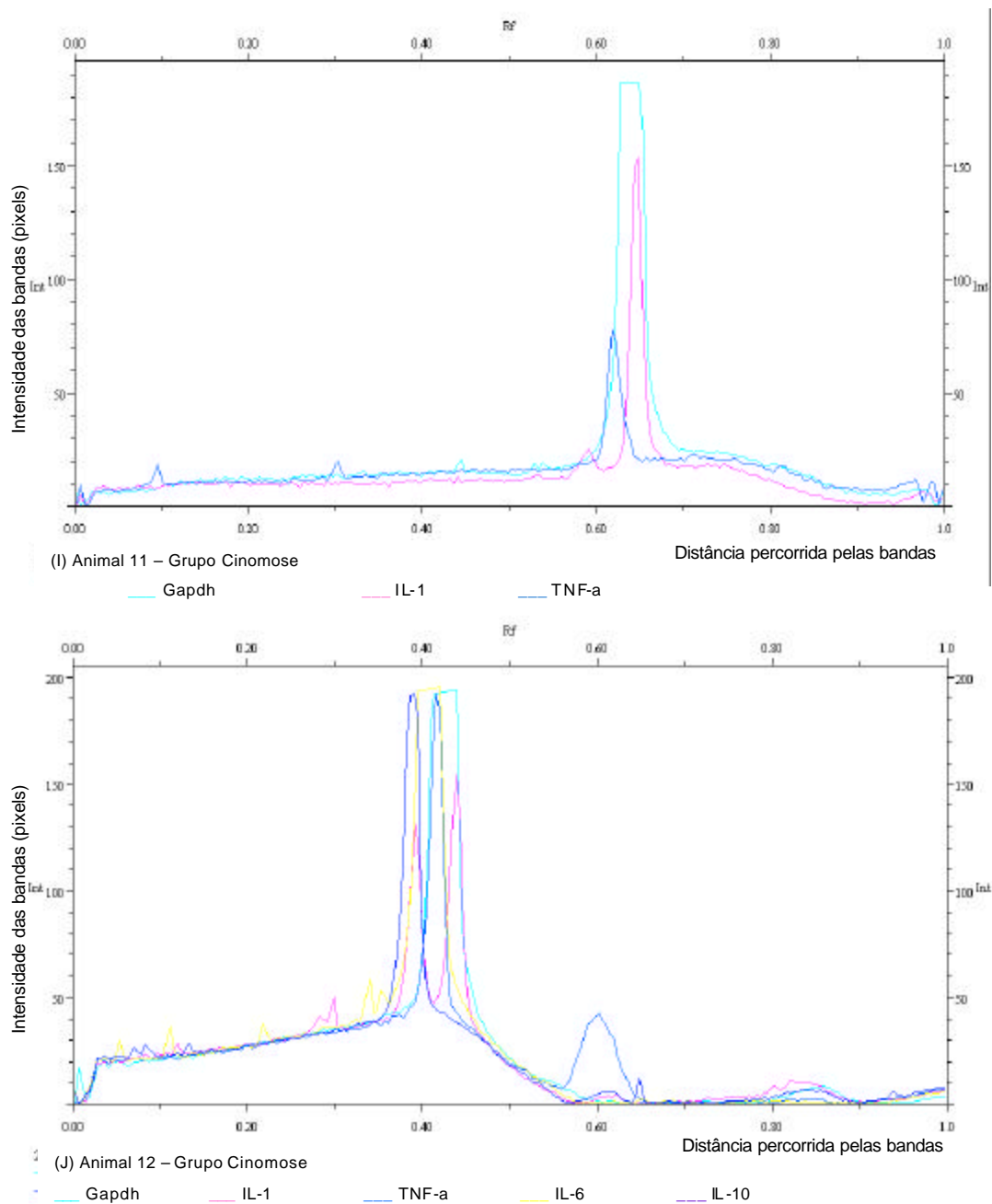


Figura 5B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 11 **(I)** e 12 **(J)**, pertencentes ao grupo cinomose.

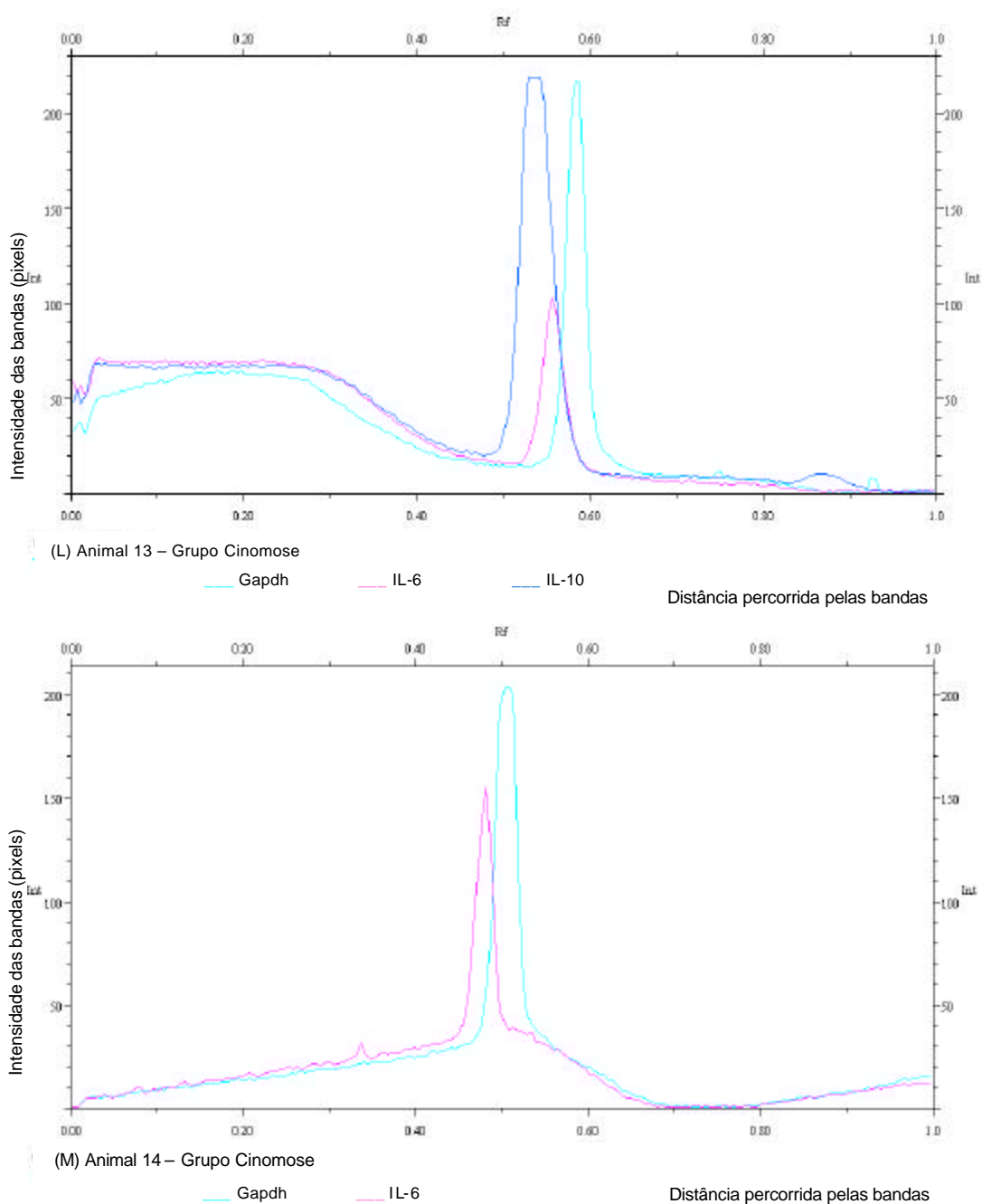


Figura 6B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 13 (**L**) e 14 (**M**), pertencentes ao grupo cinomose.

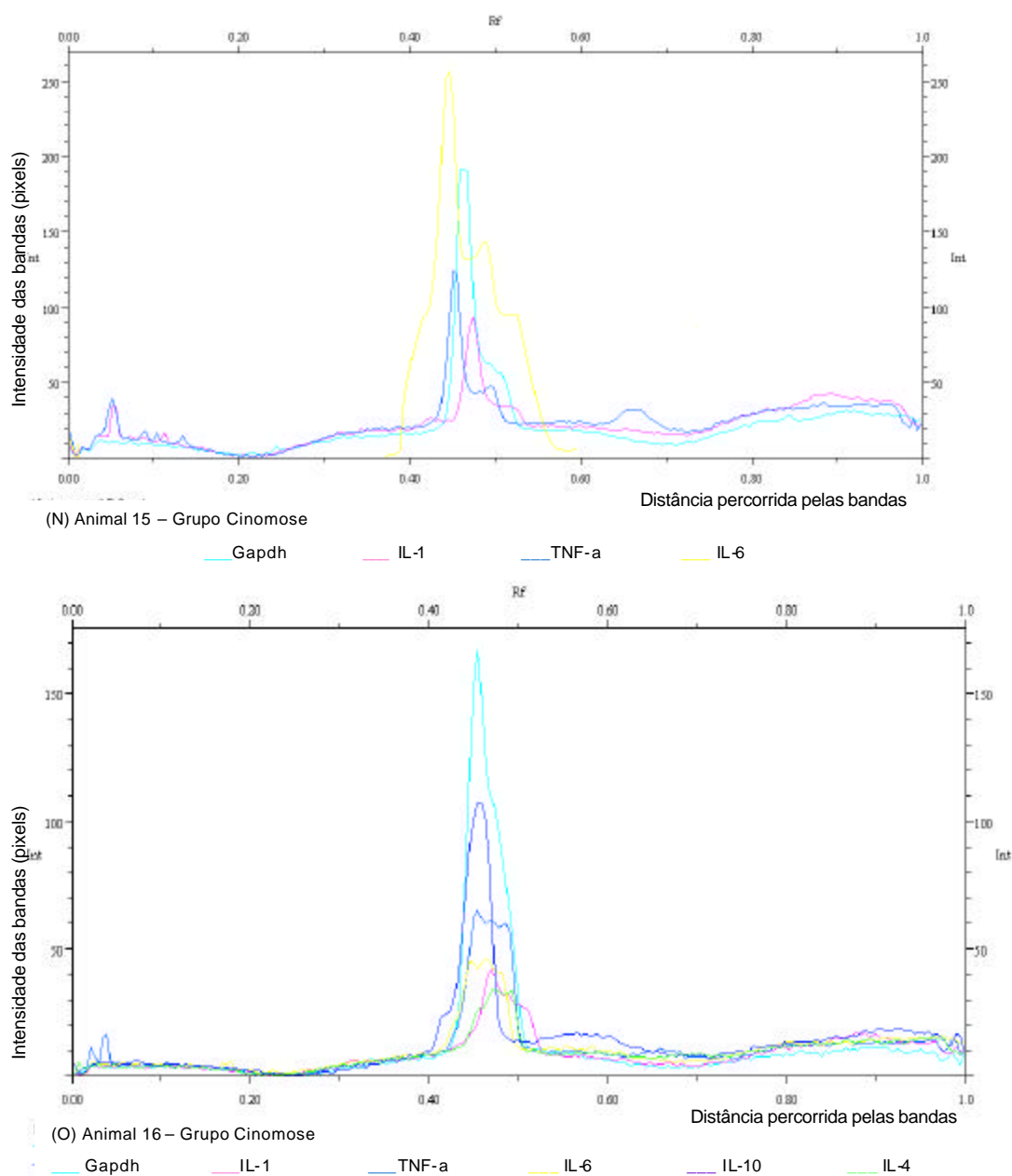


Figura 7B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 15 (N) e 16 (O), pertencentes ao grupo cinomose.

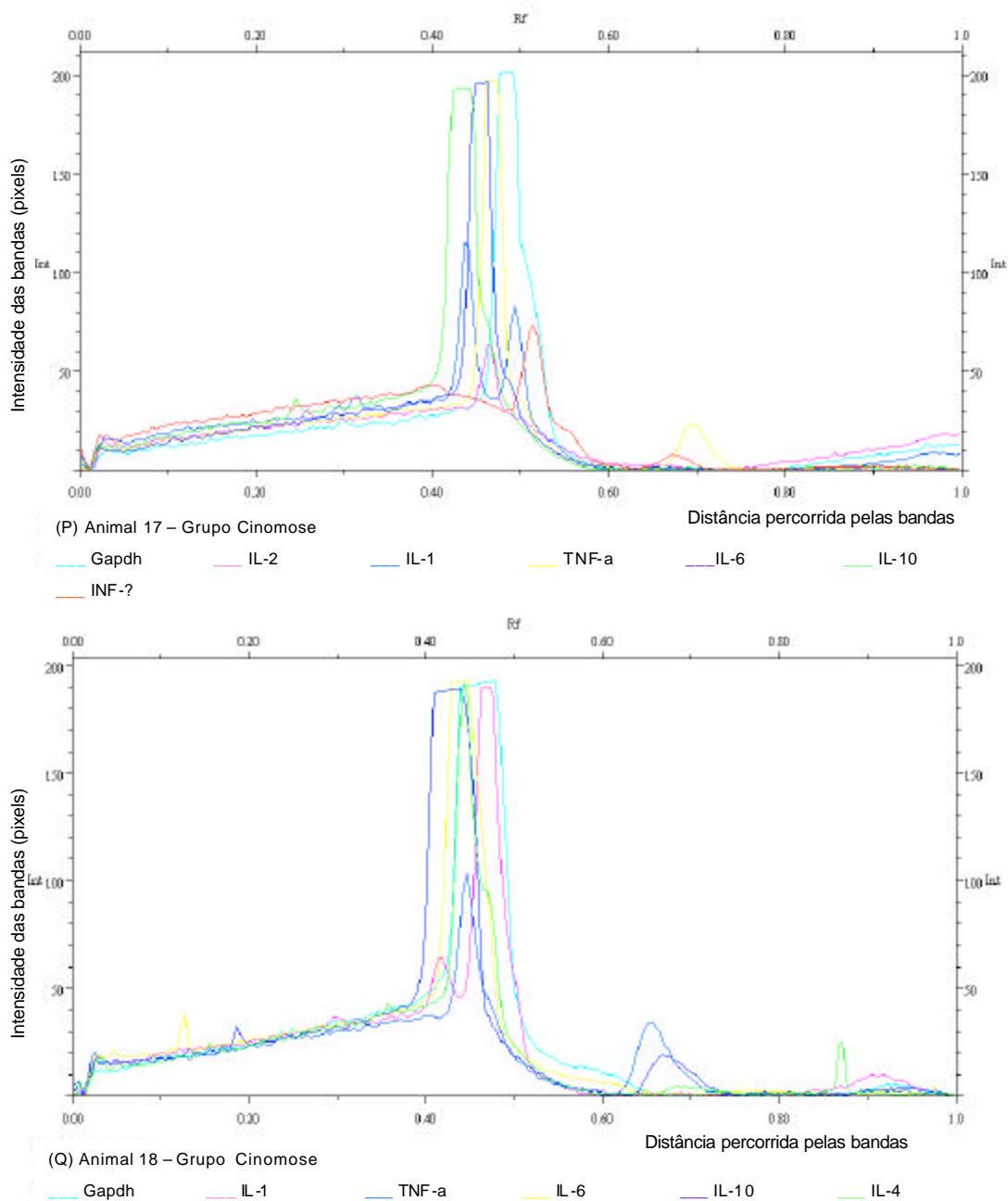


Figura 8B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixel) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 17 (P) e 18 (Q), pertencentes ao grupo cinomose.

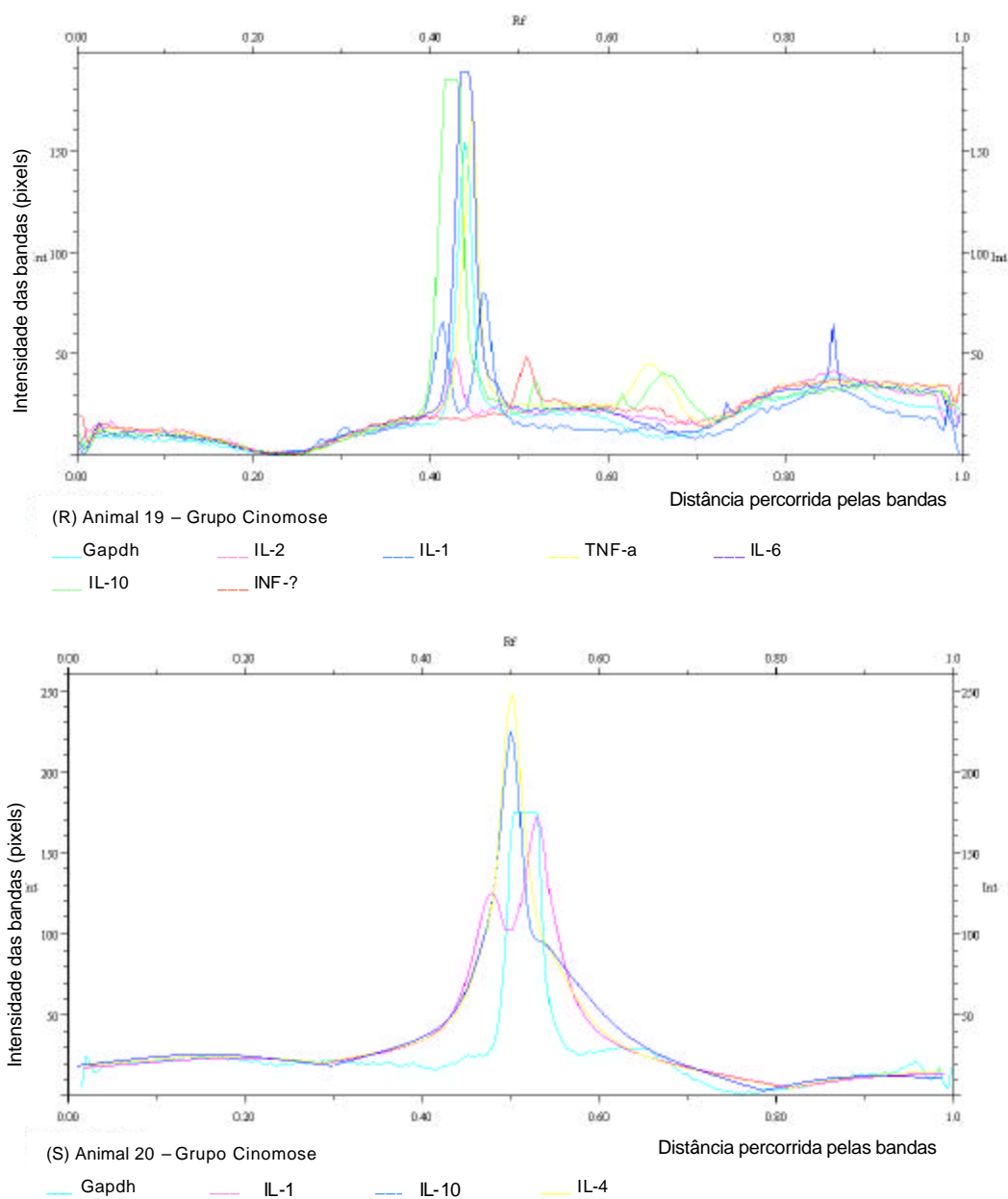


Figura 9B. Gráficos obtidos através do programa de análise Quantity One® 1D referentes aos valores dos picos de intensidade das bandas obtidas (pixels) (Int) e valores da distância percorrida pelas bandas (Rf) no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Perfis do gene constitutivo Gapdh e de citocinas encontrados nos animais 19 (R) e 20 (S), pertencentes ao grupo cinomose.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)