VALÉRIE LE DÜ DA SILVA

**Alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose
canina de ocorrência natural e experimental: avaliação
anatomopatológica e imunoistoquímica**

SÃO PAULO

2006

VALÉRIE LE DÜ DA SILVA

Alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose canina de ocorrência natural e experimental: avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Guerra

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1682
FMVZ

Silva, Valérie Le Dû da

Alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose canina de ocorrência natural e experimental: avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica / Valérie Le Dû da Silva. -- São Paulo: V. L. D. da Silva, 2006.

147 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Guerra.

1. Cães. 2. Uveíte. 3. Imunoistoquímica. 4. Imunofenotipagem.
5. Ehrlichia. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Valérie Le Dü da

Título: Alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose canina de ocorrência natural e experimental: avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICO:

*Ao meu filho Felipe Le Du da Silva Mazetto, pela alegria de seu
nascimento, símbolo de vida e luz*

*Aos meus pais Fernando Antonio Brito da Silva e Annie Le Du da
Silva (in memoria), pelo o apoio e exemplo fornecido durante toda
minha vida, possibilitando meu desenvolvimento profissional,
intelectual e pessoal.*

Agradecimentos

Aos cães que participaram deste projeto, contribuindo na elucidação da patogenia da uveíte na erliquiose canina, dando seguimento ao avanço da pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Guerra, pela prezadíssima amizade, dedicação e confiança.

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, docente da Faculdade de Veterinária e Ciências Agrárias-UNESP, onde elaborei a fase experimental, de colheita de material e elaboração das reações de imunoistoquímica, tornando possível a elaboração de meu trabalho.

À Profa. Dra. Mirela Tinucci-Costa pelas trocas de informações, amizade e por tornar possível minha permanência no hospital veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP-Jaboticabal.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana por autorizar a realização do meu trabalho junto ao laboratório de patologia clínica, do hospital veterinário "Governador Laudo Natel" e pelas informações cedidas.

Ao Prof. Dr. José Luiz Laus, mestre e doutor em oftalmologia veterinária, por permitir a realização de minhas atividades de pesquisa, no setor cirúrgico, do hospital veterinário "Governador Laudo Natel".

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro que possibilitou a efetivação desse trabalho.

Ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade do Estado de São Paulo (FMVZ-USP) que possibilitou o desenvolvimento de meus estudos e obter o título de doutor.

À equipe do laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Agrária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal pela paciência e dedicação.

À Maria Inês Yamazak de Campos responsável pelo laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Agrária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, por executar os cortes e preparo das lâminas para execução das reações de imunoistoquímica.

À equipe dos laboratórios de Imunoparasitologia e Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Câmpus Jaboticabal pela grande contribuição para a realização desse projeto.

Ao Eugenio de Campos Filho, responsável pelo laboratório clínico veterinário do hospital do hospital veterinário "Governador Laudo Natel", local onde obtive muitos conhecimentos.

Aos pós-graduandos, residentes, estagiários e funcionários do hospital veterinário "Governador Laudo Natel".

À equipe do laboratório de Histologia do Departamento de Patologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo- FMVZ, USP.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo auxílio fornecido nos momentos necessários.

À Elza Maria R. B. Faquim, bibliotecária supervisora técnica de serviços, pelas últimas correções e dicas para formatação do trabalho conforme as diretrizes para apresentação de tese na FMVZ-USP.

À secretária Sílvia Bracaler do departamento de Patologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo- FMVZ, USP, pelas informações cedidas.

À colega Arianne P. Oriá pela troca de informações e conhecimentos na área de oftalmologia veterinária.

À Tereza Cristina da Silva pelo auxílio e contribuição das análises estatísticas.

Ao pós-graduando Leonardo Pinto Brandão pela confecção das lâminas de imunofluorescência para detecção de títulos para Babesia sp.

Aos colegas pós-graduandos e funcionários do departamento de patologia da FCAV-UNESP, Toti, Ana Silvia, Gisele, Andréia, Andreinha, Patrícia, Trícia, Cristiane, Jesus, Thiago pela agradável convivência.

À Ana Carolina pela árdua luta na elaboração das reações de imunoistoquímicas de ambos os trabalhos.

SILVA, V. L. D. da **Alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose canina de ocorrência natural e experimental: avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica** [Some of the immunopathogenic aspects of the uveitis in natural and experimental occurrence of canine ehrlichiosis: anatomopathological and immunohistochemical analyses]. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Para elucidar alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose canina, avaliaram-se, por meio da análise imunistoquímica, bulbos oculares de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis* (grupo 1- G1), naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (grupo 2-G2) e na co-infecção natural de *E. canis* e *Babesia sp.* (grupo 3). Parâmetros clínicos e hematológicos foram avaliados. Empregaram-se o dot-blot-Elisa e a reação de imunofluorescência indireta para *E. canis* e *Babesia sp.* respectivamente. Para a confirmação diagnóstica, utilizou-se a reação de cadeia de polimerase (PCR) para *E.canis*. A contagem imunofenotípica para os anticorpos CD3, CD4, CD8, Tal1B5 e MAC 387 não demonstrou diferença significativa nas diferentes regiões analisadas do bulbo ocular. Observou-se no G1, G2 e G3, em todas as regiões analisadas diferença significativa da contagem imunofenotípica de células CD8⁺ em relação às células CD4⁺. Evidenciou-se diferença significativa entre a contagem percentual de células IgG2⁺ e CD79α⁺ na região de corpo ciliar do G3 em relação ao G1. A região da íris do G3, em relação ao G2, demonstrou diferenças significativas para o anticorpo IgG1. Evidenciou-se nos três grupos, a existência de correlação linear entre as células CD3⁺ e CD8⁺ e entre as células IgG2⁺ e CD79α⁺ em diversas regiões do bulbo ocular. O infiltrado inflamatório mostrou-se mais intenso nas regiões de corpo ciliar e ângulo iridocorneal, moderado em limbo e íris e mínimo em coróide. A avaliação semiquantitativa por score da intensidade do infiltrado inflamatório mostrou-se mais intensa nos animais que apresentavam co-infecção, sugerindo uma resposta imune mais intensa nesses cães. Demonstrou-se que o infiltrado inflamatório era composto, predominantemente, por linfócitos T CD3⁺ e B CD79⁺α. A maior porcentagem de células T CD3⁺ era CD8⁺, caracterizando, portanto, uma resposta imune do tipo citotóxica. A presença de células B CD79⁺α fala a favor de produção local de anticorpos. Observaram-se células imunomarcadas por IgG2 e poucas células marcadas por IgG1, sugerindo uma polarização da resposta imune para o padrão Th1, sendo um possível mecanismo imune de lesão na uveíte. Observou-se alta expressão de moléculas de MHC-classe II, sugerindo uma resposta imune intensa nos tecidos oculares, contudo ineficiente devido a deficiência de células CD4⁺.

Palavras-chave: Cães. Uveíte. Imunoistoquímica. Imunofenotipagem. Ehrlichia

SILVA, V. L. D. da **Some of the immunopathogenic aspects of the uveitis in natural and experimental occurrence of canine ehrlichiosis: anatomopathological and immunohistochemical analyses** [Alguns aspectos da imunopatogenia da uveíte na erliquiose canina de ocorrência natural e experimental: avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica]. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The immunopathogenicity of uveitis in the canine ehrlichiosis was studied by conducting anatomy and immunohistochemical analyses in the ocular globes of dogs experimentally (Group 1) and naturally (Group 2) infected with *Ehrlichia canis*, and naturally coinfecting with *Ehrlichia canis* and *Babesia sp.* (Group 3). Clinical and hematological parameters were evaluated. Dot-blot Elisa and indirect immunofluorescent test (IFA) were used to analyze *E. canis* and *Babesia sp.*, respectively. PCR assay confirmed the diagnosis of the disease caused by *E. canis*. The immunophenotypic analysis with the antibodies CD3, CD4, CD8, Tal1B5 and MAC 387 revealed no significant differences between the various ocular regions analyzed. Significant differences were observed between the immunophenotypic analysis of CD8⁺ and CD4⁺ cells from all regions analyzed from G1, G2 and G3; between the percentile counts of IgG2⁺ and CD79α⁺ in the ciliary body of G3 dogs when compared to G1, and for the IgG1 antibody counts of the iris region from G3 when compared to G2. A linear correlation between CD3⁺ and CD8⁺ cells and between IgG2⁺ and CD79α⁺ cells from several regions of the ocular globe was found for all three groups. The cellular inflammatory infiltrate observed in the ocular tissue was severe in the regions of the ciliary bodies and iridocorneal angle, moderate in the limbus and iris, and only slightly present in the choroids. A semiquantitative analysis of the intensity of the inflammatory infiltrate of the ocular globes was more intense in G3, which suggested a greater response of the immune system in these animals. The inflammatory infiltrate was composed of mainly B CD79⁺α and T CD3⁺ lymphocytes, which had CD8⁺ at a high percentage, thus characterizing this as a cytotoxic immune response. Results indicated that B CD79⁺α cells favored the production of local antibodies. IgG2 and very few IgG1 immunolabeled cells were found. This result indicated a polarization of the immune response to the Th1 pattern, which could be the mechanism of the lesions in the uveitis. A large number of cells expressing the MHC-class II molecules were observed, suggesting an intense immune response in the ocular tissues, however ineffective due to the CD4⁺ cell's deficient.

Key-words: Dogs. Uveitis. Immunohistochemistry. Immunophenotypic. Ehrlichia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático ilustrando as estruturas do bulbo ocular; Fonte: Carneiro Filho, 1997.....	25
Figura 2 -	Contagem percentual de células mononucleares positivas para todas as imunomarcações realizadas nos constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do globo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> : * diferença significativa em relação à G1, $P < 0.05$; ° diferença significativa em relação à G1, $P < 0.01$, ° diferença significativa em relação à G2, $P < 0.05$	63
Figura 3 -	Contagem percentual de células mononucleares IgG2+ e CD79α+ constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1 e G2) e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> (G3) *Diferença significativa em relação ao G1 $P < 0,05$, •Diferença significativa em relação ao G1 $P < 0,01$	64
Figura 4 -	Contagem percentual de células mononucleares CD4+ e CD8+ constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1 e G2) e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> (G3) As diferenças entre as médias não foram estatisticamente significantes $P > 0,05$ * diferença significativa em relação a CD4 $P < 0,001$	64
Figura 5 -	Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões A, B, C e D do bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1 e G2) e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> (G3). As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados.....	65
Figura 6 -	Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões E, F, G e H do bulbo ocular de cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G2) e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> (G3).As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados.....	66
Figura 7 -	Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD79 e IgG2 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões A, B, C e D do bulbo ocular de cães experimentalmentenat infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1) e de cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> (G3) As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados.....	67

Figura 8 -	Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD79 e IgG2 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões E, F e G do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1) e de cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e/ou <i>Babesia sp.</i> (G2 e G3) As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados.....	68
Figura 9 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E.canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em ângulo iridocorneal, células do infiltrado mononuclear CD3+ (obj 20x- imunoperoxidase).....	69
Figura 10 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E.canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em limbo, células do infiltrado mononuclear CD3+(obj 40x- imunoperoxidase).....	69
Figura 11 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E.canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando infiltrado mononuclear CD3+ em coróide (obj 40x- imunoperoxidase).....	69
Figura 12 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E.canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em retina, células do infiltrado mononuclear CD3+(obj 20x- imunoperoxidase).....	69
Figura 13 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em ângulo iridocorneal, infiltrado mononuclear CD8 ⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)...	69
Figura 14 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em coróide, células do infiltrado mononuclear CD8 ⁺ (obj.40x-imunoperoxidase).....	69
Figura 15 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em íris, células do infiltrado mononuclear CD4 ⁺ (obj.40x-imunoperoxidase).....	70
Figura 16 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em corpo ciliar, células do infiltrado mononuclear CD4 ⁺ (obj.40x- imunoperoxidase).....	70
Figura 17 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E.canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando expressão de moléculas MHCII em células infiltrado mononuclear em retina (obj 40x- imunoperoxidase).....	70

Figura 18 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em íris, células do infiltrado mononuclear CD79 α + (obj.40x-imunoperoxidase)...	70
Figura 19 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E.canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em ângulo iridocorneal, células do infiltrado mononuclear IgG2+ (obj 40x-imunoperoxidase).....	70
Figura 20 -	Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em corpo ciliar, células do infiltrado mononuclear IgG1 ⁺ , (obj.40x-imunoperoxidase).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características e descrição do emprego dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica, para a imunofenotipagem do infiltrado mononuclear, em bulbo ocular de cães controle, experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> São Paulo, 2006.....	53
Tabela 2 -	Média e desvio padrão do trombograma dos animais infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1) e do grupo controle (GC) obtidos antes da inoculação experimental e semanalmente, durante cinco semanas. São Paulo, 2006.....	56
Tabela 3 -	Média e desvio padrão do eritrograma dos animais infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1) e dos controles (GC) obtidos antes da inoculação experimental e semanalmente, durante cinco semanas São Paulo, 2006.....	57
Tabela 4 -	Média da contagem relativa de reticulócitos, do grupo experimentalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1), obtidas antes da inoculação e semanalmente, durante cinco semanas. São Paulo, 2006.....	57
Tabela 5 -	Média e desvio padrão do eritrograma dos cães naturalmente infectado por <i>Ehrlichia canis</i> e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> São Paulo, 2006.....	58
Tabela 6	Média e desvio padrão trombograma e da contagem relativa de reticulócitos dos cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> São Paulo, 2006.....	58
Tabela 7 -	Intensidade do infiltrado inflamatório: mínimo (+), moderado (++) e intenso (+++), dos globos oculares de cães experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> (G1 e G2) e de cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> (G3), avaliados pela coloração de hematoxilina e eosina. São Paulo, 2006.....	61
Tabela 8 -	Média e desvio padrão da contagem percentual imunofenotípica do infiltrado inflamatório mononuclear, em bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia sp.</i> São Paulo, 2006.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	ERLIQUIOSE CANINA.....	19
2.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO BULBO OCULAR.....	24
2.3	UVEÍTE NA ERLIQUIOSE CANINA.....	27
2.4	CONSIDERAÇÕES GERAIS DE IMUNOLOGIA.....	28
2.5	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA ERLIQUIOSE CANINA.....	30
2.6	BABESIOSE-ASPECTOS GERAIS.....	33
2.7	BABESIOSE CANINA.....	34
3	OBJETIVO	39
3.1	GERAL.....	39
3.2	ESPECÍFICOS.....	39
4	MATERIAL E MÉTODO	40
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.....	40
4.2	ANIMAIS NATURALMENTE INFECTADOS.....	41
4.3	ERITROGRAMA, CONTAGEM DE PLAQUETAS E RETICULÓCITOS....	41
4.4	SOROLOGIA.....	42
4.4.1	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia sp</i>	42
4.4.2.	Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para <i>Leptospira</i> sorovares <i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>	43
4.4.3	Prova de ELISA indireto para o Diagnóstico de <i>Toxoplasma gondii</i>	43
4.5	REAÇÃO DE CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	44
4.5.1	Extração de DNA de Sangue Total	44
4.5.2	Seleção dos Primers	45
4.5.3	Amplificação de DNA de <i>Ehrlichia spp</i> e de <i>E. canis</i>	45
4.5.4	Eletroforese de DNA em Gel de Agarose	46
4.6	MÉTODO DE COLHEITA DOS BULBOS OCULARES PARA O ESTUDO HISTOLÓGICO PELA COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (H/E) E PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA	46

4.7	PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DOS CORTES DE TECIDO OCULAR CORADOS PELA HEMATOXILINA EOSINA (H/E).....	47
4.8	TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	47
4.8.1	Padronização da Técnica de Fixação do Material na Lâmina Microscópica.....	47
4.8.2	Anticorpos.....	48
4.8.3	Padronização da técnica de imunoistoquímica.....	50
4.8.4	Técnica de Imunoistoquímica Empregada para os Anticorpos: IgG1, IgG2, CD3, Tal 1B5, Mac 387 e CD68.....	50
4.8.5	Técnica de Imunoistoquímica Empregada para os Anticorpos: CD79α, CD4, CD8 e CD68.....	52
4.9	CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO.....	53
4.10	MORFOMETRIA.....	54
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS (HEMOGRAMA, SOROLOGIA E PCR) DOS ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE E NATURALMENTE INFECTADOS (G1, G2 E G3).....	55
5.2	AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DOS CORTES DE TECIDO OCULAR CORADOS PELA HEMATOXILINA E EOSINA (H/E).....	58
5.3	AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO OCULAR.....	59
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÃO.....	92
8	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXO A.....	120
	APÊNDICES	121

1 INTRODUÇÃO

A principal finalidade desse estudo é elucidar alguns aspectos da patogenia da erliquiose canina no que diz respeito ao comportamento da resposta imunológica, através da caracterização imunoistoquímica das lesões anatomopatológicas e imunoistoquímicas de bulbos oculares de cães naturalmente e experimentalmente infectados. Durante a evolução da doença ocorre comprometimento ocular mas pouco se sabe sobre as alterações anatomo-patológicas e da patogênese da uveíte na erliquiose canina.

Cães provenientes da casuística do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" e das aulas de técnica cirúrgica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal foram avaliados. Nove animais fizeram parte do estudo sendo quatro com erliquiose espontânea e cinco com co-infecção de *E.canis* e *Babesia.sp.* de ocorrência natural. Todos apresentaram quadro de uveíte sendo, portanto, utilizados no estudo. A confirmação do diagnóstico foi efetuada pelo quadro clínico hematológico, reação em cadeia de polimerase (PCR) e sorologia, utilizando-se o teste de ensaio imunoenzimático dot-blot-Elisa (Immunocomb®-Biogal) para detecção de anticorpos anti-*E.canis* e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Babesia.sp.*

Para minimizar o sofrimento de outros animais, os bulbos oculares dos cães experimentalmente infectados, que fizeram parte desse trabalho, foram colhidos durante a elaboração do mestrado em que foi realizada a avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológico e histopatológico da medula óssea, na erliquiose canina aguda. Sete animais fizeram parte do estudo, sendo quatro infectados e três controles. Todos os cães inoculados desenvolveram quadro de uveíte (SILVA, 2001; ORIA, 2001).

Nos bulbos oculares foram realizados cortes histológicos. Foi realizada a coloração de hematoxilina eosina e imunoistoquímica para a identificação de linfócitos T(CD3, CD4, CD8), linfócitos B (CD79 α , IgG1 e IgG2), macrófagos (MAC387 e CD68) e identificação de células inflamatórias que expressam complexo de histocompatibilidade classe II (MHC-classe II), (TAL. 1B5).

O setor de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias do Estado de São Paulo (UNESP), Campus de Jaboticabal, possui um grupo coordenado pela Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado a qual iniciou seus estudos sobre a erliquiose canina em 1994 quando isolou e identificou o microorganismo de um caso espontâneo da doença. Posteriormente, em 1997, Castro avaliou as alterações clínicas

imunológicas, hematológicas e anatomopatológicas durante a fase aguda da doença em cães experimentalmente infectados por *E.canis*, utilizando-se da cepa anteriormente isolada. Em 2001, Oriá fez a correlação dos achados sorológicos do "dot- blot Elisa" e RIFI com os quadros de uveítes observados em cães naturalmente e experimentalmente infectados. No mesmo ano, como dissertação de mestrado, realizamos o estudo avaliando as alterações hematológicas e os aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda experimental. Recentemente Machado concluiu dois projetos. No primeiro, com apoio de Castro (2004), realizou o estudo imunoistoquímico das lesões observadas na infecção aguda experimental em cães, por *Ehrlichia canis* e, no segundo, juntamente com Nakaghi (2004), avaliou comparativamente a detecção direta de *Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e exames sorológicos ("dot-blot Elisa" e RIFI).

Apesar de existirem inúmeras pesquisas em torno da patogenia da erliquiose canina, ainda é uma doença que necessita de estudos verticalizados. Machado, realizou a avaliação imunoistoquímica das lesões provocadas na fase aguda da erliquiose canina em animais experimentalmente infectados. O presente estudo avaliará, pela mesma técnica, as lesões provocadas em bulbos oculares nos animais com doença espontânea e experimentalmente infectados. Com esse projeto, poderemos dar continuidade às investigações em torno da resposta humoral e celular e obter um entendimento mais claro da imunopatogenia e, conseqüentemente, fornecer subsídios para uma abordagem terapêutica mais adequada e eficaz para essa doença de mau prognóstico e até mesmo fatal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ERLIQUIOSE CANINA

Ehrlichia canis (*Anaplasmatacea*, *Rickettsiales*), o agente etiológico da erliquiose monocítica canina, é uma bactéria intracelular obrigatória de monócitos e macrófagos (COHN, 2003; DUMLER et al., 2001; HARRUS et al., 2003). O agente da erliquiose canina foi descrito pela primeira vez na Argélia, em 1935. (DONATIEN; LESTOQUARD, 1937; HARRUS et al., 1996a). Em 1968, as pesquisas foram se acentuando quando uma doença fatal acometeu os cães usados durante a guerra do Vietnam (RISTIC, 1994). Posteriormente, foi denominada pancitopenia tropical canina (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). No Brasil, foi verificada pela primeira vez em 1973 em Belo Horizonte (ANDEREG; PASSOS, 1999). Em 1978, Maregati relatou um surto, na cidade de Jaboticabal, São Paulo (KAVINSKI et al., 1998).

O termo “erliquiose” é geralmente atribuído às infecções por *E. canis*, apesar de existirem várias espécies de *Ehrlichia* acometendo os cães (HRIBERNIK, 1992). Somente a erliquiose causada pela *E. canis* tem importância clínica do ponto de vista epidemiológico, nos cães e nos caninos selvagens (DAVOUST, 1993).

A *E. canis* é transmitida principalmente pelo carrapato vermelho do cão, o *Rhipicephalus sanguineus* (TROY; FORRESTER, 1990). Foi também relatado que o *Amblyomma americanum* e o *Otobius megnini* poderiam ser vetores potenciais (ANDEREG; PASSOS, 1999).

A distribuição da *E. canis* é mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Todas as raças de cães e idades são acometidas. Porém, os animais novos são mais sensíveis (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b) e a raça Pastor Alemão geralmente apresenta distúrbio hemorrágico grave (SEARCY, 1998). A *E. canis* e *Babesia canis* podem ser transmitidas concomitantemente, já que o vetor destes dois microorganismos é o *Rhipicephalus sanguineus* (COHN, 2003; TROY; FORRESTER, 1990). São conhecidas três cepas de *E. canis* : cepa da Flórida, cepa de Oklahoma e cepa Israelense (ANDEREG; PASSOS, 1999). A *E. canis* e as outras espécies de *Ehrlichia* são bem pequenas (0,2-0,4 μm de diâmetro) (RISTIC, 1994). Situam-se no interior dos leucócitos formando inclusões intracitoplasmáticas, denominadas mórulas (COHN, 2003; STORZ, 1990) e que podem ser

evidenciadas, em estudo experimental, a partir do décimo segundo dia pós inoculação (STORZ, 1990). As inclusões são observadas, principalmente na fase aguda, em pequeno número e em período de tempo curto (ANDEREG; PASSOS, 1999). Também há possibilidade de evidenciá-las em medula óssea (BEAUFILS, 2000; SILVA, 2001). Troy e Forrester (1990) relataram encontrá-las também em pulmão, linfonodo e baço.

A infecção ocorre quando o carrapato infectado faz seu repasto sanguíneo. O período de incubação varia entre 8 a 20 dias (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992; TROY; FORRESTER, 1990). As formas da doença são classificadas em aguda, subclínica e crônica (COHN, 2003). A fase aguda da enfermidade dura de duas a quatro semanas (ANDEREG; PASSOS, 1999). Há replicação dos microorganismos no interior das células mononucleares seguida de disseminação pelo sistema mononuclear fagocitário (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b; SEARCY, 1998). Ocorre hiperplasia linforeticular no fígado, baço e linfonodo, com aumento de volume destes órgãos (TROY; FORRESTER, 1990). As células infectadas aderem ao endotélio dos vasos sanguíneos, causando vasculite, ou migram para o tecido subendotelial provocando uma reação inflamatória (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b). Ocorre trombocitopenia como principal alteração hematológica relevante para o diagnóstico da doença (HARRUS et al., 1996b; KUEHN; GAUNT, 1985). A patogenia da trombocitopenia ainda não está muito clara. Sugere-se que ocorra devido a mecanismo imunológico, pela diminuição da vida média das plaquetas, pela inflamação endotelial, resultando em consumo das plaquetas, seqüestro de plaquetas pelo baço e alterações dos mecanismos da coagulação sanguínea (COHN, 2003; HARRUS et al., 1996a; TROY; FORRESTER, 1990). Tanto a vasculite como as lesões endoteliais podem induzir a coagulação intravascular disseminada (CID). inflamatória CORRÊA, W. M. e CORRÊA, C. N. M. (1992b) e Harrus et al. (1996a) relataram a presença de anticorpos antiplaquetas. Esses poderiam inibir a agregação plaquetária com conseqüente aumento do tempo de coagulação. O número de leucócitos varia, podendo até aumentar nas primeiras 2 ou 3 semanas. Ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), de fosfatase alcalina, de proteínas C-reativas (CRP) e de alfa-1-ácido-glicoproteínas (AAG). Devido à hemólise intensa, tem-se um aumento da bilirrubina total (ANDEREG; PASSOS, 1999). Aproximadamente 6 a 9 semanas após a infecção inicial, surge a fase subclínica, perdurando de 1 a 4 meses ou 4 a 5 anos. Esta fase está associada à persistência do microorganismo no hospedeiro e ao aumento da resposta imunológica (RISTIC, 1994; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Os sinais clínicos geralmente estão ausentes e os achados hematológicos são similares aos da fase aguda ou seja, respostas leucocitárias variáveis como

leucopenia e até linfocitose e monocitose, trombocitopenia e anemia não regenerativa (TROY; FORRESTER, 1990). Durante esta fase, os animais imunocompetentes normalmente eliminam a *E. canis* podendo se curar, ou passam para a fase crônica da enfermidade (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Fatores como doenças concomitantes, virulência da cepa infectante, suscetibilidade racial e idade do animal determinam o grau de severidade da doença (TROY; FORRESTER, 1990). Na fase crônica, em vários órgãos, tem-se infiltração linforeticular e plasmocitária. Há, também, hipergamaglobulinemia indicando que a resposta do hospedeiro para a eliminação do parasita foi ineficiente inflamatória (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b). Tendências hemorrágicas, linfadenopatia, esplenomegalia, alterações oculares e infecções secundárias são características da fase crônica, poliartropatia e sinais neurológicos também são descritos (GREENE, 1995). Segundo Harrus, Hylton e Waner (1997), os sinais neurológicos podem ser atribuídos à hemorragia, vasculite e infiltração plasmocitária. A fase crônica é caracterizada, principalmente, pela hipoplasia da medula óssea, resultando em anemia aplástica e pancitopenia, assim como aumento da destruição de plaquetas. Observa-se também monocitose, linfocitose e leucopenia (ANDEREG; PASSOS, 1999; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Os componentes envolvidos com a pancitopenia não estão muito claros. Várias teorias são propostas. A depressão da medula óssea poderia ocorrer devido a mecanismos autoimunes associados à hiperglobulinemia, ou então devido à exaustão da mesma por tentar compensar a depleção plaquetária. Mesmo após o tratamento e recuperação do animal, a depressão medular pode continuar por mais ou menos 120 dias inflamatória (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b).

Os sinais clínicos durante a fase aguda da erliquiose são caracterizados por febre, anorexia, dispnéia, descarga óculo-nasal purulenta, perda de peso e linfadenopatia. Acredita-se que a febre seja decorrente da liberação de pirógenos e substâncias antigênicas pelo parasito ou/e devido à possibilidade de liberação aumentada de um pirógeno endógeno, a interleucina 1 (IL-1), produzida por células apresentadoras de antígenos e linfócitos B (CASTRO, 1997). Para Harrus et al. (1998a), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) também poderia estar envolvido com a indução da febre. Os episódios hemorrágicos não são frequentes, apesar da ocorrência de alterações hematológicas (TIMONEY et al., 1988). Existem casos em que a manifestação clínica da babesiose pode estar relacionada com infecções agudas da erliquiose (ANDEREG; PASSOS, 1999). Na erliquiose, geralmente, os cães acometidos pela moléstia aguda recuperam-se sem tratamento ou podem permanecer infectados passando para a fase subclínica (TROY; FORRESTER,

1990). Os sinais clínicos da fase subclínica geralmente são brandos mas em alguns casos podem ocorrer complicações como perda de peso, depressão, mucosas pálidas, edema de membros, infecções secundárias, epistaxe, melena, hematúria, hematemese, petéquias e equimoses, lesões oculares, alterações neurológicas e glomerulonefrite (ANDEREG; PASSOS, 1999). Alguns cães podem desenvolver poliartrites. Estes apresentam dificuldade de locomoção e dores articulares (BELLAH; SHULL; SELCER 1986). Os hospedeiros que não desenvolvem uma resposta imune eficiente evoluem para a fase crônica da moléstia. Os sinais clínicos são os mesmos da fase subclínica, porém apresentam-se exarcebados. Nestes animais há um maior comprometimento imunológico, tornando-os mais suscetíveis às infecções secundárias (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Como achados hematológicos, tem-se trombocitopenia, porém apenas 50% dos casos apresentam hemorragia, leucopenia seguida de leucocitose e monocitose. Geralmente a anemia é não regenerativa mas em infecções associadas com *Babesia canis* ou em hemorragias recentes, pode ser regenerativa. (TROY; FORRESTER, 1990). O teste direto de Coombs' apresenta-se freqüentemente positivo (HIBLER; GREENE, 1986). Greene (1995) propõe que a anemia poderia desenvolver-se devido ao revestimento de globulinas não específicas nas células vermelhas ou por uma resposta imune específica aos antígenos situados na superfície das hemácias. A possível formação de anticorpos antieritrocitários é também comentada por Gilbert, Clercx e Henroteaux. (1992). Greene (1995) propõe que animais acometidos pela doença são mais suscetíveis a infecções e isto se deve à diminuição do número e da função dos leucócitos. Pancitopenia, monocitose e linfocitose são achados característicos da fase crônica (TROY; FORRESTER, 1990).

Como alteração das proteínas séricas tem-se hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia. A hipergamaglobulinemia geralmente é policlonal (HARRUS et al., 1999). A eletroforese de proteína geralmente confirma a gamopatia policlonal, com aumento de α_2 -, β -, γ -globulinas, fenômeno típico da fase crônica (HIBLER; GREENE, 1986; TROY; FORRESTER, 1990). Harrus et al. (1996c), ao avaliarem as proteínas em 42 soros de cães infectados naturalmente por *E. canis* constataram gamopatia policlonal na maior parte dos animais. No entanto, gamopatia monoclonal raramente ocorre e pode resultar em síndrome de hiperviscosidade e em hemorragias (HARRUS et al., 1998b, HARRUS et al., 1999; HIBLER; GREENE, 1986). Hoskins, Barta e Rothschnitt. (1983) atribuem esse fenômeno como ocorrendo principalmente devido ao aumento de IgG. A hipoalbuminemia observada em todas as fases da erliquiose é resultante da anorexia, perda de fluidos inflamatórios, diminuição da produção de proteína devido à doença hepática e proteinúria. Além disso, a hipoalbuminemia

pode agir como mecanismo compensatório à hiperglobulinemia para manter a pressão oncótica e prevenir o aumento da viscosidade sanguínea (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Os achados anatomopatológicos são diversos. De modo geral tem-se : coágulos de sangue no trajeto nasal, aumento de volume das tonsilas palatinas, petéquias e/ou sufusões em diversos órgãos inflamatória (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b). Na fase aguda, encontra-se hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, medula óssea hiperplásica e vermelha. Na fase crônica, a medula óssea está hipoplásica e pálida em decorrência da descoloração da gordura e encontram-se nódulos marrons em pulmão e o edema é comum nesta fase (ANDEREG; PASSOS, 1999). No exame histológico, encontra-se infiltração de células mononucleares, principalmente de plasmócitos, em meninge (em 96% dos cães acometidos), cérebro, rins, linfonodos, baço, pulmões (TROY; FORRESTER, 1990) e bulbo ocular, atingindo as regiões de limbo, corpo ciliar, processo ciliar, íris, coróide e retina (ORIÁ, 2001). As hemorragias renais são focais e localizam-se preferencialmente em região córtico-medular, sendo que alguns animais apresentam glomerulonefrite, nefrite intersticial e nefrose. Observa-se plasmocitose e hiperplasia dos folículos em linfonodos e baço (TROY; FORRESTER, 1990). Ocorre dilatação dos sinusóides hepáticos e em muitos casos há necrose de coagulação centro-lobular inflamatória (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992b). Em cães com severa pancitopenia, observa-se hipoplasia da medula óssea, com depleção de megacariócitos e danos na arquitetura sinusoidal normal (TIMONEY et al., 1988).

Os testes sorológicos são empregados para confirmação laboratorial da suspeita de erliquiose canina. O teste mais comumente usado é o de anticorpos fluorescentes indiretos (AFI ou RIFI) (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Existem outros testes como o Western immunoblotting, porém de custo elevado além dos kits comerciais, como o teste de ensaio imunoenzimático, o "dot-blot-Elisa" (Immunocomb®-BIOGAL) e a reação em cadeia de polimerase (PCR) (ANDEREG; PASSOS, 1999; COHN, 2003; HARUS et al., 1998c). Apesar de tratar-se de uma técnica onerosa, pode-se também efetuar o reisolamento de *E. canis* a partir de células mononucleares do sangue e de tecidos, no entanto este é um teste mais sensível para o diagnóstico da erliquiose canina. A prevenção é feita através do controle de carrapatos, identificação dos animais soropositivos e os cães doadores de sangue devem ser negativos para a *E. canis*. Infelizmente, ainda não existem vacinas disponíveis no mercado (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Em se tratando de uma zoonose, vale ressaltar que a erliquiose humana é caracterizada por cefaléia, mal estar, febre, leucopenia, alteração hepática e trombocitopenia. Os pacientes, geralmente, apresentam histórico de contato com carrapato (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Em 1991, foi relatado o isolamento de uma *E. canis*-like do sangue de humanos com erliquiose, sendo depois denominada de *E. chaffeensis*, cujo seqüenciamento do 16S DNA-r indicou uma estreita semelhança com a *E. canis*, de 98,2% (RISTIC, 1994). Cães experimentalmente infectados com *E. chaffeensis* não desenvolveram alterações hematológicas e clínicas dignas de nota mas a detecção por PCR, da *E. chaffeensis*, em cães naturalmente infectados, indica que esta pode causar doença grave. O papel potencial da *E. chaffeensis* como um patógeno para os cães ou o papel dos cães como reservatórios para os humanos não foi ainda bem estabelecido (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998; COHN, 2003).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO BULBO OCULAR

O bulbo ocular é considerado um órgão acessório responsável pela visão. Basicamente é constituído por três túnicas, dispostas concêntricamente: a camada externa ou túnica fibrosa, formada pela esclera e córnea, a camada média ou túnica vascular formada pela coróide, corpo ciliar e íris (úvea) e a camada nervosa constituída pela retina, que se comunica com o cérebro pelo nervo óptico (BACHA JR.; BACHA, 1990). O bulbo ocular também apresenta o cristalino ou lente. O bulbo ocular é formado pela câmara anterior, localizada entre a íris e a córnea, a câmara posterior, entre a íris e o cristalino e o espaço vítreo, situado atrás do cristalino, circundado pela retina. O humor aquoso é um líquido composto por proteína e situa-se no interior das câmaras. O espaço vítreo apresenta-se cheio de uma substância viscosa e gelatinosa, o corpo vítreo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). O corpo ciliar é o prolongamento anterior da coróide e se estende até a base da íris (BACHA JR.; BACHA, 1990). O limbo situa-se na transição entre a córnea e a esclera (WALDE; SCHÄFFER; KÖSTLIN, 1990). Na periferia da câmara anterior encontra-se ângulo iridocorneal situado entre o limbo, a base da íris e o corpo ciliar (BACHA JR.; BACHA, 1990). A retina é constituída por uma porção anterior não-sensitiva que cobre o corpo ciliar, os processos ciliares e a região posterior da íris e uma porção sensitiva que é formada pelo cálice óptico e epitélio pigmentar da retina. O restante da retina origina-se da parede interna do cálice óptico onde situa-se os fotorreceptores. A camada pigmentar da retina está fortemente aderida à coróide, mas prende-se fracamente à camada sensível interna (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). (Figura 1)

A íris controla a intensidade de luz que penetra no segmento posterior do bulbo do olho. O corpo ciliar promove a acomodação visual, a gênese do humor aquoso e desempenha papel importante na regulação da pressão intra-ocular (COLLINS; MOORE, 1999). A úvea anterior é o sítio da barreira sangue-humor aquoso, que impede o acesso de proteínas de alto peso molecular para o fluído intra-ocular (RENEWICK, 1995). A coróide ou úvea posterior constitui a porção vascular mais importante do olho (REHDER; BELFORT JR., 1987), sendo a maior fonte de nutrição para retina em cães (SAMUELSON, 1999).

Fonte: Carneiro Filho, 1997

Figura 1- Desenho esquemático ilustrando as estruturas anatômicas do bulbo ocular

O bulbo ocular é considerado como um sítio de privilégio imunológico sendo que alguns fatores específicos desse órgão contribuem para essa característica. A córnea é avascular e isolada em uma cápsula dificultando dessa forma o acesso de fatores antigênicos. O bulbo ocular não possui gânglios linfáticos impedindo a resposta imune do ramo aferente; os antígenos são drenados diretamente no sistema sanguíneo quando sua diluição pode ocasionar tolerância. Se o antígeno estiver presente em concentrações adequadas, uma resposta imunológica generalizada é mais freqüente do que uma localizada. (PEIFFER JR., 1980).

As barreiras anatômicas tais como: membrana de Descemet e a cápsula da lente minimizam a difusão de antígenos e imunoglobulinas. As fortes junções do epitélio não pigmentado do corpo ciliar, a retina avascular e o epitélio pigmentado da retina permitem que

antígenos persistam por longos períodos, não sofrendo ação do sistema imune no humor aquoso, humor vítreo e na retina. Em contraste, o corpo ciliar e a vascularização da coróide são estruturas permeáveis permitindo que complexos antígenos-anticorpo se depositem na úvea, envolvendo o olho secundariamente com doenças primárias que ocorram em outro sítio (PEIFFER JR., 1980).

A barreira hemato-aquosa é formada pela camada não pigmentada do epitélio do corpo ciliar e pelo endotélio dos vasos sanguíneos da íris. A barreira hemato-retiniana é constituída pelo epitélio pigmentado da retina e o endotélio dos vasos sanguíneos da retina (NEWELL, 1996). A barreira hemato-aquosa exclui a presença de células sanguíneas e proteína no humor aquoso (HAKANSON; FORRESTER 1990). No corpo ciliar e na coróide os vasos sanguíneos são permeáveis às proteínas, permitindo que complexos imunes se depositem na úvea, envolvendo o olho secundariamente de doenças primárias que ocorram em outro sítio (PEIFFER JR., 1980). As barreiras são muito importantes tanto imunologicamente quanto na formação do humor aquoso (HAKANSON; FORRESTER 1990). Após uma injúria inflamatória essas barreiras se rompem e permitem a penetração de grandes moléculas no bulbo ocular. Quando estão íntegras, apenas íons e solutos conseguem penetrar (NEWELL, 1996).

Rizzo e Belfort (2000) citam que a ausência de drenagem linfática no globo ocular poderia restringir autoantígenos em sítios imunoprivilegiados que poderiam ser reconhecidos e atacados pelo sistema imune. Posteriormente, descobriu-se que antígenos encontrados no olho poderiam induzir uma resposta imune, mudando o conceito de imunoprivilégio. Sítios de imunoprivilégio não devem ser considerados inacessíveis. Nesses órgãos, a resposta imune se desenvolve diferentemente. Tem sido observado que o ligante FAS (FASL), expresso em células que circundam o olho, forma uma barreira protetora contra os efeitos deletérios da ativação de linfócitos T. FASL tem sido expresso no epitélio e endotélio corneal, corpo ciliar e por toda a retina. A expressão de FASL nos tecidos citados induz a apoptose de linfócitos T ativados que expressam FAS.

A ausência de drenagem linfática eferente com conseqüente drenagem da linfa para o sangue promove imunossupressão. Algumas substâncias solúveis também podem suprimir a resposta imune como TGF- β , PGE2 e neuropetídeos. No olho, algumas substâncias aderidas à membrana celular agem como inibidores da cascata do sistema complemento. As células de Müller e as células epiteliais pigmentadas da retina (RPE) modificam a resposta no olho

reduzindo o processo inflamatório. As fortes junções das células do parênquima (RPE), a expressão do ácido hialurônico na superfície da célula e a reduzida expressão do complexo de histocompatibilidade principal classes I e II (MHC I e II) também contribuem com o imunoprivilégio do bulbo ocular. O desvio imune associado à câmara anterior (ACAID) é outro mecanismo que controla a auto-imunidade no olho, a qual tem um papel importante no desenvolvimento de tolerância contra antígenos oculares (RIZZO; BELFORT, 2000)

A proteção imunológica do bulbo ocular não é absoluta, dependendo do tipo de tecido envolvido. A úvea é altamente suscetível às respostas inflamatórias e imunológicas. A úvea funciona como um linfonodo acessório no bulbo ocular. Parece que os antígenos são processados em sítios distantes e então linfócitos sensibilizados migram, acumulam-se na úvea e na conjuntiva, onde formam áreas de células imunocompetentes que participam em reações mediadas por células e produzem anticorpo localmente. Apesar de a câmara anterior estar em contato com a reatividade da úvea, a resposta imune contra o antígeno nessa região não ocorre devido à barreira hemato-aquosa (HINES, 1984)

Diversos tipos de reações imunológicas podem se desenvolver no micro ambiente imunológico do bulbo ocular, sendo os tipos II, III e IV predominantes nas uveítes. Resumidamente, as diferentes respostas incluem tipo I ou anafilática, mediadas por IgE e mastócitos, tipo II ou cito tóxica, mediadas por anticorpos, tipo III ou por imunocomplexos, mediadas por deposição de imunocomplexos e ativação do complemento, tipo IV ou mediadas por células, ou seja linfócitos T e recentemente classifica-se também o tipo V caracterizado pela estimulação de auto-anticorpos por alguns órgãos alvos. Um tipo de resposta imune pode ser predominante porém, geralmente, vários tipos ocorrem simultaneamente (COLLINS; MOORE, 1991).

2.3 UVEÍTE NA ERLIQUIOSE CANINA

A uveíte é a inflamação do trato uveal: íris, corpo ciliar e coróide. É dividida em anterior (irite e iridociclite) e posterior (coroidite e coroidorretinite). É uma condição relativamente comum e pode ocorrer secundariamente à doença sistêmica (PEAKMAN; VERGAN, 1999). Wilkie (1998) salientou que as uveítes poderiam ter sua origem nas doenças rickettsias (erliquiose e febre maculosa das montanhas rochosas). Collins e Moore (1999) e Martin e Stiles (1998) também correlacionaram a ocorrência de uveíte em cães com

erliquiose. Ellet, Playter e Pierce (1973), ao infectarem experimentalmente cinco cães da raça Pastor Alemão, relataram em dois animais moderado processo inflamatório não granulomatoso com a presença de células mononucleares (macrófagos e plasmócitos), em coróide, corpo ciliar, íris e esclera. Posteriormente, Glaze e Gaunt (1986) evidenciaram doença ocular, caracterizada por uveíte bilateral, em um cão infectado naturalmente por *E. platys*. Em 1994, Trirunavukkarasu et al. relataram a importância do exame oftalmológico para se obter um entendimento completo da patologia ocular na erliquiose canina, podendo dessa forma estabelecer um tratamento mais racional e eficiente. Panciera, Ewing e Confer (2001) avaliaram histologicamente os olhos de quatorze cães infectados experimentalmente por *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis* ou agente da erliquiose granulocítica humana. Demonstraram que apenas a *E. canis* é capaz de induzir doença ocular. Observaram processo inflamatório, caracterizado por um infiltrado de células mononucleares agregados ou difusos, predominantemente linfocítico, plasmocítico e monocítico, em corpo ciliar, íris, coróide e retina. Oriá (2001), ao avaliar cães naturalmente e experimentalmente infectados por *E. canis*, evidenciou as mesmas lesões citadas por Panciera, Ewing e Confer (2001), incluindo também a região de processo ciliar e limbo, como focos inflamatórios.

2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE IMUNOLOGIA

A imunidade celular é mediada por linfócitos T. Cada célula T é programada para reconhecer um antígeno específico, ligado à célula por meio de receptor antígeno específico da célula T (RCT). Todas as células T expressam proteínas CD3⁺. Essas não se ligam ao antígeno mas participam na transdução dos sinais para a célula, depois de se ligarem ao antígeno. As células CD4⁺ chamadas de auxiliares secretam citocinas, influenciando a função de todas as outras células do sistema imunológico, contudo, as células CD8⁺ atuam como células citotóxicas ou supressoras (COTRAN et al., 1996). O equilíbrio da produção e distribuição de linfócito T é muito importante para a homeostasia imunológica. A atividade inadequada ou demasiada de um determinado conjunto pode resultar num quadro de imunodeficiência e auto-imunidade (SEARCY, 1998). Os linfócitos T CD4-auxiliares reconhecem antígenos processados exógenos e agem como receptores da célula T para moléculas de MHC-classe II. O CD8-citotóxico ataca e mata células anormais. CD8 é um receptor que interage com moléculas de MHC-classe I e é exigido para o reconhecimento de

antígenos processados endógenos. As moléculas de MHC-classe II são restritas de células apresentadoras de antígenos como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (TIZARD, 2002). Os linfócitos B medeiam a imunidade humoral e, quando estimulados, transformam-se em plasmócito (COTRAN et al., 1996). Estas células realizam a produção endógena de imunoglobulinas. Estas moléculas estão inseridas na superfície da membrana, agindo como receptores específicos de antígenos (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1992). Os macrófagos processam e apresentam antígeno às células T imunocompetentes, produzem citocinas pró-inflamatórias e fibrogênicas e possuem atividade de fagocitose (COTRAN et al., 1996). As moléculas de superfície, denominadas de CD (Cluster Designation + denominação de grupamento) funcionam como marcadores de superfície com o uso de anticorpos monoclonais específicos; são usadas para distinguir populações de células. As moléculas de imunoglobulinas também podem ser marcadas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1992). Segundo Cotran et al. (1996), em humanos, alguns antígenos de células imunes são detectados por anticorpos monoclonais. Na veterinária, também tem sido produzidos estes anticorpos específicos visando à caracterização da população de linfócitos (GERSHWIN et al., 1995).

Diversos autores já realizaram estudos experimentais utilizando-se da técnica de imunoistoquímica, amplamente empregada em diversos órgãos (DIRSCHERL et al., 1995; ELWOOD; HAMBLIN; BATT, 1997; FU et al., 2000; KOLBJØRNSSEN et al., 1994; RABANAL; FERRER; ELSE, 1995; WÜNSCHMANN; KREMMER; BAUMGÄRTNER, 2000).

O bulbo ocular também é foco de investigação, podendo também ser avaliado através da imunofenotipagem. Gilbert et al. (1999), Romeike e Brugmann e Drommer (1998) avaliaram a imunopatogenia da uveíte recorrente dos eqüinos, utilizando-se de marcadores específicos. Garcia et al. (1996) estudaram o processo inflamatório encontrado na úvea de cães com leishmaniose, através da marcação de células reagentes para IgG e Complemento 3 (C3).

Williams (1999) realizou a imunofenotipagem com anticorpos que expressam antígeno $CD4^+$ e $CD8^+$, com posterior análise histomorfométrica, na queratite superficial crônica canina.

2.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA ERLIQUIOSE CANINA

Tem-se fortes evidências de que componentes imunopatológicos estão envolvidos com a erliquiose canina, tais como: extensa infiltração plasmocitária perivascular e no parênquima de pulmões, rins, baço, meninges, e globo ocular, teste de auto-aglutinação e antiglobulina direta positivos, hipergamaglobulinemia e a demonstração de anticorpos antiplaquetas em cães experimentalmente infectados (HARRUS; HYLTON; WANER, 1997; HARRUS et al., 1999).

É inquestionável que a erliquiose canina gira em torno de alterações do sistema imunológico, tanto no ponto de vista bioquímico como celular (BONNARD; DRALEZ, 1999). Por esta razão, diversos estudos são realizados, no intuito de melhor elucidar a imunopatogênia dessa doença. Para Greene (1995) a infiltração por plasmócitos ocorre em vários órgãos, resultando numa resposta humoral, com importante papel na patogenia dessa doença. Por exemplo, nos rins, devido à imunofluorescência, demonstrou-se que há deposição de imunoglobulinas. A linfadenopatia e esplenomegalia são conseqüências da hiperplasia do sistema linforeticlar em sítios de localização de linfócitos T e B, demonstrando uma reação exagerada na tentativa de compensar uma resposta imunológica não efetiva (REARDON; PIERCE, 1981a,b).

Segundo Nyindo et al. (1980), a *E.canis* que induz imunossupressão e a resposta imune, humoral e celular estão diretamente e indiretamente envolvidas. Nyindo et al. (1980) e Timoney et al.(1988) citaram que em estudo experimental, constataram que houve o desenvolvimento de uma resposta mediada por célula, porém esta desapareceu em torno da décima nona e a vigésima primeira semanas pós-infecção. Kakoma et al. (1977) e Timoney et al. (1988) relataram que, curiosamente, linfócitos de cães infectados por *E.canis* são citotóxicos aos monócitos autólogos. Sugeriram que a ativação de linfócitos T contribuiria com a patogenia da doença e que a eliminação imune específica de monócitos parasitados seria anticorpo independente. Para Kakoma et al. (1977) essa reatividade autóloga entre linfócitos e monócitos tem predomínio na fase aguda, persiste durante a fase crônica porém em menor grau. Portanto, o efeito citotóxico para monócitos é dependente da concentração de linfócitos cuja relação seria de aproximadamente 100:1 (linfócitos : monócitos).

Bonnard e Dralez, (1999) sugeriram que linfocinas e fator inibidor de migração de leucócitos são produzidos, sendo que a evolução da doença tem relação estreita com o estado imunitário do animal.

Waner et al. (2001) também relataram que a imunidade é induzida por células além da secreção de interferon gama (INF- γ) e óxido nítrico, porém segundo esses mesmos autores, alguns estudos são divergentes. Ao avaliarem o mecanismo imune em camundongos "knock out", os resultados indicaram que linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, a síntese de óxido nítrico e INF- γ não são essenciais na defesa do hospedeiro contra *E. chaffeensis*, nesse modelo experimental.

Nyindo et al. (1980) citaram o uso de um potente imunossupressor (soro anti-linfócitos) com resultados benéficos em algumas doenças virais e por protozoários. Contudo, na erliquiose canina não causou nenhum benefício, constatando que a função das células T não tem influência no curso da infecção.

Para Harrus et al. (1999) e Waner et al. (2001) a resposta humoral não parece ter um papel importante na proteção contra o parasito, mas contribuiria com a patogenia da doença.

Nyindo et al. (1980) demonstraram que não há uma correlação direta entre o aumento dos títulos de anticorpos e a resposta imune celular e que aparentemente, os anticorpos são efetivos apenas em células livres de parasita.

Segundo Waner et al. (2001), o papel da imunidade humoral ainda não está muito claro. Relataram que animais foram submetidos a várias imunizações, usando-se culturas de células infectadas por *E. canis*, fortificadas com adjuvante. Induziram um bom nível de anticorpos entretanto, a manifestação clínica desses cães apresentou-se mais fulminante quando comparados com animais controles.

Harrus, Hylton e Waner (1997) e Harrus et al. (1999) citaram que não há correlação entre a hipergamaglobulinemia e os títulos de anticorpos para *E. canis*, sugerindo que a produção de anticorpos não específicos é induzida pela *E. canis* e que anticorpos anti-*E. canis* não são os principais responsáveis pela hipergamaglobulinemia. Há estimulação antigênica prolongada, sugerindo uma resposta imune humoral aberrante e exagerada, mas inefetiva.

Ainda para Greene (1995), não existe correlação entre o aumento dos títulos de anticorpo e a resposta imune mediada por células, portanto os níveis de anticorpos realmente não garantem proteção.

Nyindo et al. (1980) e Waner et al. (2001), relataram e demonstraram que a raça Pastor Alemão é mais suscetível à infecção e acredita-se que seja devido à deficiência em montar uma resposta imune celular adequada. Assim, esse achado sugere que a resposta imune celular seria o componente que conferiria proteção contra a *E. canis*.

Ainda, Harrus et al. (1999) sugeriram que há um estado de pré-munição em cães durante a fase subclínica da doença e em animais logo após do tratamento com oxitetraciclina, sendo esta mantida principalmente pela resposta imune celular. Esses mesmos autores relataram que o baço tem um importante papel na imunopatogenia da erliquiose por ser um grande produtor de anticorpos, o principal sítio do sistema mononuclear fagocitário e por promover a síntese de opsoninas e substância do complemento, tanto que a esplenectomia é um dos tratamentos em casos refratários, e com isto reduziria a produção dessas substâncias, além de comprometer a fagocitose.

Segundo Harrus et al. (1998a), a esplenomegalia ocorre em 37% dos cães naturalmente infectados por *E. canis*. Estes mesmos autores, ao infectarem doze cães, constataram que os quatro animais esplenectomizados desenvolveram a doença de forma mais moderada que os oito cães intactos. Concluíram portanto, que o baço ao produzir mediadores inflamatórios e outras substâncias esplênicas teria realmente um importante papel na patogenia da doença.

Frank e Breitschwerdt (1999) realizaram citometria de fluxo em animais com ocorrência espontânea de erliquiose e constataram inversão na relação CD4 : CD8. Esse achado é sugestivo de um desarranjo imunológico, predispondo o animal a outras doenças. Citaram que o processo desta imunodesregulação ainda não é conhecido e que doenças, que comprometeriam o sistema imune, tornariam o animal mais suscetível em desenvolver as manifestações crônicas da erliquiose.

Castro et al. (2004), realizaram estudo imunoistoquímico em cães experimentalmente infectados por *E. canis*, durante a fase aguda e constataram, em linfonodo e baço, alterações nas populações imunofenotípicas de linfócitos. Observou-se na região paracortical e medular do linfonodo e na zona marginal e, nos cordões esplênicos do baço, aumento de linfócitos imunorreagentes a IgG e IgM. O número de células CD3⁺ apresentou-se aumentado na região medular e nos cordões esplênicos e reduzido na região folicular do linfonodo. Inversamente, a contagem de células CD8⁺ mostrou-se reduzida no baço e aumentada no linfonodo. Estudos experimentais demonstraram a importância da interação entre a resposta humoral e celular para a destruição do microorganismo (KAKOMA et al., 1977; LEWIS; RISTIC, 1978).

Para Waner et al. (2001), os agentes rickettsiais desenvolveram um mecanismo de persistência no organismo, esquivando-se da resposta imune do hospedeiro, entretanto, esse processo ainda não está muito claro mas acredita-se que esses parasitas possuem múltiplos genes, com regiões variáveis e constantes o que permitiria que se recombinem e, conseqüentemente, induzir uma variação dos determinantes antigênicos.

Como foi citado e demonstrado anteriormente, é inquestionável a preocupação dos diversos autores no estudo da imunopatogênia dessa doença já que tudo indica que fenômenos imunológicos estão envolvidos com essa patologia. Por esse motivo, a equipe coordenada por Machado e outros autores continuam suas pesquisas enfatizando esse aspecto, pois muito ainda tem que ser entendido. Existe uma carência de trabalhos que realizem técnicas de imunoistoquímica para demonstrar a participação de células T e B. Não existem trabalhos voltados à imunopatogênica da uveíte na erliquiose canina.

Oriá (2001) e Panciera, Ewing e Confer (2001) realizaram um estudo semi-quantitativo da intensidade do infiltrado inflamatório em cães infectados por *E.canis* mas não deram seguimento ao estudo imunoistoquímico dessa lesão. Acreditamos que, com esse trabalho e com os futuros resultados, poderemos esclarecer alguns processos ainda não conhecidos e tentar desvendar a patogenia da erliquiose canina.

2.6 BABESIOSE-ASPECTOS GERAIS

A babesiose é uma doença causada por parasitas denominados *Babesia*, considerados hemosporídeos ou hematozoários do *phylum Sporozoa*, ordem *Piroplasmida*, família *Babesiidae* (TABOADA; MERCHANT, 1991).

Os principais vetores destes microorganismos são os carrapatos da superfamília *Ixodoidea* mas existem relatos indicando a transmissão por insetos hematófagos como os tabanídeos, *Stomoxys* e talvez outros iatrogênicamente, por agulhas de injeção além de, mais comumente, por transfusão de sangue (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992a).

Também foi mencionada uma possível transmissão placentária (BREITSCHWERDT, 1990; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992).

Este parasita foi descoberto, pela primeira vez, por Babes em 1888 na Romênia e no Brasil, por Farjado, em 1901 (CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M., 1992a). Causa doença em uma série de hospedeiros vertebrados, incluindo os animais domésticos e silvestres e o Homem (TABOADA; MERCHANT, 1991).

2.7 BABESIOSE CANINA

A babesiose canina é uma doença causada por parasitas intracelulares que se situam no interior dos eritrócitos induzindo uma anemia progressiva (LAPPIN, 1992).

Anteriormente, era chamada de “febre biliar do cão” ou “icterícia maligna” (BOURDEAU; GUELFİ, 1995; JUBB; KENNEDY, 1970). Esta doença também pode ser denominada de “piroplasmose canina” (BOURDEAU; GUELFİ, 1995).

Foram identificadas 73 espécies de *Babesia*. Dessas, três infectam os cães e canídeos selvagens: *B.canis*, *B.gibsoni* e *B.vogeli* (KONTOS; KOUTINAS, 1997; TABOADA; MERCHANT, 1991; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992).

Para Bourdeau e Guelfi (1995) e Lobetti (1998), a *B. canis* é composta por diversas cepas. Três grandes grupos poderiam ser considerados: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*.

A babesiose canina possui caráter cosmopolita, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais subtropicais e temperadas segundo a distribuição dos carrapatos vetores (BREITSCHWERDT, 1990; SWANGO; BANKEMPER; KONG., 1992).

A *B.canis* é transmitida pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor spp*, *Haemaphysalis leachi* e *Hyalomma plumbeum*. A *B. gibsoni* é vetorizada pelos *Haemaphysalis bispinosa* e *Rhipicephalus sanguineus*. A *B. vogeli* é transmitida pelo *R. sanguineus* (BREITSCHWERDT, 1990; LAPPIN, 1992).

A babesiose no cão pode aparecer simultaneamente com outras parasitas sangüíneos como: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, *Hepatozoon canis*, *Leishmania donovani* e *Haemobartonella canis* (JAIN, 1993a; KONTOS; KOUTINAS, 1997; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Segundo estudos de Kontos e Koutinas (1997), em 15 casos espontâneos de babesiose canina, foram diagnosticados cinco casos de infecção concomitante com outros hemoparasitas como *E. platys*, *E. canis*, *H. canis* e *L. donovani*. Estudo indica que, em 67 cães suspeitos de babesiose, 55% apresentavam infecção mista de *B. canis* e *E. canis* (BOURDEAU; GUELFİ, 1995).

A patogenia causada pelas três espécies de *Babesia* canina é muito semelhante. As diferenças na patogenicidade entre as diferentes cepas das espécies de *Babesia*, o grau de

parasitemia, a resposta imunológica e a idade do animal influenciam em diferentes graus de gravidade a síndrome clínica (BREITSCHWERDT, 1990).

A infecção naturalmente adquirida ocorre através dos carrapatos fixados no animal durante o repasto sangüíneo. A transmissão através da transfusão de sangue infectado é geralmente usada para a infecção experimental. Após a infecção natural, tem-se uma parasitemia inicial num período de um ou dois dias, perdurando aproximadamente por quatro dias (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Na infecção experimental por *B.canis*, a parasitemia transitória inicia-se um dia após a inoculação. Os microorganismos desaparecem da circulação periférica por um período de dez dias, e uma segunda parasitemia mais intensa ocorre depois de duas semanas tendo seu pico vinte dias após a inoculação experimental (BREITSCHWERDT, 1990; LOBETTI, 1998). Os cães que se recuperam da infecção inicial demonstram períodos variáveis e imprevisíveis de parasitemia que se alternam com intervalos de dormência (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992).

A multiplicação dos parasitos no interior dos eritrócitos ocorre por fissão binária causando hemólise intravascular e extra vascular (BREITSCHWERDT, 1990; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). A hemólise intravascular é predominante na fase aguda da doença resultando em anemia regenerativa, hemoglobinemia, bilirubinemia, hemoglobinúria e bilirubinúria (BREITSCHWERDT, 1990; LAPPIN, 1992).

A hemólise extravascular ocorre principalmente em nível de baço, fígado e medula óssea (BOURDEAU; GUELF, 1995).

A pirexia é comum durante a infecção e, provavelmente, ocorre devido à liberação de pirógenos endógenos durante a eritrólise, a destruição dos parasitas e eritrócitos pelo sistema mononuclear fagocitário (BREITSCHWERDT, 1990; TABOADA; MERCHANT, 1991). A ativação dos mediadores inflamatórios também promove pirexia (LOBETTI, 1998).

Como consequência da anemia tem-se anóxia. A hipóxia tissular resultante induz a um metabolismo do tipo anaeróbico com formação de ácido láctico e à acidose metabólica. Se a compensação respiratória não for suficiente, o débito cardíaco diminui, agravando ainda mais a hipóxia, resultando em morte celular e choque (BOURDEAU; GUELF, 1995). A hipóxia decorrente da hemólise promove lesões micro vasculares levando ao desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada (DIC) (BREITSCHWERDT, 1990; LAPPIN, 1992; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992).

No ponto de vista clínico, cães com babesiose podem apresentar as formas hiperaguda, aguda, crônica, subclínica e/ou infecção atípica (LAPPIN, 1992; TABOADA; MERCHANT, 1991).

Os sinais clínicos mais comuns da babesiose canina são febre, anemia, linfadenopatia periférica e esplenomegalia, estes sintomas também são vistos na erliquiose canina por *E. canis* ou *E. platys* e na leishmaniose canina (KONTOS; KOUTINAS, 1997).

A forma hiperaguda acomete principalmente os cães jovens provocando uma infecção mais severa que nos adultos (KONTOS; KOUTINAS, 1997; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Os cães submetidos à esplenectomia muitas vezes mostram o padrão hiperagudo. Os animais geralmente aparecem em estado de choque ou em coma e morrem um dia após um histórico de letargia e anorexia (TABOADA; MERCHANT, 1991). Hemorragias petequiais e equimoses são observadas em cães com trombocitopenia ou DIC (BREITSCHWERDT, 1990). Hematúria pode ser notada. O prognóstico é de reservado a sombrio (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992).

A forma aguda acomete particularmente os animais jovens, porém os adultos, em casos de doenças associadas, stress e partos, também podem desenvolver esta forma (BOURDEAU; GUELF, 1995; TABOADA; MERCHANT, 1991). Clinicamente, demonstram anorexia, febre, esplenomegalia que podem estar acompanhadas de hepatomegalia, trombocitopenia letargia, anemia hemolítica, hemoglobinemia, hemoglobinúria, icterícia, hematúria, vômito, linfadenopatia (JAIN, 1993b; TABOADA; MERCHANT, 1991), mucosas hipocoradas e mucosa conjutival edematosa. Observa-se em alguns casos dificuldade de locomoção, tosse e mialgia (BOURDEAU; GUELF, 1995).

Na forma subclínica, os sinais clínicos geralmente são inaparentes e os parasitas são dificilmente encontradas nos esfregaços sangüíneos. A sintomatologia pode ser desencadeada em animais estressados ou submetidos a tratamento com corticóide. Estes cães podem ser considerados como importantes fontes de infecções para os animais jovens (TABOADA; MERCHANT, 1991).

A infecção atípica é constituída por sintomas variáveis. A sintomatologia de natureza hemorrágica é rara apesar da grande freqüência de trombocitopenia (BOURDEAU; GUELF, 1995). Ocasionalmente, pode ser observada alteração moderada nas vias aéreas superiores e dispnéia geralmente autolimitantes ou que respondem rapidamente ao tratamento. As manifestações gastrointestinais como emêse e constipação são mais freqüentes (TABOADA; MERCHANT, 1991). Podem ser observados paresia, paralisia, ataxia, convulsões, claudicação, poliartropatias, tremores musculares, nistagmo, anisocoria, apreensão, estupor, coma, agressão, vocalização e perda intermitente da percepção (LOBETTI, 1998; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Algumas alterações isquêmicas podem ser notadas e estas são demonstradas através de necrose das extremidades como orelha, cauda, língua, membros e

focinho (BOURDEAU; GUELFİ, 1995). Pode ser relatado um corrimento oculonasal mucopurulento como sintoma similar à erliquiose canina, indicando a possibilidade de infecção concomitante (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992).

A infecção crônica pode ser caracterizada por hiporexia, febre intermitente, grande perda da massa corpórea, fraqueza, letargia, emaciação, leve anemia e icterícia branda (BREITSCHWERDT, 1990; TABOADA; MARCHANT, 1991; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992). Apresenta-se em animais adultos os quais demonstram pouca vivacidade e anemia. Pode ocorrer em alguns, peculiar fragilidade capilar, causando hemorragia constante do pavilhão auricular, principalmente nas pontas, como se fora por picada de insetos. Os animais ficam doentes por meses sem que haja morte (CORRÊA W. M.; CORRÊA C. N. M., 1992a).

Bourdeau e Guelfi (1995) citam uma forma de marcante hiperhemólise que acomete 15% dos animais, atingindo principalmente os jovens. É caracterizada por astenia marcante, mucosas pálidas ou subictéricas, hemoglobinúria devido à hiperhemólise intravascular com urina “cor de café”, anemia regenerativa, trombocitopenia não tão marcante como na forma aguda ou clássica, às vezes hiperleucocitose com neutrofilia e monocitose. Há a manifestação de todos os sinais clínicos de uma insuficiência hepática e renal e, às vezes, de CID.

Para o diagnóstico epidemiológico é necessário informar se o animal esteve em regiões enzoóticas ou regiões de risco e se entrou em contato com os carrapatos vetores (BOURDEAU; GUELFİ, 1995).

Para o diagnóstico clínico, são realizados os exames laboratoriais. As alterações dos parâmetros laboratoriais variam de acordo com a apresentação clínica (BREITSCHWERDT, 1990).

O diagnóstico principal da babesiose canina é feito através do esfregaço sangüíneo onde se observa a presença destes microorganismos no interior dos eritrócitos infectados (LOBETTI, 1998). A detecção dos parasitas em animais com a doença aguda é de maior facilidade tornando-se mais difícil em animais crônicos ou com a doença assintomática. Para facilitar o diagnóstico, nestes casos, é feita a inoculação do sangue do animal suspeito para um animal esplenectomizado (SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992; TABOADA; MARCHANT, 1991).

Os animais com babesiose apresentam, como primeira alteração hematológica, anemia, trombocitopenia e linfocitose. Nos primeiros dias após a infecção, geralmente a anemia é normocítica, normocrômica e moderada. A anemia torna-se hipocrômica,

macrocítica e regenerativa com o decorrer do processo. Os reticulócitos são proporcionais à gravidade da anemia. Animais com a doença crônica e com anemia normocítica, normocrômica podem estar apresentando associação com *Ehrlichia canis* (TABOADA; MERCHANT, 1991). Em alguns casos tem-se a predominância de polinucleares (neutrófilos). Em outros casos as células mononucleares dominam com o aparecimento de monócitos e/ou macrófagos que às vezes apresentam inclusões. Os linfócitos podem ser “reacionais” ou com grânulos intracitoplasmáticos azudofílicos. A trombocitopenia é constante, com forte anisocitose plaquetária. Na maioria dos casos, não há alteração notável da coagulação plasmática (BOURDEAU; GUELF, 1995). Há anisocitose, poiquilocitose, policromasia e a existência de eritrócitos nucleados demonstrando ser uma anemia regenerativa (BREITSCHWERDT, 1990; SWANGO; BANKEMPER; KONG, 1992) que é confirmada com a presença de reticulócitos. Esferócitos podem ser achados ocasionalmente. O teste de Coombs é positivo na maioria dos casos de infecção por *B.canis* ou *B. gibsoni* (BREITSCHWERDT, 1990).

Na urinálise podem ser vistas bilirubinúria, hemoglobínúria, proteinúria e a presença de cálculos (TABOADA; MERCHANT, 1991). As taxas de uréia e creatinina geralmente estão elevadas. A urina possui coloração amarela alaranjada, com pigmentos biliares, presença de proteína em 50% dos casos e freqüentemente tem-se uma atividade peroxidase positiva (BOURDEAU; GUELF, 1995).

Animais muito acometidos podem apresentar hipocalcemia. Azotemia e acidose metabólica são comuns contribuindo com a morbidade e mortalidade. Na doença aguda por *B. canis*, a hiperbilirubinemia é um achado consistente, entretanto na infecção por *B.gibsoni* raramente ocorre. As atividades enzimáticas podem estar aumentadas em casos graves. Em casos sintomáticos, pode existir trombocitopenia, mas raramente ocorrem hemorragias espontâneas. Tem-se supressão da atividade produtiva da medula óssea com seqüestro para o fígado e baço que aumentam sua função. Uma das possíveis causas seria a destruição das plaquetas por ações imunes ou não imunes (TABOADA; MERCHANT, 1991).

A sorologia é usada em casos de parasitemia oculta ou patente. Existem vários testes disponíveis sendo os testes de anticorpo fluorescentes indiretos os mais usados. Normalmente, títulos maiores ou iguais a 1:80 são considerados positivos, títulos de 1:40 sugerem uma infecção, e títulos menores de 1:40 são negativos (TABOADA; MERCHANT, 1991). Outros testes podem ser utilizados como o ELISA e o Dot-ELISA (BOURDEAU; GUELF, 1995).

3 OBJETIVO

3.1 GERAL

Estudo da patologia e imunopatogênia da uveíte na erliquiose canina experimental e espontânea e em casos de co-infecção com *Babesia sp.*, utilizando-se de técnica imunoistoquímica, para caracterizar imunofenotipicamente os tipos celulares envolvidos.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar macroscopicamente e microscopicamente os bulbos oculares de cães com a doença espontânea e experimental.
- b) Detecção e análise morfométrica da presença de linfócitos T(CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B (CD79⁺, IgG1⁺ e IgG2⁺), macrófagos (MAC387⁺ e CD68⁺) e a identificação de células inflamatórias que expressam MHC II (TAL. 1B5), no infiltrado inflamatório dos bulbos oculares.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Grupo 1 (G1)-Animais experimentalmente infectados

Grupo C (GC)- Animais controle

Os animais experimentalmente infectados empregados nesse estudo são os mesmos que fizeram parte de trabalho previamente realizado por Silva (2001).

O parasita utilizado para infecção experimental foi isolado por Machado (1993)¹ e posteriormente identificada pela PCR apresentando 94% de identidade com *Ehrlichia canis*, cepa Kagoshima (AF 536827- identificação no Genbank) (SOUZA et al., 2004).

Foram infectados quatro cães segundo a técnica descrita por Buhles JR., Huxsoll e Ristic (1974) e reproduzida por Castro et al. (2004) e três cães formaram o grupo controle. No G1 confirmou-se o diagnóstico pelo quadro clínico, eritrograma, contagem de reticulócitos e plaquetas, presença de mórulas do parasita em mononucleares de sangue periférico e pela sorologia, utilizando-se, no trigésimo dia pósinfecção, o kit baseado na técnica de "dot-blot Elisa" (Immunocomb®- BIOGAL).

A técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) foi empregada para a detecção de anticorpos anti- *Babesia* sp. (BRANDÃO, 2001; D'ELL PORTO, 1986). Os bulbos oculares de todos os cães foram colhidos após eutanásia no trigésimo dia pós-infecção.

¹ Machado, R. Z.(Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP-Jaboticabal)

4.2 ANIMAIS NATURALMENTE INFECTADOS

Grupo 2 (G2)- Animais com erliquiose espontânea

Grupo 3 (G3)- Animais com erliquiose e babesiose espontânea

Devido à grande dificuldade de se encontrar animais com erliquiose espontânea sem haver a co-infecção com *Babesia sp.*, já que os dois agentes são transmitidos pelo mesmo vetor, esses animais foram divididos em dois grupos: aqueles com diagnóstico de *E. canis* apenas, e outro apresentando a infecção pelos dois agentes. Esses animais foram provenientes da casuística, do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" e das aulas de técnica cirúrgica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal.

Nove cães fizeram parte do estudo, sendo quatro com erliquiose canina de ocorrência natural e cinco apresentando co-infecção natural de *E. canis* e *Babesia. sp.*

Avaliaram-se animais com uveíte, com quadro clínico e laboratorial de hemoparasitose. Foram colhidos 10ml de sangue, centrifugaram-se 7 ml para a obtenção do soro, para posteriores testes sorológicos e 3 ml, adicionados ao EDTA, para a realização do hemograma, contagem de plaquetas, reticulócitos e PCR.

4.3 ERITROGRAMA, CONTAGEM DE PLAQUETAS E RETICULÓCITOS

Efetuuou-se a contagem de hemácias, de plaqueta, o hematócrito e as taxas de hemoglobina em contador automático de células (Coulter AcT 8). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados pelo corante de Rosenfeld e os reticulócitos, pelo corante azul de metileno. Os índices hematimétricos foram calculados segundo Navarro e Pachaly (1998).

4.4 SOROLOGIA

Os soros foram mantidos a - 20 °C e foram submetidos a testes sorológicos. O kit que foi utilizado para detecção de anticorpos anti-*E.canis* é baseado na técnica de "dot-blot Elisa" (Immunocomb®- BIOGAL), sendo possível de determinar anticorpos da classe IgG específicos para o parasita.

Posteriormente, foi realizado RIFI para *Babesia sp.*, já que se cogita a possibilidade de infecções associadas. As lâminas de imunofluorescência foram gentilmente cedidas por Brandão (2001).

Para descartar a possibilidade de infecção pela *Leptospira sp.* e *Toxoplasma gondii*, realizou a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) e o teste de Elisa indireto, respectivamente nos grupos 2 (G2) e 3 (G3).

4.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia sp*

Em uma placa de poliestireno com fundo em formato U, as amostras de soros dos cães suspeitos e do controle positivo e negativo foram diluídas na razão 1:40 e 1:80, em solução salina a 0,8% tamponada e autoclavada. Em seguida, pipetou-se 15µL das amostras diluídas em cada poço das lâminas elaboradas para RIFI, conforme a técnica de Brandão (2001) e D'ell Porto (1986). Em câmara úmida, as lâminas foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Posteriormente, foram submetidas a três lavagens com PBS, de cinco minutos cada. Após a secagem, a cada poço foi adicionado 15µL de conjugado, IgG de coelho anti-IgG de cão, marcado pelo isotiocianato de fluoresceína (Sigma catalog nº F7884), diluído conforme orientação do fabricante. O material foi incubado por mais 45 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia com emissão de luz fluorescente (Olympus BX60). Foram considerados positivos os soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:40. A positividade da reação implicou a observação de fluorescência, comparativamente a amostras controle positivo e negativo.

4.4.2 Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para *Leptospira* sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*

Utilizou-se a técnica de SAM, com emprego de antígenos representados por culturas de leptospiros vivas conforme recomendação do Centro Panamericano de Zoonoses, (VIEGAS, 2001) para a detecção de anticorpos para leptospiros nos soros caninos. Essa técnica é reconhecida mundialmente e recomendada pela Organização Mundial da Saúde desde 1967. As provas foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Campus Jaboticabal-Unesp. Empregou-se variantes sorológicas de leptospira com cinco a oito dias de cultivo no meio Ellinghausen (Mac Culough, Jonhson, Harris- EMJH-Difco) modificadas, enriquecidas com soro de coelho, asparagina, cloreto de cálcio e magnésio (ALVES et al., 1996; TURNER, 1993). As amostras de soro foram diluídas na razão 1:25 em solução tamponada de Sörensen (SANTA ROSA, 1970). Em seguida, alíquotas de 50 µL de cada amostra de soro diluído foram pipetadas em placas de poliestireno onde foram realizadas as diluições seriadas, numa série geométrica de razão de dois a partir da diluição 1:100, num total de cinco diluições. Posteriormente, foram adicionados para cada diluição os antígenos das duas variantes antigênicas de leptospira ou seja, os sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. As misturas de soro e antígeno foram levemente agitadas e incubadas em temperatura de 28 °C, por três horas. Para a leitura das reações, foi utilizado microscópio de campo escuro marca Zeiss e objetiva de 40X, atentando-se para a presença de grumos de aglutinação, por meio de colocação de uma gota da mistura soro e antígeno na superfície da lâmina de vidro, tamanho 26X76 mm. Considerou-se como reação positiva, a amostra que apresentou títulos sorológicos a partir de 1:100.

4.4.3 Prova de ELISA Indireto para o Diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

Foram adicionados 100 µL de antígenos de *Toxoplasma gondii* diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9,6, a cada cavidade da placa para ELISA (Immulon 2[®],

Dynatech Laboratories Inc.). A concentração da proteína foi ajustada para $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. A incubação foi realizada durante a noite a 4°C , e depois bloqueada por uma hora, a 37°C , em câmara úmida, com tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, adicionado de 5% de leite em pó desnatado. Em seguida realizaram-se cinco lavagens com tampão PBS-Tween (fosfato salina, pH 7,2 e Tween 20 a 5%). Pipetou-se na placa de ELISA, $100\mu\text{L}$ de soro canino diluído em PBS-Tween (1:200), adicionados de 5% de soro normal de coelho, em duplicata. Posteriormente, incubaram-se as placas a 37°C , em câmara úmida por 90 minutos. Foram realizadas cinco lavagens com PBS-Tween. Logo a seguir, foi incluída a cada cavidade da placa, uma alíquota de $100\mu\text{L}$ do conjugado de coelho anti-IgG de cão (Sigma- cód. A-0793) marcado com fosfatase alcalina, diluída a 1:4000 em PBS-Tween e acrescida de 5% de leite em pó desnatado. A placa foi novamente incubada por 90 minutos e depois lavada por cinco vezes em PBS-Tween. O substrato da enzima fosfatase alcalina pNPP (p-nitrofenil fosfato diluído a 1 mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8) foi adicionado, e as placas seladas foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. Finalizando, a reação foi interrompida pela adição de $25\mu\text{L}$ de hidróxido de sódio 3,2M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (MRX TC Plus, Dynex Technology), filtro 405nm. A técnica descrita foi padronizada e preconizada por Machado, em 1995.

4.5 REAÇÃO DE CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

4.5.1 Extração de DNA de Sangue Total

A extração de DNA do sangue total foi realizada com o QIAamp DNA Blood Mini Kit (cat. n° 51104, Qiagen®), como descrita por Murphy et al. (1998) e a técnica utilizada foi a descrita pelo fabricante.

4.5.2 Seleção dos primers

Os primers utilizados para a PCR de *Ehrlichia* spp foram aqueles baseados na sequência do gene 16S rRNA ECC e ECB, que amplifica todo o gênero. No nested PCR para amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis* foram utilizados os primers ECAN5 e HE3 (HARRUS et al., 1998d; MURPHY et al., 1998; WEN et al., 1997).

ECC: (5'– GAACGAACGCTGGCGGCAAGC –3')

ECB: (5'– CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA –3')

ECAN: (5'– CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA –3')

HE3 (5'– TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT –3').

4.5.3 Amplificação de DNA de *Ehrlichia* spp e de *E. canis*

As reações foram compostas por 1,0µl do DNA da amostra em 5,0 µl de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf®), 2,5mM de Cloreto de Magnésio, 1pmol de cada primer (MWG®), 1,25U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen®) e água (Gibco®) q.s.p. 50µl.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (MJ Research - PTC 200). A amplificação com os primers ECC e ECB consistiu-se de um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a reação do nested foram utilizadas as mesmas soluções, além de 1,0µl da amostra de DNA amplificado e os primers espécie-específicos ECAN5 e HE3. A reação consistiu-se de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minutos e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minutos (MURPHY et al., 1998).

4.5.4 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5µl/mL) em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 90V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp ladder, Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene®).

A técnica acima descrita foi a mesma utilizada por Nakaghi (2004).

4.6 MÉTODO DE COLHEITA DOS BULBOS OCULARES PARA O ESTUDO HISTOLÓGICO PELA COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (H/E) E PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

Os bulbos oculares dos cães controles, experimentalmente e naturalmente infectados (G1, GC, G2 e G3) foram colhidos, fixados em formalina a 10% tamponada com fosfatos, pH 7,0, por 12 horas. Posteriormente foram cortados em duas partes e fixados em formalina a 10 % por mais 12 horas. Foram transferidos em álcool etílico 70% e incluídos em parafina para a obtenção de cortes histológicos, com 3 µm de espessura. Esses foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e submetidos à técnica de imunoistoquímica.

4.7 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DOS CORTES DE TECIDO OCULAR CORADOS PELA HEMATOXILINA EOSINA (H/E)

Adotou-se um critério semi-quantitativo, sendo que a intensidade da inflamação ocular foi avaliada em limbo, íris, corpo celular, ângulo iridocorneal, retina e coróide como : infiltrado celular inflamatório mínimo (+), moderado (++) e intenso (+++) (ORIÁ, 2001; PANCIERA; EWING; CONFER, 2001).

4.8 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

4.8.1 Padronização da Técnica de Fixação do Material na Lâmina Microscópica

Encontramos grandes dificuldades para a padronização da técnica de fixação do material na lâmina. O bulbo ocular por ser um tecido muito delicado e delgado se desprendia facilmente da lâmina após a recuperação antigênica realizada pelo calor. A recuperação antigênica enzimática mostrou-se menos agressiva para o tecido. De início, testamos esse método utilizando a proteinase K(Dako Corporation cód. S3020, Carpinteria, USA) por 10 minutos e/ou a tripsina a 0,1% por 30 minutos em estufa a 37 °C, porém para os anticorpos primários CD79 α , TAL1B5, não obtivemos marcação. Observamos que a recuperação antigênica pelo calor era mais efetiva e deveríamos encontrar algum método para fixar o tecido na lâmina.

Para retirarmos qualquer resíduo de gordura e poeira, as lâminas foram lavadas com detergente líquido, enxaguadas abundantemente em água corrente e água destilada. Foram mantidas, durante duas horas, em uma solução de HCl e álcool etílico (1:9) e lavadas novamente. Logo após, foram transferidas por dez minutos, em um recipiente contendo água MilliQ a 56°C e secadas em estufa. Testamos dois produtos empregados para a fixação do material: o organosilano a 6% e 8% (3 amino-propyltriethoxyl-silane-Sigma Chemical Co.,

St. Louis, Mo/USA, cód. A 3648) e a polilisina pura (Poly-Lysine-Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo/USA, cód. P8920). O organosilano foi utilizado na seguinte metodologia: as lâminas foram mergulhadas em acetona pura por dois minutos, transferidas para outro dois recipientes, um contendo uma solução de organosilano e acetona a 6% e outro a 8% onde permaneceram por dois minutos. Posteriormente, foram banhadas em acetona pura por duas vezes e transferidas para outro recipiente contendo também acetona pura onde foram submetidas a dois banhos rápidos. As lâminas foram secadas em estufa a 50 °C e protegidas por papel alumínio até o uso. A polilisina foi utilizada pura sobre as lâminas anteriormente tratadas. Infelizmente não obtivemos êxito.

Obtivemos uma melhora quando a polilisina foi empregada sobre o tecido logo após o corte do material sobre as lâminas tratadas e silanizadas. Após exaustivas tentativas, pesquisas e comunicação com técnicos de laboratório de imunoistoquímica, veio ao nosso conhecimento a existência de lâminas revestidas com adesivo que melhoram a aderência do tecido (lâminas Superfrost Plus-Erviegas cat. ERV-SFPPLUS). O uso dessas lâminas, adicionado ao emprego da polilisina pura sobre os cortes, demonstrou ser o melhor método para garantir a fixação do material à lâmina.

4.8.2 Anticorpos

A técnica de imunoistoquímica foi empregada para a identificação de linfócitos T(CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B (CD79 α , IgG1 e IgG2), macrófagos (MAC387, CD68) e identificação de células inflamatórias que expressam MHC II (TAL.1B5).

LINFÓCITOS B

Como marcador específico de linfócitos B e plasmócitos empregou-se o anticorpo CD79 α (clone HM 57- Dako Corporation cód. M 7051, Carpinteria, USA), (CHRISTGAU et al., 1998 ; WIBERG et al., 2000).

Anticorpos primários anti-IgG1 e anti-IgG2 (Bethyl Laboratories Inc.-USA), foram utilizados para a imunomarcção de linfócitos e plasmócitos que expressam imunoglobulinas citoplasmáticas e ou de superfície da membrana celular (CASTRO, 1997; DAY 1993).

LINFÓCITOS T TOTAIS CD3+

Foi feito o uso do anticorpo policlonal CD3 (Dako Corporation, Carpinteria, cod. A0452, USA). Segundo Castro et al. (2004), Day (1993) e Ferrer et al., (1992) há reação cruzada desse anticorpo com os linfócitos T caninos podendo, portanto, ser empregado em cortes histológicos incluídos em parafina, para imunoistoquímica.

LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺

Foram empregados os anticorpos monoclonais, camundongo anti-humano, CD4, clone Hb12 (Novocastra cód. NCL CD4-368) e CD8, clone 1A5 (Novocastra cód. NCL CD8-295)

MACRÓFAGOS

Para Christgau et al. (1998), os macrófagos jovens em lesões inflamatórias mais agudas e de alta renovação celular são melhor evidenciados quando se utiliza o anticorpo monoclonal, camundongo anti-humano MAC387 (Dako Corporation, Carpinteria, cód M0747, USA). No entanto, os macrófagos envolvidos em inflamações crônicas são melhor demonstrados, quando se emprega o anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano CD68-clone PG-M1(Dako Corporation, Carpinteria, cód M0876, USA).

COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE CLASSE II (MHC II)

Utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR, cadeias α humano (clone TAL.1B5), (Dako Corporation cód MO746, Carpinteria, USA). Identificaram-se células inflamatórias que expressam MHC II, pois esse anticorpo apresenta reação cruzada com o MHC II canino (GERMAN et al., 1998).

4.8.3 Padronização da Técnica de Imunoistoquímica

Realizou-se, nos cortes histológicos, a técnica de imunoistoquímica, utilizando-se o método indireto de imunoperoxidase (CHRISTGAU et al., 1998; RABANAL; FERRER; ELSE; 1995, STETLER-STEVENSON; MEDEIROS; JAFFE, 1995). Antes do início de cada reação, as lâminas com os cortes colocadas em cuba de vidro foram mantidas em estufa a 37 °C por dezoito horas. Subseqüentemente, os cortes foram diafanizados em dois banhos de xilol de vinte minutos cada, posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e lavados em água corrente. Todos os anticorpos foram submetidos aos protocolos descritos a seguir, porém nos títulos serão citados somente os anticorpos que melhor se adequaram à técnica.

4.8.4 Técnica de Imunoistoquímica Empregada para os Anticorpos: IgG1, IgG2, CD3, Tal 1B5, Mac 387 e CD68

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena por incubação do material em solução de 8 % de água oxigenada a 30 volumes e álcool metílico, durante vinte minutos. Posteriormente, o material foi lavado em solução tamponada com fosfato (PBS), 0,01M (pH7,2) por cinco minutos, com três repetições. Na seqüência, realizou-se a recuperação antigênica, onde se empregou a panela de pressão como método e como tampão utilizou-se o

citrato 0,01M pH 6,0. Após o início da pressão, os tecidos foram mantidos por cinco minutos na panela, retirou-se a pressão e esperou-se o esfriamento do material por vinte minutos. Logo após, foram realizados três banhos de cinco minutos cada em solução tampão (PBS). Após essa etapa, os cortes foram incubados por dez minutos em solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum free-cód. X0909- Dako Corporation, Carpinteria, USA). Foi realizada a diluição dos anticorpos e cobriram-se os cortes com os anticorpos primários. Para a identificação de linfócitos B que expressam imunoglobulinas citoplasmáticas e ou de superfície de membrana celular, foram empregados anticorpos primários anti-IgG1 e anti-IgG2, nas diluições 1:3000 e 1:4000 respectivamente, com incubação dos tecidos por uma hora, em câmara úmida, em temperatura ambiente. Para a identificação de linfócitos T totais e macrófago utilizou-se o anticorpo policlonal CD3 e o MAC387 respectivamente, na diluição 1:100, com incubação de duas horas em câmara úmida, em temperatura ambiente. Para o anticorpo primário TAL1B5 e CD 68, empregou-se a diluição de 1:300 e 1:50 respectivamente, com posterior incubação dos tecidos em câmara úmida, por dezoito horas (“overnight”), à temperatura de 4 °C. Na seqüência realizaram-se três banhos com PBS (cinco minutos), depois foi feita a incubação por trinta minutos com o anticorpo secundário biotilado contra imunoglobulina de camundongo, coelho e cabra (Kit LSAB- -cód. K0690, Dako Corporation, Carpinteria, USA). Após três lavagens com PBS (cinco minutos), incubou-se o material por mais trinta minutos, com a solução estreptoavidina-peroxidase (Kit LSAB- -cód. K0690, Dako Corporation, Carpinteria, USA), finalizando-se o processo com mais três lavagens de cinco minutos cada, em PBS. Para a visualização e revelação da reação, utilizou-se o cromógeno Vector novared (cód. SK4800 Vector Laboratories). Segundo Suzuki et al. (2001), esse cromógeno pode ser empregado para a visualização do complexo antígeno anticorpo em bulbo ocular, com diferenciação do pigmento acastanhado da melanina. Em seguida, o material foi lavado em água corrente e passado em água destilada. Prosseguiu-se com a contracoloração em Hematoxilina de Harrys pura por um minuto, lavagem em água corrente e desidratação. Nesta última etapa, realizaram-se passagens rápidas, em álcool etílico 85°, 95° absoluto I e II, xilol I e II. Cobriram-se os cortes com resina sintética (ENTELLAN-MERCK) e lamínulas histológicas.

4.8.5 Técnica de Imunoistoquímica Empregada para os Anticorpos: CD79 α , CD4, CD8 e CD68

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena por incubação do material em uma solução de 8 % de água oxigenada a 30 volumes e álcool metílico, durante vinte minutos. Posteriormente o material foi lavado em solução tamponada com fosfato (PBS), 0,01M (pH7,2) por cinco minutos, com três repetições. Na sequência, realizou-se a recuperação antigênica onde se empregou a panela de pressão como método e, como tampão, utilizou-se Tris base-EDTA pH 9,0. Após o início da pressão, os tecidos foram mantidos por cinco minutos na panela, retirou-se a pressão e esperou-se o esfriamento do material por vinte minutos. Logo após realizaram-se três banhos de cinco minutos cada em solução tampão (PBS). Após essa etapa efetuou-se o bloqueio da avidina e da biotina (Biotin blocking system cód. X0590- Dako Corporation, Carpinteria, USA), conforme indicação do fabricante. Para obtermos a amplificação da reação, a partir dessa etapa, empregou-se o Kit “Catalyzed Signal Amplification (CSA) system peroxidase” (cód. K1500-Dako Corporation, Carpinteria, USA). Os cortes foram incubados por cinco minutos em solução bloqueadora de reação inespecífica. Foi realizada a diluição de 1: 300, 1:1000, 1:800 e 1: 500 para os anticorpos CD79 α , CD4, CD8 e CD68 respectivamente. Cobriram-se os cortes com os anticorpos primários, com posterior incubação dos tecidos em câmara úmida por dezoito horas (“overnight”), à temperatura de 4 °C. Na sequência, realizaram-se três banhos com PBS (dez minutos cada) e foi feita a incubação por quinze minutos com o anticorpo secundário biotinilado. Aplicou-se o complexo estreptavidina- biotina por quinze minutos. Logo após a incubação, realizou-se a amplificação da reação por quinze minutos. Na sequência foi realizada a incubação com a solução de estreptavidina peroxidase por mais 15 minutos. Entre uma etapa e outra realizaram-se três banhos em PBS, de cinco minutos cada. No decorrer de toda a reação, as incubações foram efetuadas em estufa a 37 °C. Realizou-se a revelação com o cromógeno a base de diaminobenzidina (DAB), incubando por trinta segundos (cód. K-3468- Dako Corporation, Carpinteria, USA). Em seguida, o material foi lavado em água corrente e passado em água destilada. Prosseguiu-se com a contracoloração, a desidratação e a montagem conforme a descrição anterior.

As soluções tampão empregadas na técnica de imunoistoquímica estão descritas no anexo A. As características e a descrição do emprego dos anticorpos primários estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1- Características e descrição do emprego dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica, para a imunofenotipagem do infiltrado mononuclear, em bulbo ocular de cães controle, experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* São Paulo, 2006

Anticorpo	Especificidade	Característica	Fonte	Diluição	Tempo de incubação	Método de detecção
CD3	CD3 humano	policlonal	Dako	1:100	2 horas	LSAB
CD79 α	CD79 Humano	monoclonal	Dako	1:300	“overnight”	CSA
IgG2	IgG2 canina	policlonal	Bethyl	1:4000	1 hora	LSAB
IgG1	IgG1 canina	policlonal	Bethyl	1:3000	1 hora	LSAB
TAL1B5	MHC II humano	monoclonal	Dako	1:300	“overnight”	LSAB
Mac387	M ϕ humano	monoclonal	Dako	1:100	2 horas	LSAB
CD4	CD4 humano	monoclonal	Novocastra	1:1000	“overnight”	CSA
CD8	CD8 humano	monoclonal	Novocastra	1:800	“overnight”	CSA
CD68	CD68 humano	monoclonal	Dako	1:50 1:20	“overnight”	LSAB

M ϕ - macrófago

4.9 CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO

Os linfonodos dos animais do G1 foram utilizados como controle positivo das reações de imunoistoquímica. Os linfonodos do grupo controle (GC) foram empregados como controle negativo da reação, nesses suprimiu-se o anticorpo primário. Os bulbos oculares do GC foram submetidos à mesma técnica de imunoistoquímica empregada nos bulbos oculares dos animais experimentalmente e naturalmente infectados.

4.10 MORFOMETRIA

Foram contados, na objetiva de 40x, o número total de células do infiltrado inflamatório e o número de células marcadas pela peroxidase, em três campos distintos de cada região do bulbo ocular (limbo, íris, corpo ciliar, ângulo iridocorneal, retina e coróide). Calculou-se a média do total de células imunomarcadas, como também a média total de células do infiltrado inflamatório de cada região. A percentagem do infiltrado celular imunomarcado foi calculada pela divisão da média de células imunomarcadas, pela média de células do infiltrado inflamatório, de cada região.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados finais correspondem à média da cada grupo acompanhada pelo respectivo desvio padrão. Os dados correspondentes ao eritrograma, trombograma e contagem de reticulócitos dos grupos de animais experimentalmente infectados (GC e G1) foram submetidos ao teste t-Student. Os dados de hemograma, trombograma e contagem de reticulócitos dos animais naturalmente infectados (G2 e G3) não foram submetidos à análise estática porque foram utilizados somente como critério para selecionarmos os animais com suspeita clínica de hemoparasitose, com o objetivo de formar o grupo G2 e G3, ou seja esses animais deveriam apresentar anemia normocítica normocrômica não regenerativa e trombocitopenia. Os dados referentes à contagem de células imunomarcadas positivamente foram submetidos ao teste paramétrico de análise de variância ANOVA-*one way* e ao teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, e aos correspondentes pós testes, de *Tukey-Kramer* e de *Dunn* para comparação múltipla de grupos e identificação das diferenças significantes. Utilizou-se o teste de *Pearson* ou a determinação do coeficiente de correlação de *Pearson* para analisar correlação entre vários parâmetros. Considerou-se estatisticamente significativo os valores de $P < 0,05$

5 RESULTADOS

5.1 ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS (HEMOGRAMA, SOROLOGIA E PCR) DOS ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE E NATURALMENTE INFECTADOS (G1, G2 E G3)

Os animais experimentalmente e naturalmente infectados (G1, G2 e G3) desenvolveram sinais clínicos compatíveis com hemoparasitose. Os achados clínicos observados foram : hiporexia, mucosas hipocoradas, emagrecimento, secreção ocular e nasal, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, e aumento da temperatura retal.

Nos animais do G1 observou-se mórulas do parasita a partir do 12º dia pós-inoculação experimental (PI)

A queda do número de plaquetas do G1 iniciou-se na primeira semana, mas mostrou-se diferença significativa com relação ao GC, da segunda até a quinta semana, com redução máxima na terceira semana e com tendência a elevar-se até a quinta semana (Tabela 2).

Observou-se uma queda do número de hemácias do G1 a partir da primeira semana PI, com diferença significativa em relação ao GC na terceira, quarta e quinta semanas PI. Os valores subiram na terceira semana mas retornou a cair na quarta semana, com redução máxima na quinta semana. Os níveis de hemoglobina e o volume globular tiveram o mesmo comportamento e com diferença significativa em relação ao GC da segunda semana até a quinta semana PI, a contagem de reticulócitos do G1 demonstrou ausência de regeneração. O eritrograma e a contagem de reticulócitos do G1 indicaram que esses animais desenvolveram anemia normocítica, normocrômica não regenerativa (Tabelas 3 e 4).

Quanto ao eritrograma, a contagem de plaquetas e reticulócitos, os cães do G2 e G3 também apresentavam anemia normocítica, normocrômica não regenerativa e trombocitopenia (Tabelas 5 e 6)

O teste dot-blot-Elisa, formado pelo "kit" Immunocomb® -BIOGAL demonstrou que todos os soros dos animais do G1, G2 e G3 apresentaram títulos para *E. canis*.

A reação de imunofluorescência indireta para *Babesia sp.* demonstrou-se negativa nos soros dos animais do G1 e G2 e positiva nos soros dos cães do G3.

A reação de soroaglutinação microscópica (SAM) para *Leptospira* sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* e a prova de ELISA indireta para *Toxoplasma gondii* mostraram-se negativas nos soros dos animais do G2 e G3.

A PCR mostrou-se positiva para *E.canis* nas amostras de sangue dos animais do G1, G2 e G3, no entanto um animal do G2 apresentou positividade na PCR em amostra de baço e negativa em amostra de sangue.

Nos cães do GC, não foram observadas alterações no hemograma e na contagem de plaquetas. Mostraram-se negativos nos exames sorológicos para *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.*, como também pela PCR para *E.canis*.

Os dados do eritrograma, trombograma e a contagem de reticulócitos de cada animal do GC, G1, G2 e G3 estão demonstrados nos apêndices A e B.

Tabela 2- Média e desvio padrão do trombograma dos animais infectados por *Ehrlichia canis* (G1) e do grupo controle (GC) obtidos antes da inoculação experimental e semanalmente, durante cinco semanas. São Paulo, 2006

Semanas n° de plaquetas x 10 ³ /μL	0	1	2	3	4	5
GC n=3	256,67 ± 74,01	318,50 ± 24,29	288,17 ± 48,29	331,33 ± 45,33	366,50 ± 71,26	341,83 ± 54,46
G1 n=4	343,00 ± 131,42	289,62 ± 26,83	41,25 ± 21,73 ^b	35,62 ± 11,02 ^b	58,00 ± 38,22 ^b	75,25 ± 75,34 ^a

^ap < 0,01 em relação ao grupo controle (teste t de Student)

^bp < 0,001 em relação ao grupo controle (teste t de Student)

n = número de animais

Tabela 3- Média e desvio padrão do eritrograma dos animais infectados por *Ehrlichia canis* (G1) e dos controles (GC) obtidos antes da inoculação experimental e semanalmente, durante cinco semanas. São Paulo, 2006

Semanas	0	1	2	3	4	5
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)						
GC n=3	5,90 $\pm$ 0,25	5,64 $\pm$ 0,31	5,36 $\pm$ 0,88	5,66 $\pm$ 0,77	5,93 $\pm$ 0,51	6,07 $\pm$ 0,28
G1n=4	6,13 $\pm$ 0,30	5,60 $\pm$ 0,23	4,18 $\pm$ 0,41	4,36 $\pm$ 0,27 ^a	3,90 $\pm$ 1,02 ^a	3,63 $\pm$ 0,39 ^b
Hb (g/dl)						
GC n=3	11,97 $\pm$ 0,38	11,63 $\pm$ 0,63	11,18 $\pm$ 1,75	11,85 $\pm$ 1,81	12,18 $\pm$ 1,11	12,40 $\pm$ 0,64
G1n=4	12,25 $\pm$ 0,57	11,35 $\pm$ 0,35	8,56 $\pm$ 0,56 ^a	8,70 $\pm$ 0,61 ^a	7,81 $\pm$ 2,12 ^a	7,12 $\pm$ 0,47 ^b
VG (%)						
GC n=3	36,93 $\pm$ 1,10	35,28 $\pm$ 1,65	34,30 $\pm$ 5,72	36,17 $\pm$ 5,53	38,00 $\pm$ 3,77	39,02 $\pm$ 2,26
G1n=4	37,90 $\pm$ 1,70	34,26 $\pm$ 1,27	25,60 $\pm$ 1,93 ^a	26,87 $\pm$ 2,17 ^a	24,50 $\pm$ 6,87 ^a	23,22 $\pm$ 1,75 ^b
VCM (fl)						
GC n=3	62,65 $\pm$ 0,83	62,9 $\pm$ 0,66	64,03 $\pm$ 0,38	63,78 $\pm$ 1,03	64,01 $\pm$ 0,94	64,21 $\pm$ 0,82
G1 n=4	61,78 $\pm$ 1,36	61,34 $\pm$ 1,73	61,31 $\pm$ 1,88	61,44 $\pm$ 1,73	62,44 $\pm$ 3,69	64,02 $\pm$ 3,23
CHCM(%)						
GC n=3	32,40 $\pm$ 0,14	32,91 $\pm$ 0,24	32,60 $\pm$ 0,51	32,73 $\pm$ 0,03	32,12 $\pm$ 0,31	31,79 $\pm$ 0,36
G1 n=4	32,32 $\pm$ 0,76	33,02 $\pm$ 0,44	33,45 $\pm$ 0,51	32,37 $\pm$ 0,83	31,89 $\pm$ 0,96	30,73 $\pm$ 0,43

Hb-Hemoglobina, VG=volume globular; VCM= volume corpuscular médio, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média, n= número de animais

^ap< 0,05 em relação ao grupo controle (teste t de Student)

^bp< 0,001 em relação ao grupo controle (teste t de Student)

Tabela 4- Média da contagem relativa de reticulócitos do grupo experimentalmente infectado por *Ehrlichia canis* (G1), obtida antes da inoculação e semanalmente, durante cinco semanas. São Paulo, 2006

Semanas	1	2	3	4	5
Reticulócitos (%)	*	0,3 $\pm$ 0,17	0,5 $\pm$ 0,20	0,9 $\pm$ 0,16	0,8 $\pm$ 0,40
G1 n= 4					

(*) parcela perdida, n= número de animais

Tabela 5-Média e desvio padrão do eritrograma dos cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G2) e por *Ehrlichia.canis* e *Babesia.sp.* (G3). São Paulo, 2006

Grupos	nºHemácias (x10 ⁶ /µl)	VG (%)	Hemoglobina (g/dl)	VCM (fl)	CHCM (%)
G2 n=4	2,8 ± 0,55	19,42 ± 3,21	5,9 ± 1,14	67,57±2,87	30,3±1,07
G3 n=5	4,07 ± 0,8	29,08 ± 6,8	9,14 ± 2,2	70,8±4,64	31,35±0,94

Tabela 6- Média e desvio padrão trombograma e da contagem relativa de reticulócitos dos cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G2) e por *Ehrlichia canis* e *Babesia.canis* (G3). São Paulo, 2006

Grupos	Plaqueta (x10 ³ /µL)	Reticulócito(%)
G2 n=4	66,0 ± 14,5	0,6 ± 0,09
G3 n=5	36,6 ± 34,6	0,7 ± 0,15

5.2 AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DOS CORTES DE TECIDO OCULAR CORADOS PELA HEMATOXILINA E EOSINA (H/E).

O infiltrado inflamatório dos cortes de tecido ocular dos cães do G1, G2 e G3 mostrou-se mais intenso nas regiões de corpo ciliar e ângulo iridocorneal, moderado nas regiões de limbo e íris e mínimo em coróide e retina (Tabela 7). As células mononucleares do infiltrado inflamatório infiltraram-se principalmente, na região perivascular. Os bulbos oculares dos cães do G3 apresentaram infiltração de células mononucleares mais intensa quando comparada com os tecidos oculares dos animais do G1 e G2.

5.3 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO OCULAR

Os percentuais de células imunomarcadas no infiltrado inflamatório nas diferentes regiões dos bulbos oculares para os anticorpos CD3, CD4, CD8, TAL 1B5 e MAC 387 não demonstraram diferenças significativas entre os grupos G1, G2 e G3, bem como, na análise realizada entre as diferentes regiões dentro do mesmo grupo. (Tabela 8) (Figura 2) (Apêndices C, D e E).

As diferenças entre as médias da contagem percentual de células mononucleares CD4⁺ e CD8⁺ constituintes do infiltrado inflamatório, presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos grupos G1, G2 e G3, não foram estatisticamente significativas. Contudo, pode-se observar diferenças significativas ($P < 0,001$) entre as médias da contagem percentual de células mononucleares CD8⁺ em relação as médias da contagem percentual de células mononucleares CD4⁺, nas diferentes regiões do bulbo ocular dos três grupos (Figuras 2 e 4) (Apêndices D, E e F)

Evidenciou-se no corpo ciliar, diferença significativa entre as médias da contagem percentual de células mononucleares imunomarcadas pelos anticorpos IgG2 e CD79 α do G3 em relação ao G1 ($P < 0,01$ e $P < 0,05$ respectivamente) (Figuras 2 e 3) (Apêndice D).

Observou-se na íris, diferença significativa entre as médias da contagem percentual de células mononucleares imunomarcadas pelo anticorpo IgG1 do G3 em relação ao G2 ($P < 0,05$) (Figura 2) (Apêndice D).

A análise de todas as imunomarcações, dentro do mesmo grupo nas diferentes regiões analisadas, demonstrou diferença significativa entre as células CD79 α ⁺ da região do limbo em relação as células CD79 α ⁺ da região da retina do G1 ($P < 0,01$) (Apêndice E).

Ao avaliar a média e o desvio padrão das células imunomarcadas pelos anticorpos empregados (tabela 8), verificou-se a presença de linfócitos T, com um predomínio na contagem de células imunomarcadas pelo anticorpo CD3 e percentuais variando entre 44,65% e 66,48% (Figuras 9, 10, 11 e 12). A contagem de células imunomarcadas pelo anticorpo CD8 demonstrou percentuais entre 34,48% a 47,23% (Figuras 13 e 14) e pelo anticorpo CD4 entre 10,93% e 19,63%. (Figuras 15 e 16). Houve, ainda, um predomínio de células apresentadoras

de antígenos, por meio da imunomarcção pelo anticorpo TAL 1B5 (Figura 17). Ao se avaliar a presença de linfócitos B no infiltrado inflamatório das regiões analisadas, empregando-se o anticorpo CD79 α , constatou-se percentuais variando entre 5,33% a 21,89% de células imunomarcadas (Figura 18). A quantidade de células que expressam IgG2 correspondeu à população de linfócitos B CD79 α ⁺, nas mesmas regiões analisadas (Figura 19). Observou-se pouca imunomarcção de células que expressam IgG1 nos bulbos oculares dos animais estudados (Figura 20). A contagem imunofenotípica de macrófagos demonstrou ausência de células MAC 387. Não obtivemos reatividade em tecido de cão, com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano CD68-clone PG-M1(Dako Corporation, Carpinteria, cód M0876, USA).

Realizando-se a análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8, evidenciou-se a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados nas regiões do ângulo iridocorneal no G1, região do ângulo iridocorneal, corpo ciliar e limbo no G2 e região do ângulo iridocorneal, coróide, retina e corpo ciliar no G3. (Figuras 5 e 6) (Apêndice G).

Utilizando-se da análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2, evidenciou-se a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados nas regiões de ângulo iridocorneal, coróide, corpo ciliar e íris no G1, na região da íris no G2 e na região da coróide e íris no G3 (Figuras 7 e 8) (Apêndice H).

A figura 2 demonstra as médias e os desvios padrões das contagens percentuais das células mononucleares positivas para todas as imunomarcções realizadas nos constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3.

Tabela 7 - Intensidade do infiltrado inflamatório: mínimo (+), moderado (++) e intenso (+++), dos bulbos oculares de cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G1 e G2) e de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (G3), avaliados pela coloração de hematoxilina e eosina. São Paulo, 2006

Animais	Limbo	Íris	Corpo ciliar	Angulo iridocorneal	Retina	Coróide
Grupo1						
PA1	++	++	++	++	+	+
PA2	+	+	++	+++	+	+
PA3	+	+	+	++	+	+
PA4	++	+	++	+++	+	+
Grupo2						
1	+	+	++	++	+	+
2	++	+	+	+	+	+
3	++	++	++	+++	+	+
4	+	+	++	++	+	+
Grupo3						
A	+	+	++	++	+	+
B	++	++	++	+++	+	+
C	+++	++	++	+++	+	+
D	++	++	++	++	+	+
E	+	+	++	++	+	+

Tabela 8- Média e desvio padrão da contagem percentual imunofenotípica do infiltrado inflamatório mononuclear, em bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* São Paulo, 2006

REGIÕES								
Acs	Grupos (G)	Âng.Irid.	Coroide	Corpo ciliar	Retina	Iris	Limbo	Média de todas as regiões
CD3	1	53,48±9,10	55,93±5,37	50,05±8,57	57,75±7,02	60,95±7,06	55,80±9,92	55,66±3,70
	2	60,13±10,32	55,30±8,54	63,38±13,64	44,65±6,02	56,55±9,82	66,48±15,07	57,75±7,65
	3	59,96±5,42	65,52±7,70	63,00±7,02	56,30±5,44	57,86±3,40	62,70±4,35	60,89±3,47
CD8	1	44,28±8,61	40,60±9,16	39,03±2,63	42,80±7,61	43,68±2,79	40,43±6,57	41,80±2,08
	2	44,53±10,40	41,83±8,22	43,65±9,64	34,48±5,24	37,80±4,94	46,35±10,15	41,44±4,48
	3	47,28±4,17	46,52±3,18	46,54±5,74	41,80±5,05	43,16±1,96	46,20±1,26	45,25±2,22
CD4	1	11,78±3,11	15,63±4,12	15,18±4,71	15,08±4,70	14,95±3,43	16,15±4,98	14,79±1,54
	2	14,98±2,68	14,18±4,72	18,30±3,94	10,93±2,13	17,95±7,27	19,63±4,29	15,99±3,23
	3	12,86±3,67	17,62±5,56	16,26±2,80	13,96±2,18	14,12±2,64	15,80±4,27	15,10±1,76
CD79α	1	11,50±4,04	6,80±4,47	9,68±3,40	7,03±0,74 ^d	8,18±3,63	16,78±2,13	9,99±3,76
	2	18,30±8,88	12,93±5,31	12,65±2,83	8,33±5,91	13,18±6,75	14,38±11,01	13,29±3,21
	3	12,45±8,28	17,48±7,89	16,56±2,36 ^a	10,30±4,80	15,62±8,72	21,89±5,01	15,71±4,05
IgG2	1	8,83±3,86	5,08±3,60	6,90±3,57	2,80±1,94	6,53±2,94	14,45±2,76	7,43±3,98
	2	13,83±6,68	9,43±5,15	12,63±1,89	7,78±4,58	11,85±8,00	13,98±7,44	11,58±2,49
	3	9,48±4,56	16,78±7,34	15,65±3,33 ^b	7,04±5,23	14,18±6,91	14,60±2,73	12,95±3,82
IgG1	1	2,40±1,43	1,30±1,56	2,23±0,71	0,60±0,70	1,83±0,85	2,28±1,50	1,77±0,70
	2	1,08±1,24	0,30±0,60	0,58±1,15	1,28±1,89	0,30±0,60	1,85±1,61	0,9±0,62
	3	1,34±0,92	0,00±0,00	2,40±1,44	1,00±0,96	2,18±0,58 ^c	2,22±1,37	1,52±0,93
TAL1B5	1	66,30±3,56	35,83±27,34	62,05±26,46	50,65±12,20	66,80±6,43	43,70±22,92	54,22±12,86
	2	45,05±30,82	18,35±10,84	60,10±24,06	61,63±28,70	63,38±23,64	47,50±19,70	49,33±17,01
	3	52,98±14,06	39,10±13,53	60,30±20,22	54,24±25,20	56,04±25,57	70,36±16,19	55,50±10,21
Mac387	1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

^ap< 0,05 em relação ao G1 (teste de Dunn)

^bp< 0,01 em relação ao G1 (teste de Dunn)

^cp< 0,05 em relação ao G2 (teste de Dunn)

^dp< 0,01 em relação ao limbo do G1 (teste de Dunn)

G1 n=4; G2 n=4; G3 n=5 (n= números de animais)

Acs- anticorpos

Figura 2 – Contagem percentual de células mononucleares positivas para todas as imunomarcações realizadas nos constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do globo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.*: * diferença significativa em relação à G1, $P < 0.05$; ° diferença significativa em relação à G1, $P < 0.01$; ° diferença significativa em relação à G2, $P < 0.05$

Figura 3 – Contagem percentual de células mononucleares IgG2+ e CD79α+ constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G1 e G2) e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.*(G3) *Diferença significativa em relação ao G1 $P < 0,05$, •Diferença significativa em relação ao G1 $P < 0,01$

Figura 4 – Contagem percentual de células mononucleares CD4+ e CD8+ constituintes do infiltrado inflamatório presente em diversas regiões do bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G1 e G2) e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.*(G3) As diferenças entre as médias não foram estatisticamente significativas $P > 0,05$ * diferença significativa em relação ao CD4 $P < 0,001$

A- Região do ângulo iridocorneal - G1- $r = 0,9706$ e $P < 0,01$

B- Região do ângulo iridocorneal - G2: $r = 0,9965$ e $P < 0,01$

C-Região do ângulo iridocorneal - G3: $r = 0,8918$ e $P < 0,05$

D- Região da coróide - G3: $r = 0,8896$ e $P < 0,05$

Figura 5 – Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões A, B, C e D do bulbo ocular de cães experimentalmente e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G1 e G2) e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (G3). As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados

E- Região do corpo ciliar - G2: $r = 0,97$ e $P < 0,05$

F- Região da retina - G3: $r = 0,8837$ e $P < 0,05$

G- Região do corpo ciliar - G3: $r = 0,9373$ e $P < 0,05$

H- Região do limbo - G2: $r = 0,9692$ e $P < 0,05$

Figura 6 – Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões E, F, G e H do bulbo ocular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G2) e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp* (G3). As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados

A– Região do ângulo iridocorneal– grupo G1: $r = 0.9943$ e $P < 0.01$

B- Região da coróide. – grupo G3: $r = 0.9663$ e $P < 0.01$

C – Região da coróide– grupo G1: $r = 0.9912$ e $P < 0.01$

D- Região do corpo ciliar– grupo G1: $r = 0.9745$ e $P < 0.05$

Figura 7 – Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões A, B, C e D do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G1) e de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (G3) As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados

E-- Região da íris- grupo G1: $r = 0.9633$ e $P < 0.05$

F-- Região da íris- grupo G3: $r = 0.9897$ e $P < 0.01$

G --Região da íris- grupo G2: $r = 0.9675$ e $P < 0.05$.

Figura 8 – Análises de correlação entre percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2 constituintes do infiltrado inflamatório presente nas regiões E, F e G do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis* (G1) e de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e/ou *Babesia sp.* (G2 e G3) As análises indicaram a existência de correlação linear entre os parâmetros analisados

Figura 9 - Fotomicrografia de bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em ângulo iridocorneal, células do infiltrado mononuclear CD3⁺ (obj.20x-imunoperoxidase)

Figura 10 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em retina, células do infiltrado mononuclear CD3⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 11 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em coróide, células do infiltrado mononuclear CD3⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 12 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães, experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em retina, células do infiltrado mononuclear CD3⁺ (obj.20x-imunoperoxidase)

Figura 13 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em ângulo iridocorneal, células do infiltrado mononuclear CD8⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 14 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em coróide, células do infiltrado mononuclear CD8⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura - 9

Figura - 10

Figura - 11

Figura - 12

Figura -13

Figura -14

Figura 15 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em íris, células do infiltrado mononuclear CD4⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 16 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em corpo ciliar, células do infiltrado mononuclear CD4⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 17 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em retina, expressão de moléculas do MHC-classe II, em células do infiltrado mononuclear (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 18 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em íris, células do infiltrado mononuclear CD79α⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 19 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em ângulo iridocorneal, células do infiltrado mononuclear IgG2⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura 20 - Fotomicrografia do bulbo ocular de cães experimentalmente infectados por *E. canis*, no trigésimo dia pós-inoculação, apresentando em corpo ciliar, células do infiltrado mononuclear IgG1⁺ (obj.40x-imunoperoxidase)

Figura - 15

Figura - 16

Figura - 17

Figura - 18

Figura - 19

Figura - 20

6 DISCUSSÃO

O estudo das doenças parasitárias e sua relação com o hospedeiro têm-se intensificado nos últimos anos. Devido à interferência do homem nos diversos ecossistemas do planeta, ocorre um desequilíbrio ecológico, conseqüentemente têm emergido novas doenças infecciosas. A erliquiose canina tem sido amplamente estudada, principalmente no Brasil onde ocorre grande quantidade de doenças veiculadas por carrapatos. O entendimento da patogenia da doença é fundamental para a prevenção e o estabelecimento de um tratamento adequado. A infecção experimental em cães, por *Ehrlichia canis*, poderia ser empregada como modelo experimental para o estudo da erliquiose monocítica humana. Essa doença é considerada zoonótica, porém, ainda são necessários estudos verticalizados para comprovar seu verdadeiro potencial zoonótico (COHN, 2003; PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996). São escassas as informações sobre a interação parasita versus hospedeiro nas diferentes cepas de *Ehrlichia canis*. Essa relação deve ter papel fundamental no grau de patogenicidade e intensidade de lesão em nível de bulbos oculares. Os componentes da resposta imune no bulbo ocular de animais com uveíte, devido à erliquiose canina, e em infecções concomitantes com a babesiose canina, constituem-se em grande lacuna no contexto dessas entidades nosológicas.

A finalidade desse estudo é colaborar na elucidação de alguns aspectos da imunopatogenia da infecção experimental e natural por *E. canis* e em infecção concomitante com *Babesia sp.*, no que diz respeito à uveíte observada durante o curso da doença, ou seja, elucidar alguns aspectos da resposta imune celular e humoral frente à infecção. Apesar de existirem inúmeras pesquisas sobre a patogenia da erliquiose canina, ainda é uma doença que necessita estudos adicionais. Dar continuidade às investigações em torno da resposta humoral e celular do hospedeiro frente à infecção, é inexoravelmente importante, já que se cogita que as alterações observadas na doença sejam decorrentes de uma resposta imune exacerbada do hospedeiro frente ao parasita, porém de forma inefetiva, com conseqüentes danos aos próprios tecidos do animal.

Ter o entendimento dos mecanismos imunes determinando os fatores envolvidos em cada fase da doença e sua relação com as alterações observadas no bulbo ocular. Têm-se poucas evidências do desequilíbrio do sistema imune causada pelo parasita e a importância destas alterações no curso da doença, principalmente no que diz respeito às alterações oftalmológicas. Escassos são os estudos que correlacionam o efeito do agente com as

alterações imunológicas encontradas no bulbo ocular durante o curso da doença. O entendimento dos fatores envolvidos em cada fase desta riquetsiose serviria de base para a eleição de procedimentos terapêuticos apropriados

Quanto ao grupo experimentalmente infectado (G1), o método de infecção e o inoculo utilizado por Buhles, Jr, Huxsoll e Ristic (1974) e reproduzido por Castro et al. (2004) e Castro (2004), mostrou-se adequado a este trabalho. Fizeram parte deste estudo, cães da raça Pastor Alemão, relatado por Davoust et al. (1990) e Hibler e Greene (1986) como sendo a raça mais suscetível. Harrus, Hylton e Waner (1997b) evidenciaram que a resposta imune celular contra *E. canis* é menos intensa no Pastor Alemão que no Beagle, não havendo diferenças significativas na resposta imune humoral entre as duas raças. Esses achados sugerem que a resposta imune celular poderia ser o principal componente de proteção contra o parasita sendo que a resposta imune humoral não teria um papel importante na proteção, mas contribuiria para a patogenia da doença. Portanto, a caracterização imunofenotípica do infiltrado inflamatório tem grande utilidade para o entendimento do mecanismo imune celular que, segundo os autores, é responsável pela proteção do hospedeiro contra o parasita.

A inflamação ocular é problemática, visto que interfere temporariamente ou definitivamente na visão. Como foi citado anteriormente, parece ser primordial compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune celular, através da imunofenotipagem do infiltrado inflamatório presente na úvea.

A cepa empregada na infecção experimental é proveniente de isolamento e identificação por Machado (1993)¹ e, posteriormente, catalogada no Genbank, apresentando 94% de identidade com a cepa Kagoshima (AF 536827- GenBank identification) (SOUZA et al., 2004), portanto, adequada para ser utilizada em estudo da patogenia da uveíte.

Todos os animais do G1, G2 e G3 apresentaram sintomatologia compatível de hemoparasitose, sinais inespecíficos tais como febre, mucosas hipocoradas, descarga óculonasal, depressão, perda de peso, linfadenomegalia e esplenomegalia (GILBERT; CLEREX; HENROTEAUX, 1992; WADDLE; LITTMAN 1988; WOODY; HOSKINS, 1991). Apenas dois animais do G1 apresentaram hepatomegalia, iniciando-se no décimo terceiro dia PI. Castro (1997), ao reproduzir experimentalmente a fase aguda da erliquiose, obteve achados semelhantes. A hepatomegalia foi uma manifestação infreqüente nos animais do presente estudo, achado corroborado por Hibler e Greene (1986).

¹ Machado, R. Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP-Jaboticabal)

Coincidindo com a pirexia, foram detectadas mórulas da parasita em mononucleares do sangue periférico dos animais do G1 a partir do décimo segundo dia PI, estando de acordo com Castro et al. (2004) e Storz (1990).

As mórulas intracitoplasmáticas de *E.canis* em monócitos de sangue periférico são geralmente encontradas na fase aguda da doença. A observação de mórulas nos esfregaços sanguíneos dos animais do G1 foi infreqüente, estando em concordância com Davoust et al. (1990) e Gilbert, Clerex e Henroteaux (1992) ao relatarem que a sensibilidade do diagnóstico citológico é baixa pois a porcentagem de mononucleares parasitados é inferior a 1%. Como a observação de mórulas no sangue periférico é um achado infreqüente, utilizamos os sinais clínicos e outros parâmetros laboratoriais para a identificação e composição dos grupos de animais naturalmente infectados (G2 e G3).

Os cães do G1 apresentaram anemia normocítica, normocrômica (HARRUS et al., 1998b; MICHELS et al., 1995; THIRUNAVUKKARASU et al., 1994). A média percentual relativa e absoluta de reticulócitos dos animais do G1 mostrou-se sem indícios de regeneração. A maior parte dos autores citou a anemia como sendo não regenerativa (BEAUFILS, 2000; HARRUS et al., 1996b; HIBLER; GREENE, 1986; TROY; FORRESTER, 1990; WOODY; HOSKINS et al., 1991). Waddle e Litman (1988) realizaram contagem de reticulócitos em vinte cães anêmicos com diagnóstico de erliquiose de ocorrência natural e evidenciaram ausência de regeneração em doze animais (60%) porém oito cães (40%) apresentaram reticulocitose. Apesar de existirem casos de anemia regenerativa como foi descrito, nos animais do G1 não se evidenciou reticulocitose, ou seja, houve ausência de regeneração em 100 % dos casos, fato também relatado pela maior parte dos autores. (BEAUFILS, 2000; HARRUS et al., 1996b; HIBLER; GREENE, 1986; TROY; FORRESTER, 1990; WOODY; HOSKINS, 1991). A anemia foi um achado hematológico freqüente, pois foi uma alteração observada nos eritrogramas de todos os cães do G1. Este dado coincide com as observações de Kuehn e Gaunt (1985). Acredita-se que a anemia ocorra devido ao aumento de consumo e do seqüestro de hemácias pelo sistema mononuclear fagocitário (SILVA, 2001; STILES, 2000) e durante a fase crônica, secundária à hipoplasia medular (WOODY; HOSKINS, 1991).

Greene (1995) relatou que o teste de Coomb's é geralmente positivo, propondo que a anemia poderia se desenvolver devido ao revestimento de globulinas não específicas nas células vermelhas ou por uma resposta imune específica aos antígenos situados na superfície das hemácias.

A possível formação de anticorpos anti-eritrocitários é também considerada por Gilbert, Clerex e Henroteaux (1992). Portanto, a anemia poderia ser classificada como sendo hemolítica imunemediada, já que a *E.canis*, por algum mecanismo, promove a produção de anticorpos anti-hemácias, estimulação do sistema mononuclear fagocitário, seqüestro de hemácias pelo baço e conseqüente hemólise extravascular.

Todos os animais do G1 desenvolveram trombocitopenia marcante, ou seja 100 % dos casos, tendo sido relatado por Beaufile, Granel e Jumelle (1995) como a alteração mais freqüentemente observada. Ainda Davoust et al. (1991) afirmam que a trombocitopenia não é achado patognomônico da erliquiose canina mas dentro de um contexto epidemiológico evocador, a contagem plaquetária é um teste diagnóstico de boa qualidade, com sensibilidade e especificidade superior a 85%. Várias teorias sobre a patogenia da trombocitopenia durante a fase aguda da erliquiose, são propostas. Segundo Harrus, Hylton e Waner (1997), diversos mecanismos estão envolvidos. Têm-se aumento do seqüestro e destruição de plaquetas pelo baço por macrófagos, presença de um fator inibidor de migração plaquetária, formação de anticorpos antiplaquetas e aumento do consumo de plaquetas devido à vasculite. Adicionalmente, Silva (2001) constatou alterações mielodisplásicas em megacariócitos de medula óssea de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*, sendo outro fator que contribuiria com a trombocitopenia freqüentemente observada.

Ao compararmos os parâmetros clínico e laboratorial dos animais do G1 e confrontando-os com os dados de literatura a fim de selecionarmos os animais com infecção natural do G2 e G3, utilizamos os seguintes critérios: os animais apresentaram infestação por carrapatos, uveíte, sintomatologia compatível com hemoparasitose, desenvolveram anemia normocítica, normocrômica não regenerativa e trombocitopenia

A resposta imune de cães em infecção por *E.canis* é caracterizada pela produção de anticorpos da classe IgM e IgG, detectados na reação de imunofluorescência direta (HOSKINS, 1991; TROY; FORRESTER, 1990). Os métodos sorológicos utilizados apresentaram-se adequados. O teste de "dot-blot-Elisa" (Immunocomb®- BIOGAL) demonstrou-se positivo para *E. canis* nos animais do G1, G2 e G3 e negativo nos cães do GC. Alguns estudos utilizam a reação de imunofluorescência (RIFI) como método de diagnóstico (DAVOUST et al., 1996; HARRUS et al., 1996a; HARRUS et al., 1998b). A RIFI é realizada por meio de células DH82 infectadas por *E. canis*, conforme descrito por Harrus et al. (1996b). Para Woody e Hoskin (1991) é um teste sensível e específico. No entanto Andereg e Passos (1999) e Cadman et al. (1994) reportaram a técnica de "dot-blot-Elisa" como sendo outra opção de diagnóstico tão sensível e específica quanto a RIFI. Esta mesma técnica

demonstrou-se adequada em estudos realizados por Castro (1997), Castro et al. (2004) e Castro (2004), Oriá (2001) e Silva (2001). Em estudo experimental, Waner, Strenger e Keysary (2000) constataram correlação entre os dois testes e a mesma sensibilidade para a detecção de anticorpos IgG para *E. canis*.

Deve-se evidenciar a possibilidade de infecção associada de *Ehrlichia. canis* com *Babesia sp.* (SEARCY, 1998; WOODY; HOSKINS, 1991). Como pode se depreender a RIFI mostrou-se negativa para *Babesia sp.* em todos os cães do G1, G2 e GC, porém positiva para os cães do G3. Como a co-infecção por esses parasitas é muito comum, estabeleceu-se a formação de um grupo de ocorrência natural apenas com *E. canis* (G2) e outro grupo com *E. canis* e *Babesia sp.* (G3) para efeito de comparação. Encontrou-se grande dificuldade para se constituir o grupo de cães naturalmente infectados por apenas *E. canis*, visto que grande parte dos animais geralmente apresentaram infecções concomitantes; fato esse também observado por Harrus et al. (2001b) que, ao avaliarem a resposta de IgG1 e IgG2 em soros de cães naturalmente e experimentalmente infectados, constituíram um grupo de animais naturalmente infectados por mais de um patógeno.

A reação de soroprecipitação microscópica (SAM) para *Leptospira* sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* e a prova de ELISA indireta para *Toxoplasma gondii* mostraram-se negativas nos soros dos animais do G2 e G3 descartando a possibilidade de infecção desses agentes nos cães de ocorrência natural.

Para a confirmação definitiva do diagnóstico utilizou-se a PCR que se mostrou positiva para *E. canis* nas amostras de sangue dos animais do G1, G2 e G3 e negativa nos cães do GC (MURPHY et al., 1998; WEN et al., 1997). Um animal do G2 apresentou positividade no teste em amostra de baço e não de sangue podendo sugerir que esse se apresentava na fase crônica da infecção (HARRUS et al., 1998d).

A imunologia é uma ciência que estuda o mecanismo que o organismo possui de montar uma resposta de defesa, eficiente ou não, contra as diversas formas de agressões endógenas e/ou exógenas, como as invasões microbianas, de células cancerígenas e de substâncias tóxicas. O fulcro de nosso estudo é o de abranger os mecanismos envolvidos nas invasões por microrganismo intracelulares.

São diversos os estudos que procuram elucidar a imunopatogenia da erliquiose, contudo grande parte é utilizada em pesquisas com a *E. chaffeensis* e a *E. risticii*. Apenas alguns trabalhos empregam a *E. canis* como modelo experimental. Considerando-se que essas espécies fazem parte da mesma família, pequenas devem ser as diferenças quanto aos fenômenos imunes envolvidos.

Os mecanismos de defesa que o organismo desenvolve contra os diversos parasitas intracelulares e os meios que esses desenvolvem para se evadir do sistema imune do hospedeiro são similares (TIZARD, 2002). Os animais pertencentes ao G3, que apresentam co-infecção de *E.canis* e *Babesia.sp*, provavelmente induzem fenômenos imunológicos muito parecidos no hospedeiro (BOOZER; MACINTIRE, 2003; HOMER et al., 2000). O presente estudo demonstrou poucas diferenças significativas na análise imunofenotípica entre os G1, G2 e G3, portanto durante a discussão serão enfatizados principalmente os aspectos imunológicos da infecção por *E.canis*.

Alguns conceitos básicos de imunologia são importantes de serem lembrados antes de iniciarmos a discussão dos resultados obtidos da imunofenotipagem.

Durante o processo inflamatório ocorre a polarização de clones de linfócitos T auxiliares, em Th1 e Th2. As células Th1 são consideradas pró-inflamatórias e secretam IL-12, IL-2 e IFN- γ , que aumentam a eficiência da fagocitose e dos linfócitos citotóxicos. Geralmente, as células Th1 são estimuladas na presença de antígenos intracelulares tais como vírus e bactérias fagocitadas. A resposta mediada por células Th2, que secretam IL-4, IL-10 e IL-6 ocorre como resposta a infestações por helmintos e alérgenos ambientais, resultando na produção de IgG e IgE pelos linfócitos B, ativação de eosinófilos, e supressão da ativação de macrófago (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2002; TIZARD, 2002). As citocinas do grupo Th1 determinam predominantemente uma resposta do tipo celular e as do grupo Th2 uma resposta humoral (ROGERS et al., 2002). A partir dessas informações, durante o curso da doença suspeita-se que a resposta imune-celular de defesa do hospedeiro contra a *E. canis*, provavelmente seja Th1, por ser um microorganismo intracelular obrigatório e por induzir uma resposta predominantemente celular.

A relação hospedeiro e parasita torna-se fundamental para estabelecer qual será o tipo de resposta imunológica. No caso das bactérias intracelulares, estas necessitam de fatores complexos de evasão do sistema imune e de alguma forma penetrarem na célula hospedeira sem serem reconhecidas como estranhas pelo sistema de defesa. Os microorganismos transmitidos por carrapato desenvolveram mecanismos eficientes para que no momento do repasto sanguíneo possam ser transmitidos para o hospedeiro e se esquivarem do sistema imune para, dessa forma, penetrarem na célula alvo que no caso da *E. canis* são as células mononucleares e que no caso da *Babesia sp* são as hemácias. A imunidade adquirida contra a picada do carrapato é ainda pouco compreendida. Durante o repasto sanguíneo ocorre o estímulo de mecanismos regulatórios e efetores envolvendo a produção de anticorpos, citocinas, ativação do complemento, células apresentadoras de antígenos e linfócitos.

Pesquisadores avaliaram a resposta imune celular a sucessivas infestações de carrapato em hospedeiro suscetíveis (cães e camundongos) e hospedeiros resistentes (porquinho da índia). Evidenciou-se no grupo suscetível redução da habilidade de resposta aos antígenos. Ocorre diminuição da secreção de IL-2, com conseqüente redução da resposta de células T-auxiliares (CD4⁺), diminuição da hipersensibilidade do tipo tardia, resposta citotóxica de linfócitos T reduzida, alteração na produção de anticorpos e da migração celular no local da picada. Porém, a resistência observada no porquinho da índia é dada pelas células T (FERREIRA et al., 2003). Camundongos reinfestados por carrapatos induzem resposta com produção de citocinas do tipo Th2, com aumento da produção de IL-4, IL-10 e TGF- β . (GANAPAMO; RUTTI; BROSSARD, 1996). Além dos fatores citados anteriormente, a saliva do carrapato também poderia contribuir com a infecção porque promove vasodilatação, tem ação antiinflamatória, imunossupressora e antihemostática (FERREIRA; SILVA, 1999). A saliva do vetor poderia exacerbar e, de certa forma, beneficiar a infecção em hospedeiros mamíferos. Estudos recentes demonstram que a saliva do vetor poderia apresentar propriedades imunomoduladoras e influenciaria na resposta imune e na polarização da resposta T. Por exemplo, a saliva induz a produção de IL-4, sendo um importante fator para progressão da doença em camundongos infectados por *Leishmania major*. A saliva também promove a regulação da produção de prostaglandina E2 (PGE2), IL-10 e IL-6 que inibem a ativação de macrófago tornando o hospedeiro suscetível à infecção (ROGERS et al., 2002). A saliva inibe, *in vitro*, a produção de IL-2, a proliferação de linfócitos e a ação de macrófago em destruir agentes intracelulares, adicionalmente estimulam a produção de IL-10 e diminui a produção e IFN- γ em camundongos normais (FERREIRA; SILVA, 1998). No estudo de Ferreira e Silva (1999) observou-se que a saliva reduz a produção de IL-12 e aumenta os níveis de TGF- β em camundongos normais. Demonstrou-se que camundongos infectados por carrapatos desenvolveram resposta do tipo Th2, com aumento da IL-4, IL-10 e TGF- β e redução da síntese de IL-2, IFN- γ e IL-12.

Os animais naturalmente infectados, pertencentes ao G2 e G3, adquiriram a infecção através da picada do carrapato, portanto, os mecanismos imunes que se sucederam após a invasão do patógeno no hospedeiro poderiam, em parte, ser explicadas através dos trabalhos citados anteriormente.

Os animais experimentalmente infectados via parenteral, pertencentes ao G1 adquiriram a infecção. A saliva do carrapato não interferiu no desenvolvimento da infecção,

fato esse constatado pela presença de mórulas em células mononucleares. Assim sendo, parece lícito que o agente desenvolveu estratégias de escape do sistema imune do hospedeiro, as quais provavelmente mimetizam os mecanismos citados nos casos de infecção natural. Os microrganismos intracelulares promovem uma resposta imunossupressora no organismo do hospedeiro. Antes de penetrarem nas células alvo, durante a fase livre no meio extracelular, induzem a polarização da resposta em Th2 que, interferem na fagocitose impedindo sua degradação por macrófagos e inativam as células mononucleares. Outros fatores poderiam potencializar a resposta imunossupressora tornando os cães do G1 e G3 mais propensos ao desenvolvimento da doença. Assim, os animais do G3 apresentavam co-infecções e os cães do G1 da raça pastor alemão que sabidamente possuem deficiência na resposta mediada por células.

O bulbo ocular apresenta algumas propriedades imunes peculiares que o torna um órgão imunoprevilegiado. Sendo um órgão extremamente delicado, sensível e primordial, a resposta imunológica deve ser controlada e de baixa intensidade pois contrariamente acarretaria lesões irreversíveis, com destruição do órgão e perda da visão. Apesar de o bulbo ocular apresentar características de imunoprivilégio é um sítio muito comum de desenvolvimento de processo inflamatório sendo a uveíte o processo patológico mais comumente encontrado.

Nos livros textos, a uveíte anterior é discutida separadamente da uveíte posterior, porém, devido à proximidade anatômica, geralmente as duas estruturas são atingidas durante um processo inflamatório (COLLINS; MOORE, 1991). No presente estudo os animais apresentaram uveíte anterior e posterior. Como a úvea é altamente vascularizada e imunossensível, doenças oculares inflamatórias são muito comuns em doenças sistêmicas (COLLINS; MOORE, 1991; PEAKMAN; VERGAN, 1999), portanto podem também se desenvolver na erliquiose monocítica canina. O bulbo ocular é propenso ao desenvolvimento de doença mediada pelo sistema imune (BISTNER, 1994). Células imunocompetentes podem migrar de linfonodos regionais para a úvea e desenvolver qualquer tipo de inflamação imunológica imunomediada (BISTNER, 1994). Durante o processo inflamatório das doenças sistêmicas, diversos mecanismos favorecem o desenvolvimento da uveíte. O aumento da permeabilidade vascular que acompanha o processo inflamatório promove o escape de fluidos, proteínas plasmáticas e componentes celulares. O ácido araquidônico possui papel importante na inflamação ocular, e é liberado durante a lesão de membranas celulares. A prostaglandina tem sido um mediador muito estudado nas inflamações oculares e causa miose,

hiperemia, mudanças na permeabilidade vascular e alteração na pressão intra-ocular. Ela também rompe a junção entre as células do epitélio não pigmentado do corpo ciliar. Os leucotrienos são substâncias altamente vasoativas e possuem efeitos similares às prostaglandinas, porém o seu efeito no bulbo ocular tem sido pouco estudado. Acredita-se que a sua atividade de quimiotaxia, celular e humoral é maior que a prostaglandina, sendo uns dos mecanismos de migração celular na uveíte (COLLINS; MOORE, 1991).

Uma das lesões freqüentemente encontrada na erliquiose monocítica canina é a presença de infiltrado mononuclear inflamatório em diversos órgãos e tecidos, como fígado, rins, pulmões e SNC, durante a fase aguda e crônica da doença (CASTRO et al., 2004; CASTRO, 2004; HILDEBRANT et al., 1973; ORIÁ, 2001; REARDON; PIERCE, 1981a; SILVA, 2000). Martin, Caspersen e Dumler. (2001) sugerem que as lesões hisptopatológicas encontradas não são resultantes da ação direta mediada pelo agente mas sim por mecanismos imunopatológicos iniciados pelo mesmo. Conforme os outros órgãos, ao avaliarmos histologicamente os bulbos oculares dos cães do G1, G2 e G3, observamos infiltrado predominantemente mononuclear em limbo, corpo ciliar, ângulo iridocorneal, íris, coróide e retina, evidenciado também em estudos realizados por Ellet, Playter e Pierce (1973), Oriá (2001). Panciera, Ewing e Confer (2001) ao infectarem cães com *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e o agente da erliquiose granulocítica humana (HGE). Constataram-se as mesmas lesões oculares e meningite nos animais inoculados apenas por *E. canis*. Nas doenças sistêmicas ocorrem modificações das características de imunoprivilégio do bulbo ocular. Newell (1996) cita que, após uma injúria inflamatória, as barreiras oculares se rompem e permitem a penetração de grandes moléculas no bulbo ocular. Quando estão íntegras, apenas íons e solutos conseguem penetrar. Portanto, ao evidenciarmos infiltrado mononuclear no tecido ocular dos cães do presente estudo, podemos concluir que ocorreu rompimento das barreiras oculares que possibilitou a migração dessas células no tecido. O processo inflamatório é um mecanismo protetor, apesar de prevenir a integridade física do bulbo ocular, freqüentemente resulta em completa ou parcial destruição da função do mesmo. (SLATTER, 1990)

O processo inflamatório no bulbo ocular, caracterizada a histopatologia por infiltração de mononucleares, deu-se em todos os cães do G1, G2 e G3. Os achados, relativos à localização e intensidade dos infiltrados, foram semelhantes entre os grupos, assemelhando-se àquelas apontadas por Panciera, Ewing e Confer (2001). No presente estudo observou-se infiltrado de maior intensidade em íris, ângulo iridocorneal e corpo ciliar e uma menor

freqüência em coróide e retina como também foi evidenciado por Oriá (2001). No entanto, divergindo dos achados de Panciera, Ewing e Confer (2001), a infiltração de células mononucleares demonstrou-se mais intensa na região do limbo dos tecidos oculares dos cães do G1, G2 e G3. De modo geral, a intensidade do infiltrado inflamatório nos bulbos oculares dos animais G3, apresentou-se mais intensa quando comparada aos bulbos oculares dos cães do G1 e G2, sugerindo que esse fenômeno ocorreu devido à co-infecção de *E. canis* e *Babesia sp.* a qual promoveu uma resposta imune mais exarcebada nesses animais.

As doenças imunológicas no olho podem ser divididas em duas categorias, as doenças mediadas por anticorpos e as doenças mediadas por células (FRIEDLAENDER; O'CONNOR, 2000). O perfil da resposta imune na erliquiose canina e em co-infecção com *Babesia sp.* ainda não foi adequadamente investigado. Acredita-se que a resposta imune celular seja a principal responsável pela proteção do organismo contra a *E. canis*. (KAKOMA et al., 1977; NYINDO et al., 1980). Ganta et al. (2002) e Winslow et al. (1998) demonstraram que a resposta adaptativa mediada por células T e B é importante para a eliminação do agente. Na uveíte, na erliquiose canina e em co-infecção com *Babesia sp.*, observa-se uma resposta imune mediada por células. A observação de infiltrado inflamatório na úvea dos animais infectados comprova que ela está presente, porém, existe interação entre estes dois sistemas no bulbo ocular. As respostas imune humoral e a imune celular, em proporções variáveis, estão envolvidas na patogênese da uveíte na erliquiose canina. A lesão imune é resultante de diversos mecanismos imunológicos, porém um tipo de reação pode ser mais predominante que outro, portanto a produção de anticorpos e células T sensibilizadas durante a resposta imune intra-ocular pode ocorrer concomitantemente (ROMEIKE; BRUGMANN; DROMMER, 1998). A predominância de células mononucleares é uma característica da reação mediada por células em tecidos em geral (MCCLUSKEY; BHAN, 1982).

Avaliamos imunofenotipicamente esse infiltrado para tentar elucidar os tipos celulares envolvidos na doença e decifrar a imunopatogenia da uveíte nesses animais. A resposta aos estímulos causados por mecanismos imunológicos contribuiu para a evolução do processo de injúria tecidual

Considerando o bulbo ocular como sendo um alvo especial de processos patológicos imunológicos sistêmicos, procurou-se através do estudo imunofenotípico esclarecer alguns mecanismos imunológicos e celulares da uveíte na erliquiose monocítica canina.

Através da imunomarcagem do infiltrado inflamatório CD3⁺, observamos que as células T compõem a maior parte das células inflamatórias presentes no tecido ocular dos cães

do G1, G2 e G3. Castro et al. (2004) e Castro (2004) evidenciaram o mesmo na infecção experimental por *E. canis*., sugerindo o predomínio de células CD8⁺.

Em nosso estudo demonstramos no bulbo ocular dos animais do G1, G2 e G3, por avaliação semi-quantitativa e morfométrica, a presença expressiva de células T CD3⁺. Na análise de correlação evidenciou-se, em diversas regiões do bulbo ocular, a existência de correlação linear entre o percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8. Adicionalmente, observaram-se diferenças significativas entre as médias da contagem percentual de células CD8⁺ em relação as médias da contagem percentual de células CD4⁺, sendo que o percentual das médias de células CD8⁺ era mais expressivo que o percentual das médias de células CD4⁺. Pode-se, através dessas análises estatísticas, caracterizar que a maior porcentagem de células CD3⁺ eram CD8⁺. Page (1995) demonstrou, na circulação sangüínea, um aumento de células CD8⁺ em animais com erliquiose canina. Posteriormente, Castro et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes nos órgãos linfóides de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*.

Através desses achados, sugere-se que a lesão evidenciada no bulbo ocular seja decorrente de um processo de reação de hipersensibilidade tardia, onde linfócitos T CD8⁺ citotóxicos reconhecem e destroem células apresentadoras de antígeno que possuem complexo de histocompatibilidade classe I (MHC-I) (NEWELL, 1996; TIZARD, 2002).

Hebb et al. (2003) e Nyindo et al. (1980) também demonstraram a importância da resposta imune celular através da participação de linfócitos CD8⁺ no decorrer da doença. Ismail et al. (2004), no modelo experimental em camundongos da erliquiose monocítica fatal humana, demonstraram que a suscetibilidade do hospedeiro esta correlacionada a uma alta produção de TNF- α pela célula T CD8⁺ e fraca produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ Th1. Observou-se nos cães do presente estudo alta expressão de células CD8⁺ quando comparada à expressão de células CD4⁺, portanto esses animais demonstraram-se suscetíveis ao agente. A uveíte ocorre devido à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α pelas células T CD8⁺ que estão relacionadas com as lesões teciduais no bulbo ocular (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; MYLONAKIS et al., 2004). A presença insidiosa da *E. canis* no baço e provavelmente na medula óssea promove a produção descontrolada de TNF- α pelas células T CD8⁺ (HARRUS et al., 1998d; SILVA, 2001).

Observou-se, no presente estudo, pouca imunomarcção pelo anticorpo anti-CD4 nos bulbos oculares dos animais do G1, G2 e G3. O mesmo foi sugerido por Castro et al. (2004) e Castro (2004). Como é encontrado na síndrome da imunodeficiência adquirida humana

(AIDS), o microorganismo erliquial, através de fatores ainda pouco determinados, desenvolveu estratégias eficientes de supressão da células T CD4⁺, atingindo uma das principais células de defesa do organismo. Além da diminuição de secreção de linfocinas pelas células T CD4⁺, outras conseqüências se desenvolvem devido à perda de células T CD4⁺. Ocorre alteração das funções de monócitos e macrófagos com diminuição da capacidade citotóxica e de quimiotaxia, redução da secreção de IL-1 e deficiência na apresentação de antígeno. Adicionalmente, promove a diminuição da citotoxicidade específica da células CD8⁺ e resposta das células CD4⁺ aos antígenos solúveis (COTRAN et al., 1996). A célula T CD4⁺ é considerada o maestro da orquestra imune e determina o tipo de polarização. Estão divididas em subclasses Th1 e Th2 e sua deficiência leva à imunossupressão (TIZARD, 2002).

Estudos mais específicos devem ser realizados para determinar a resposta Th1 e Th2 na erliquiose canina, ainda estão sendo desenvolvidos métodos para padronização de técnicas em cães as quais poderiam quantificar e determinar as citocinas envolvidas em cada perfil Th.

O presente estudo é o princípio dessa investigação e muito ainda deve ser estabelecido. A resposta celular principal na erliquiose canina é do tipo citotóxica CD8⁺, deficiente de resposta CD4⁺ (CASTRO et al., 2004; CASTRO, 2004; HASEGAWA, 2005; KAKOMA et al., 1977; NYINDO et al., 1980; PAGE, 1995). Observou-se aumento na secreção de IgG2 quando comparado à produção de IgG1 em todos os animais do estudo, como também foi evidenciado por Castro (2004) e Harrus et al. (2001b). Considerando que o perfil de imunoglobulinas poderia determinar o tipo de polarização de resposta, sugere-se que no presente estudo a resposta na erliquiose canina seja Th1 (CASTRO, 2004; HARRUS et al., 1999; HARRUS et al., 2001b; HARRUS et al., 2003).

A resposta imune do animal influencia o curso e a gravidade de uma infecção. As respostas mediadas por células são geralmente exigidas para controlar doenças provocadas por bactérias intracelulares. Somente os macrófagos podem impedir o crescimento dessas bactérias. Deve ocorrer a produção de IL-2 e IFN- γ pelas células Th1 para que os macrófagos sejam ativados e estes podem localizar ou curar as infecções. No entanto, se a resposta imune contra essas bactérias estimular a resposta Th2, há falha na imunidade mediada por célula, os macrófagos não são ativados e ocorre uma doença crônica progressiva. As citocinas secretadas determinam a suscetibilidade ou a resistência do hospedeiro (TIZARD, 2002). Os bulbos oculares dos animais experimentalmente infectados (G1) foram colhidos no trigésimo dia PI, no término da fase aguda. No entanto, não foi possível estabelecer a fase da doença quando se colheram os bulbos oculares dos cães do grupo naturalmente infectados (G2 e G3).

No presente estudo, suspeita-se que os animais desenvolveram uma resposta Th1, portanto, poderíamos sugerir que a polarização da resposta Th1 e Th2 parece não ter sido fator que estabeleceu de forma significativa a evolução da doença e sim a deficiência das células T CD4⁺ auxiliares que conseqüentemente acarretaria uma deficiência tanto de célula Th1 como Th2 e de secreção de IFN- γ que segundo Bitsaktsis, Huntington e Winslow (2004) é essencial para debelar a infecção por *E. chaffeensis*. Parece que o organismo numa tentativa de debelar a infecção manteve o perfil Th1 de resposta com secreção de IFN- γ porém ineficientemente devido à deficiência de células T CD4⁺.

Estudo sugere que a destruição intracelular do agente requer a ação de mecanismos celulares efetores de células T CD4⁺ e a produção de NO pelos macrófagos ativados pelo IFN- γ (GANTA et al., 2002) portanto, se ocorrer deficiência de células T CD4⁺, o animal se torna suscetível. Os animais do presente estudo demonstraram-se suscetíveis ao agente. Os cães do G1 apresentavam-se na fase aguda e sabidamente com deficiência da resposta celular por serem da raça pastor alemão, conseqüentemente como os animais do G2 e G3 demonstraram sintomatologia clínica, achados laboratoriais e resposta imune semelhante ao G1, sugere-se que esses também apresentaram suscetibilidade. Em outras doenças, como na Leishmaniose e na Toxoplasmose, em que a resposta celular determinante é do tipo auxiliar, ou seja CD4⁺, podemos considerar que o perfil de polarização Th1/Th2 irá interferir de forma mais efetiva na evolução da doença (COSTA, 2001; GAZZINELLI et al., 1994; LOUIS et al., 2002; ROGERS et al., 2002). A polarização da resposta imune na erliquiose aparenta ser fundamental logo no início do curso da doença, quando a resposta é Th2, sendo um mecanismo de escape desenvolvido pelo agente e aparenta garantir o processo infeccioso (FERREIRA; SILVA, 1999; FERREIRA et al., 2003), como também nos animais resistentes que apresentam resposta CD4⁺ Th1 eficiente, com produção de INF- γ (HASEGAWA, 2005; ISMAIL, 2004). Diversos trabalhos estão sendo direcionados para um melhor entendimento da imunopatogênia na erliquiose tanto no homem como no cão, porém o papel das células T CD4⁺ e CD8⁺ e suas citocinas na defesa do hospedeiro, ainda não está bem estabelecido (ISMAIL, 2004).

Evidenciou-se, através da imunofenotipagem com o anticorpo CD79 α , a presença de linfócitos B nos focos inflamatórios, sugerindo que ocorreu a produção intraocular de anticorpos e a presença de uma resposta humoral no local da lesão (ROMEIKE; BRUGMANN; DROMMER, 1998). Adicionalmente observou-se diferença significativa entre o percentual de células CD79 α ⁺ da região do limbo do G1 em relação ao percentual de células

CD79 α ⁺ da região da retina do mesmo grupo, isso se deve provavelmente à alta vascularização da região do limbo quando comparada ao da retina. No que diz respeito à resposta humoral, não se consegue estabelecer se a resposta humoral na erliquiose canina é eficiente ou não. Pouco se conhece sobre os fatores do hospedeiro que determinam a resistência ou a suscetibilidade nos casos de erliquiose monocítica humana, porém alguns estudos sugerem que a resposta imune humoral possui papel importante durante a infecção por *Ehrlichia spp.* (SHU-YI LI et al., 2001; WINSLOW et al., 1998). Apesar de a resposta imune celular ser fundamental, os anticorpos também estariam relacionados com a doença (KAYLOR et al., 1991; SUN et al., 1997). Através de estudo Rikihisa, Johnson e Burge (1987) observaram proteção dose dependente de camundongos com a utilização de soro de pôneis imunizados com bacterinas de *E. risticii*. Kaylor et al. (1991) fizeram o estudo para confirmar a hipótese que os anticorpos poderiam mediar a imunidade por *E. risticii* e também para identificar os antígenos mais importantes na resposta imune protetora. Não está muito claro se a infecção celular é completamente prevenida ou apenas se mantém abaixo do limiar da doença clínica. Alguns estudos demonstraram que a transferência passiva de anticorpos promoveu proteção duradoura em camundongos infectados por *E. chaffeensis* (LI et al., 2001; WINSLOW et al., 2000). Dessa forma, os anticorpos poderiam ser utilizados para fins terapêutico e profilático em pacientes imunocomprometidos (LI; WINSLOW, 2003). Não se sabe como esses anticorpos agem, contudo, Li e Winslow (2003) sugeriram um mecanismo ao demonstrarem que a *E. chaffeensis* pode ser encontrada fora da célula do hospedeiro, podendo, portanto, nessa fase, sofrer a ação dos anticorpos. Lee e Rikihisa (1998) apresentaram dados em estudo em que a produção de anticorpos induz a síntese por monócitos de citocinas pro-inflamatórias demonstrando seu papel fundamental na proteção imune. Em infecções por *Ehrlichia spp.*, os anticorpos possuem papel importante através da citotoxicidade mediada por célula anticorpo dependente (MESSICK; RIKIHISA, 1992; MESSICK; RIKIHISA, 1994; RIKIHISA et al., 1993). Castro et al. (2004) evidenciaram em animais experimentalmente infectados por *E. canis*, o aumento da imunomarcagem de células de tecidos linfóide para IgG e IgM, que, associados a altos títulos de anticorpos IgG anti-*E. canis* específicos, dão indícios de que a resposta humoral possui papel importante no decorrer da doença.

É conhecido que, durante a doença, ocorre produção de anticorpos através da hipergamaglobulinemia observada, no entanto, não existe correlação entre a hipergamaglobulinemia observada na erliquiose canina e a atividade de anticorpos específicos anti- *Ehrlichia canis*, demonstrando que parte das globulinas produzidas não é específica

contra o agente, sugerindo uma resposta imune exarcebada e inadequada (REARDON; PIERCE, 1981a)

A presença de imunoglobulinas no bulbo ocular também foi demonstrada através da imunomarcção de células com anti-imunoglobulinas caninas, IgG1 e IgG2, conferindo a atividade efetora das células B marcadas pelo CD79 α . A resposta humoral está presente durante a infecção, porém, parece não ser protetora, somente durante um curto período de tempo quando o parasita se encontra fora da célula. As imunoglobulinas do tipo IgG ativam o complemento e participam da reação de hipersensibilidade do tipo III (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2002; TIZARD, 2002). Podemos sugerir que esses anticorpos são inespecíficos e além de formar imunocomplexos, também poderiam agir contra proteínas presentes no bulbo ocular causando lesão. Harrus et al. (2001a) sugerem que algumas manifestações da doença sejam mediadas por imunocomplexos na erliquiose monocítica canina. Imunocomplexos levam a alterações como glomerulonefrite, poliartrite e uveíte (BREITSCHWERDT, 2000; RISTIC; HOLLAND, 1993). Os imunocomplexos formados na circulação sanguínea podem se depositar em vasos sanguíneos, promovendo aumento da permeabilidade e quebra das barreiras oculares. Conseqüentemente, as células inflamatórias e as proteínas séricas acessam o bulbo ocular. O aumento da permeabilidade vascular torna a úvea, o tecido imunocompetente mais importante do bulbo ocular (HAKANSON; FORRESTER, 1990). Nas reações de hipersensibilidade do tipo III, a produção de complexos imunes depositados na úvea e a ativação do complemento resultam em lesão local. O papel desses complexos imunes nas doenças oculares ainda é pouco compreendido (COLLINS; MOORE, 1991)

Os bulbos oculares dos animais do G1, G2 e G3 demonstraram, no infiltrado inflamatório, predomínio de células imunomarcadas IgG2⁺ e poucas células IgG1⁺. Adicionalmente foi evidenciado em algumas regiões do bulbo ocular dos três grupos, a existência de correlação linear entre o percentual de células B CD79 α ⁺ e IgG2⁺, demonstrando que o percentual de células IgG2⁺ representava a maior parte da população de células B CD79 α ⁺. O mesmo foi demonstrado por Harrus et al. (2001b) que avaliaram a resposta de imunoglobulinas séricas das classes IgG1 e IgG2 durante a infecção experimental e natural por *E. canis*. Observaram que a resposta anti-*E. canis*-IgG2 tem sido a principal classe de imunoglobulina produzida durante a infecção e não apresentou diferença significativa durante as diferentes fases da doença como também durante e após o tratamento com doxiciclina ou entre animais curados ou permanentemente infectados após a terapia.

Ganta et al. (2002), na infecção experimental em camundongos por *E. chaffeensis*, observaram elevada produção de IgG2 séricas. Essa secreção é dependente do INF- γ , portanto, a resposta imune protetora pode estar associada ao INF- γ e a resposta tipo Th1.

Barnewall e Rikihisa (1994) demonstraram *in vitro*, que a ação do INF- γ inibe a infecção de monócitos por *E. chaffeensis*.

Li et al. (2001) reforçam essa hipótese e demonstraram que a IgG2 pode ser a imunoglobulina mais efetiva além de promover a resistência do hospedeiro contra a infecção. O perfil de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺, tanto Th1 como Th2, tem sido correlacionado com o tipo de subclasses de imunoglobulinas produzidas após a estimulação antigênica tanto no camundongo como no homem. As citocinas IL4 e IL 10 induzem as células B a produzirem IgG1 (BRIERE et al. , 1994; HARRUS, 2001b) e o INF- α induz as células B a secretarem IgG2 (KAWANO; NOMA; YATA 1994).

Apesar da correlação entre as subclasses de IgG e a resposta Th1/Th2 em cães ainda não ter sido reportada, pode-se sugerir que a presença de altos níveis de *E.canis*-IgG2 poderia ser um indicador da produção de níveis significantes de citocinas derivadas de células Th1 (HARRUS et al., 2001b).

Castro (2004), ao realizar estudo imunoistoquímico em cães experimentalmente infectados por *E. canis*, constatou uma redução no número de células IgG1⁺ e IgE⁺ e aumento de IgG2⁺ sugerindo que a polarização da resposta imune é para Th1. Reafirmando sua suposição, refere que o INF- γ é produzido em ambiente Th1 e é responsável por inibir a formação de isótipos dependentes de IL-4 (Th2) tais como IgE e IgG1.

Observou-se no corpo ciliar, diferença significativa entre as médias da contagem percentual de células mononucleares imunomarcadas pelos anticorpos IgG2 e CD79 do G3 em relação ao G1, esse achado poderia indicar que a polarização da resposta em Th1 poderia ser mais significativa nos animais que apresentam infecção natural por *E. canis* e *Babesia sp.*, quando comparados aos cães que adquiriram a infecção experimentalmente.

O INF- γ é uma das citocinas mais amplamente estudada e é produzida por linfócitos T, sendo a principal citocina moduladora da resposta imune específica e não específica. É conhecida como sendo a linfocina mais potente na ativação de células fagocíticas mononucleares, induzindo os macrófagos a destruírem patógenos intracelulares (LEE; RIKIHISA, 1998). Estudos demonstram que dois mecanismos principais são responsáveis pela destruição intracelular do parasita: a produção de superóxido e a redução da

disponibilidade de ferro intracitoplasmático (BARNEWALL; RIKIHISA, 1994; PARK; RIKIHISA, 1991; PARK; RIKIHISA, 1992; ROGERS et al., 2002).

Estudo demonstra que o IFN- γ realmente inibe a infecção de monócitos humanos pela *E. chaffeensis*, porém após 24 horas de infecção não produz mais efeito, ou seja, o agente, por algum mecanismo, poderia prejudicar a produção de IFN- γ , no decorrer da infecção (BARNEWALL; RIKIHISA, 1994). Na resposta Th2, a IL-4 diminui a expressão dos receptores para IL-12, um potencial protetor de células Th1. Como resultado, as células ficam irresponsivas à IL-12. A produção de IFN- γ e NO fica prejudicada e o parasita dentro do macrófago não é destruído (ROGERS et al., 2002). Lee e Rikihisa (1998) também demonstraram o mecanismo pelo qual a *E. chaffeensis* promove o bloqueio da produção de IFN- γ , escapando dessa forma do sistema imune do hospedeiro e permitindo sua sobrevivência no interior de macrófagos. Apesar do IFN- γ ser muito importante para a eliminação do agente da erliquiose granulocítica humana, durante a fase inicial da infecção, também promove alterações patológicas que são observadas na doença. (DUMLER et al., 2000; MARTIN; CASPERSEN; DUMLER 2001). Além do IFN- γ , outros fatores interferem no crescimento do parasita. Park e Rikihisa (1991) constataram inibição *in vitro* da infecção de macrófagos por *E. risticii* devido ao aumento do metabolismo oxidativo atribuído à ação do cálcio ionóforo e à concavalina A.

Para Christgau et al. (1998), os macrófagos jovens, em lesões inflamatórias mais agudas e de alta renovação celular, são melhor evidenciados quando se utiliza o anticorpo monoclonal, camundongo anti-humano MAC387 (Dako Corporation, Carpinteria, cód M0747, USA). No presente estudo, o anticorpo anti-MAC 387 demonstrou boa marcação no tecido canino controle, demonstrando boa reatividade com essa espécie. O infiltrado inflamatório dos bulbos oculares dos animais experimentalmente e naturalmente infectados não apresentou marcação com o anticorpo anti-MAC 387. Para os mesmos autores, o anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano CD68-clone PG-M1(Dako Corporation, Carpinteria, cód M0876, USA) determina o envolvimento de macrófagos em inflamações crônicas sendo empregado em estudo em tecido de cão. No entanto, no presente estudo, o anticorpo anti- CD68-clone PG-M1(Dako Corporation, Carpinteria, cód M0876, USA) não demonstrou reatividade cruzada em tecido canino, como também foi evidenciado em estudo realizado por Jensen et al. (2003). Formulou-se diversos protocolos para obter marcação com esse anticorpo porém não obtivemos sucesso e não foi possível caracterizar e estabelecer a resposta de macrófagos nas lesões observadas nos bulbos oculares dos animais

experimentalmente e naturalmente infectados. Podemos apenas concluir a ausência de macrófagos de fase aguda nas lesões porém quanto à presença de macrófagos de fase crônica ainda serão necessárias futuras investigações empregando-se outros marcadores que poderiam apresentar reatividade com tecido canino. A limitação de marcadores específicos para cães torna-se um dos principais obstáculos existentes na imunocaracterização em animais.

No presente estudo, por meio da imunomarcação pelo anticorpo TAL 1B5 evidenciou-se um predomínio de células apresentadoras de antígeno expressando moléculas de MHC-classe II nos bulbos oculares dos animais experimentalmente e naturalmente infectados. Em contrapartida, Castro (2004) observou uma redução significativa na expressão de moléculas de MHC-classe II no baço e no linfonodo de cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*. Complementando, o estudo de Ganta et al. (2002) e Harrus et al. (2003) demonstraram o mesmo *in vitro*. Posteriormente, Ganta et al. (2004) realizaram estudo em que camundongos knock-out para moléculas MHC-classe II infectados por *E. chaffeensis* permaneceram persistentemente infectados durante todo o período de estudo (92 dias) quando comparados aos animais controles que debelaram a infecção em duas semanas. Conclui-se com esses estudos que a diminuição da expressão de moléculas de MHC-classe II prejudicaria a apresentação de antígeno para células CD4, sugerindo um mecanismo de sobrevivência, persistência e evasão do microorganismo do sistema imune. Foi evidenciado por Castro (2004), no infiltrado inflamatório de fígado, rins e pulmões, um aumento da expressão de molécula de MHC-classe II sugerindo, uma resposta intensa do sistema imune, culminando na destruição tecidual, ou seja esse aumento acarretaria uma resposta imune frente aos antígenos do parasita e junto aos tecidos do hospedeiro (SPEETI et al., 2003). Os nossos resultados com relação a molécula de MHC-classe II corroboram os achados de Castro (2004). Contudo, adicionalmente, evidenciou-se uma diminuição da expressão de células CD4⁺, o que permite concluir que a resposta imune frente aos antígenos do parasita foi intensa, no entanto inefetiva, por não apresentar uma estimulação adequada de células CD4⁺. Tizard (2002) relata que as células que expressam molécula de MHC-classe II são apresentadora de antígeno para células CD4⁺.

As moléculas de MHC-classe II estão restritas às células apresentadoras de antígenos como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (SPEETI et al., 2003). Infelizmente, no presente estudo não foi possível estabelecer qual a população de células que expressam molécula de MHC-classe II. Uma parte deve refletir a população de linfócitos B que foi determinada com o anticorpo CD79 α . Quanto aos macrófagos presentes no infiltrado

inflamatório dos bulbos oculares, sabemos que não são macrófagos de fase aguda, já que não foi observada imunomarcção com o anticorpo MAC 387.

Para conhecermos quais são as células responsáveis pela expressão de moléculas de MHC-classe II, deve-se adequar um anticorpo para determinar os macrófagos de fase crônica e realizar a imunomarcção de células dendríticas.

As uveítes geralmente tendem à recorrência, devido a certas peculiaridades de diversos fatores da imunologia ocular. A ação de linfonodo acessório, o aumento da permeabilidade vascular, a deposição de imunocomplexos têm sido mencionados. Adicionalmente, para o processamento de antígeno, as células endoteliais do bulbo ocular humano expressam MHC classe II em sua superfície, nas uveítes e no início da resposta imune. A injúria de tecidos intra-oculares, devido à inflamação, pode levar a reações auto-imunes contra os componentes teciduais alterados (HAKANSON; FORRESTER, 1990). O desvio imune associado à câmara anterior (ACAID) é um mecanismo de controle da auto-imunidade encontrado no bulbo ocular e tem papel muito importante no desenvolvimento da tolerância contra antígenos oculares e está relacionado às características de imunoprivilégio do bulbo ocular (RIZZO; BELFORT, 2000). Na uveíte recorrente equina não estão estabelecidos os fatores que promovem o prejuízo nesse sistema (ROMEIKE; BRUGMANN; DROMMER, 1998). Não existem dados na literatura que relacionam a ACAID com a uveíte encontrada na erliquiose canina, sendo outro tema para futuras investigações.

Através desse estudo, podemos concluir que a interação entre o hospedeiro e o parasita é fator determinante entre cura espontânea, doença clínica, doença subclínica e morte do hospedeiro. Esta relação é determinada pelo perfil de citocinas liberadas que direciona o tipo de resposta imune e dessa forma determina o grau de injúria tecidual. A partir do início do processo de infestação, ou seja, durante o repasto sangüíneo, mecanismos imunológicos são induzidos pelo parasita para possibilitar sua evasão do sistema imune do hospedeiro através da polarização da resposta para o tipo Th2.

Harrus et al. (2001b) e Castro (2004) e o presente estudo sugerem que após infestação celular o organismo animal parece estabelecer um tipo de resposta Th1, entretanto outros estudos deverão ser realizados para poder estabelecer de forma mais criteriosa quais citocinas estão envolvidas no processo. A resposta imune do animal influencia o curso e a gravidade da infecção. Infelizmente, a medicina veterinária carece de anticorpos específicos para cães, dificultando o progresso científico na área de imunoistoquímica. É importante estabelecer que

a resposta imune do hospedeiro não é estática, visto que possui variações no decorrer da doença e varia dependendo da resistência imune do hospedeiro. Demonstrou-se com a marcação celular e de imunoglobulinas IgG que o organismo apresenta dois tipos de resposta: a humoral e a celular, sendo que estas interagem entre si. Parece que a produção de anticorpos está relacionada à formação de imunocomplexos que se depositam no endotélio vascular causando lesão o que, no caso do bulbo ocular, provocaria a quebra das barreiras oculares. As imunoglobulinas produzidas contra as proteínas do parasita por serem inespecíficas poderiam agir contra as proteínas do tecido ocular e induzir lesão no bulbo ocular. Adicionalmente as proteínas do parasita poderiam mimetizar as proteínas do bulbo ocular e consequentemente os anticorpos produzidos contra o parasita poderiam também promover lesão no tecido ocular. Os anticorpos também poderiam estar relacionados com a resposta celular através da resposta celular anticorpo dependente.

Como foi visto e reafirmado nesse estudo, a resposta celular está presente. A resposta imune do tipo citotóxica $CD8^+$ parece ser determinante durante a evolução da doença. O processo inflamatório induz a produção de citocinas pro-inflamatórias promovendo quimiotaxia de diversos tipos celulares que, somadas, promovem a lesão do tecido ocular como foi evidenciado em nosso estudo. Apesar de estabelecermos parte do mecanismo imune envolvido, ainda são necessários estudos específicos para decifrar os mistérios dessa doença e determinar o perfil de resposta imunológica na erliquiose monocítica canina.

7 CONCLUSÃO

Os sinais clínicos de erliquiose canina como: hiporexia, mucosas hipocoradas, emagrecimento, secreção ocular e nasal, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, e aumento da temperatura retal foram observados nos animais do G1, G2 e G3.

Os animais naturalmente e experimentalmente infectados desenvolveram quadro hematológico similar, caracterizado por anemia normocítica normocrômica não regenerativa e trombocitopenia.

Os exames sorológicos, RIFI e o "dot-blot-Elisa" mostraram-se com sensibilidade, para a evidência da infecção nos cães do G1, G2 e G3.

A PCR demonstrou especificidade e sensibilidade diagnóstica no animais do G1, G2 e G3

O infiltrado inflamatório dos cortes de tecido ocular dos cães do G1, G2 e G3, mostrou - se mais intenso nas regiões de corpo ciliar e ângulo iridocorneal, moderado nas regiões de limbo e íris e mínimo em coróide e retina

A avaliação semi-quantitativa da intensidade do infiltrado inflamatório nos bulbos oculares dos animais G3 apresentou-se mais intensa quando comparada com os bulbos oculares dos cães do G1 e G2, sugerindo uma resposta imune mais exarcebada nos cães do G3.

A contagem imunofenotípica para os anticorpos CD3, CD4, CD8, IgG1, Tal1B5 e MAC 387 não demonstrou diferença significativa entre as diferentes regiões analisadas do bulbo ocular e entre os grupos naturalmente e experimentalmente infectados

A presença de células B CD79 α imunomarcadas no bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3 fala a favor de produção local de anticorpos

A população de células que expressam IgG2 corresponde à população de linfócitos B imunomarcadas pelo anticorpo CD79 α nas mesmas regiões analisadas. Esse achado sugere um padrão de resposta em Th1.

Evidenciou-se no corpo ciliar, diferença significativa entre as médias da contagem percentual de células mononucleares imunomarcadas pelos anticorpos IgG2 e CD79 α do G3 em relação ao G1, sugerindo que animais naturalmente infectados por *E. canis* e *Babesia* sp. poderiam apresentar um padrão de resposta Th1 mais significativo

A imunomarcção das lesões inflamatórias evidenciadas no bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3 demonstrou um predomínio nas contagens de linfócitos T imunomarcadas pelo anticorpo CD3.

Evidenciou-se, no infiltrado inflamatório presente no bulbo ocular dos animais do G1, G2 e G3, que a maior porcentagem de células marcadas pelo anticorpo CD3, era CD8⁺.

Demonstrou-se, pela imunofenotipagem, que as células inflamatórias no bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3 eram linfócitos T CD3⁺ e B CD79 α ⁺.

Observou-se aumento na expressão de moléculas de MHC-classe II nos bulbos oculares dos cães do G1, G2 e G3 sugerindo uma resposta intensa do sistema imune frente aos antígenos do parasita e junto ao tecido ocular, contudo inefetiva devido a deficiência de células CD4⁺.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda., 2002. 544 p.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina. **Clínica Veterinária**, v. 4, n. 19, p. 31-38, 1999.
- ALVES, C. J.; VASCONCELO, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1996.
- BACHA, JR., W. J.; BACHA, L. M. The eye. In: BACHA, JR., W. J.; BACHA, L. M. **Colors atlas of veterinary histology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1990, p. 245-286.
- BARNEWALL, R. E.; RIKIHISA, Y. Abrogation of gamma interferon- induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, 4804-4810, 1994
- BEAUFILS, J. P. Caractéristiques du frottis sanguin lors d'ehrlichiose canina à *Ehrlichia canis*. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Companie**, v. 35, n. 6, p. 471-473, 2000.
- BEAUFILS, J. P.; GRANEL, J. M.; JUMELLE, P. Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines. **Pratique Médicale Chirurgicale de l'Animal de Companie**, v. 30, n. 2, p. 189-195, 1995.

BELLAH, J. R.; SHULL, R. M.; SELCER, E. V. S. *Ehrlichia canis* - related polyarthritis in a dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 8, p. 922-923, 1986.

BISTNER, S. Allergic- and Immunologic- Mediated Diseases of the Eye and Adnexae. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 4, p. 711-734, 1994.

BITSAKTSIS, C.; HUNTINGTON, J.; WINSLOW, G. Production of IFN- γ by CD4 T cells is essential for resolving Ehrlichia infection. **The Journal Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6894-6901, 2004

BONNARD, P.; DRALEZ Cas clinique: pancytopenie canine. **Le Point Vétérinaire**, v. 22, n. 128, p. 57-62, 1999.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **The Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.

BOURDEAU, P.; GUELFY, J.F. La babesiose canine à *Babesia canis*. **Le Point Vétérinaire**, v.27, n.168, p. 11-24, 1995.

BRANDÃO, L. P. **Imunidade humoral e resistência à reinfecção em cães inoculados experimentalmente com *Babesia canis* (Starcovia, 1893)**. 2001. 88 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BREITSCHWERDT, E. B. Babesiosis. In: GREENER, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1990. p. 796-803.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER S. J.; FELDMAN E. C., **Textbook of veterinary internal medicine diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000, p. 400-408.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2650, 1998.

BRIERE, F. ; SERVET-DELPRAT, C.; BRIDON, J. M.; SAINT-REMY, J. M.; BANCHEREAU, J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (SigD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 2, p. 757-762, 1994.

BUHLES JR., W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine thrombocytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **Journal Infection Disease**, v. 130, n. 4, p. 357-367, 1974.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; ZHOU, R.; MASON, P. R.; CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; ZHOU, R.; MASON, P. R. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Record**, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

CARNEIRO FILHO, L. **Manual de oftalmologia veterinária** : um guia prático para clínicos veterinários. 1. ed. São Paulo: Roca, 1997. 120 p.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. Rickettsia and Chlamydia. In: CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 230-236.

CASTRO, M. B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental da cães por *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935)**. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Agrária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

CASTRO, M. B. **Caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em lesões observadas na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis***. 2004b. 76 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Agrária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI A.C.; COSTA M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

COLLINS, B. K.; MOORE, C. P. Canine Anterior Uvea In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, p. 357-395.

COLLINS, B. K.; MOORE, C. P. Disease and surgery of the canine anterior uvea In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 755-796.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v 33, n. 4, p. 863-884, 2003

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Babesioses. In: CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992a. p.771-778.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Outras rickettsioses. In: CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro : Medsi, 1992b. p. 477-483.

COSTA, F. A.L. **Patologia e imunopatogenia da nefropatia da leishmaniose visceral canina**. 2001. 129 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. Doenças da Imunidade. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan S. A, 1996. p. 516-556.

CHRISTGAU, M.; CAFFESSE, R. G.; NEWLAND, J. R.; SCHMALZ, G.; D'SOUZA, R. N. Characterization of immunocompetent cells in the diseased canine periodontium. **Journal Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1443-1454, 1998.

DAVOUST, B.; BROUQUI, P.; RAFFI, A.; RAOULT, D. L'ehrlichiose canine dans les chenils militaires du Sud-Est à propos de 14 cas. **Le Point Vétérinaire**, v. 21, n. 125, p. 63-67, 1989-1990.

DAVOUST, B.; PARZY, D.; OTT, D.; HASSELOT, N. Ehrlichiose canine chronique: intérêt de la numération plaquettaire. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 142, n. 4, p. 287-292, 1991.

DAVOUST, B. L'Ehrlichiose canine. **Le Point Vétérinaire**, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DAVOUST, B.; PARZY, D.; PUBERT, D.; MARTET, G.; DEPARIS, X. Signes hématologiques de l'ehrlichiose canine aigüe. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 147, n. 1, p. 60-74, 1996.

DAY, M. J. Immunopathology of anal furunculosis in the dog. **Journal Small Animal Practice**, v. 34, n. 8, p. 381- 389, 1993.

D'ELL PORTO, A. **Estudo da ocorrência de *Babesia canis* (Piana & Galli Valério, 1895) em cães de rua da cidade de São Paulo. Avaliação de métodos de diagnóstico e características do quadro hemático.** 1986. 95 f. Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

DIRSCHERL, P.; BEISKER, W.; KREMMER, E.; MIHALKOV, A.; VOSS, C.; ZIESENIS, A. Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, n. 1/5, p. 1-10, 1995.

DONATIEN, A. ; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.28, p.418-419, 1935.

DONATIEN, A. ; LESTOQUARD, F. État Actuel des Connaissances sur les Rickettsioses Animales. **Actes de L'institut Pasteur d'Algerie**, v. 15, n. 2, p. 1-42, 1937.

DUMLER, J. S.; TRIGIANI E. R.; BAKKEN, J. S.; AGUERO-ROSENFELD, M. E.; WORMSER G. P. serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 6-8, 2000.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

ELLET, E. W.; PLAYTER, R. F.; PIERCE, K. R. Retinal lesions associated with induced canine ehrlichiosis: a preliminary report. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.9, p. 214-218, 1973.

ELWOOD, C. M.; HAMBLIN, A. S.; BATT, R. M. Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subset and MHC class II expression in the canine small intestine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 3/4, p. 195-207, 1997.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T-cell proliferation and interferon- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279-293, 1998

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434-439, 1999.

FERREIRA, B. R.; SZABÓ, M. J. P.; CAVASSANI, K. A.; BECHARA, G. H.; SILVA, J. S. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35-48, 2003

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.; RAMIS, A. Detection of T lymphocytes in canine tissues embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. **Journal Compemdiun Pathology**, v. 106, n. 3, p. 311-314, 1992.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

FRIEDLAENDER, M. H.; O' CONNOR, G.R. Doenças Oculares In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Immunologia Médica**. 9. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 456-461.

FU, Y.; MARCHAL, I. S. A.; MARCHAL, T.; BOSQUET, G.; PETAVY, A. F. Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66 kDa protein of *Echinococcus granulosus*. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 74, n. 3/4, p. 193-208, 2000

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymphnode cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. **Immunology**, v. 85, n. 1, p. 120-124, 1995.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the in vitro responsiveness of lymphocytes to mitogens. **Immunology**, v. 87, n. 2, p. 259-263, 1996

GANTA, R. R.; CHENG, C.; WILKERSON, M. J.; CHAPES, S. K. Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4 + T-cell knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 159-167, 2004

GANTA, R. R.; WILKERSON M. J.; CHENG C.; ROKEY, A. M.; CHAPES, S. K. Persistent *Ehrlichia Chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 380-388, 2002.

GARCIA, A. M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F. J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniosis. **Parasite Immunology**, v.18, n. 12, p. 617-623, 1996.

GAZZINELLI, R. T.; BRÉZIN, A.; LI, Q.; NUSSENBLATT, R. B.; CHAN, C. Toxoplasma gondii: Acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α e INF- γ . **Experimental parasitology**, v. 78, n. 2, p. 217-229, 1994

GERMAN, A. J.; BLAND, P. W.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Expression of major histocompatibility complex class II antigens in the canine intestine. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 61, n. 2/4, p. 171-180, 1998.

GILBERT, S.; CLERCX, C.; HENROTEAUX, M. L'ehrlichiose canine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 136, n. 7, p. 505-510, 1992.

GILBERT, B. C.; MALOK, E.; CUTTER, K. C.; STEWAET, T.; HOROHOV, D. W.; ALLEN, J. B. Characterization of t-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 1, p.17-28, 1999.

GLAZE, M. B.; GAUNT, S. D. Uveitis associated with Ehrlichia platys infection in a dog **Journal American in Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 9, p. 916-917, 1986.

GREENE, R. T. Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. W. **Kirk's current veterinary therapy XII- small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 290-293.

HAKANSON, N.; FORRESTER, S. D. Uveitis in dog and cat. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 715-735, 1990.

HARRUS, S.; DAY, M. J.; WANER, T.; BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n.4, p. 343-349, 2001a

HARRUS, S.; HYLTON, B.; WANER, T. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 4, p. 360-363, 1997.

HARRUS, S.; OFRI, R.; AIZENBERG, I.; WANER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 2, p. 155-160, 1998b

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; BARK, H. Therapeutic Effect of Doxycycline in Experimental Subclinical Canine Monocytic Ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week Course. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2140-2142, 1998c.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY J. E.; POLAND A.M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998d.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, n. 3-4, p. 241-249, 1996c.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2745, 1999

HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 12, p. 290-293, 1996a.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15-27, 1998a.

HARRUS, S.; WANER, T.; MORVINSKI D.F., FISHMAN Z., BARK H., HARMELIN A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 3/4, p. 239-243, 2003.

HARRUS, S.; WANER, T.; STRAUSS-AYALI, D.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; HECHT, G.; BANETH, G. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n.1, p. 63-71, 2001b.

HARRUS, S.; WANER, T.; WEISS, D. J.; KEYSARY, A.; HYLTON, B. Kinetics serum antiplatelet antibodies in experimental acute ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, n. 1-2, p. 13-20, 1996b.

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular.** 2005. 134 f. Tese (Doutorado em clínica médica veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HEEB, H. L.; WILKERSON, M. J.; CHUN, R.; GANTA, R. R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 4, p. 379-384, 2003.

HIBLER, S. C.; GREENE, C. E. Rickettsial infections in dogs Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. **The Compendium on Continuing Education**, v. 8, n. 2, p. 106-113, 1986.

HILDEBRANDT, P. K.; HUXSOLL, D. L.; WALKER, J. S.; NIMS, R. M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). **American Journal Veterinary Research**, v. 34, n. 10, p. 1309-1320, 1973.

HINES, M. T. Immunologically mediated ocular disease in the horse. **Veterinary Clinics of North America : Large Animal Practice**, v. 6, n. 3, p. 501-512, 1984

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN. I.; TELFORD III, S. R.; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n. 3, p. 451-469, 2000

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, v. 16, n.3, p.13-21, 1991.

HOSKINS, J. D.; BARTA, O.; ROTHSCMITT, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 9, p. 1011-1012, 1983.

HRIBERNIK, T. Rickettsial diseases. In : MORGAN R.V. **Handbook of small animal practice**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 1219-1223.

ISMAIL, N.; SOONG, L.; MCBRIDE, J. W.; VALBUENA, G.; OLANO J. P.; FENG, H; WLAKER, D. H. Overproduction of TNF- α by CD8⁺ type I Cells and down-regulation of IFN- γ production by CD4⁺ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in a animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1786-1800, 2004.

JAIN, N. C. Examination of the blood and bone marrow. In: JAIN, N. C. **Essential of Veterinary Hematology**, 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993a. p. 8-17

JAIN, N. C. Hemolytic anemias associated with some infectious agents In: JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**,. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993b. p.180-182.

JENSEN, O. A.; KAARSHOLM, S.; PRAUSE, J. U.; HEEGAARD, S. Neuroepithelial tumor of the retina in a dog. **Veterinary Ophtalmology**, v. 6, n. 1, p. 57-60, 2003.

JUBB, K.V. F.; KENNEDY, P. C. Sistema hematopoyético. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C. **Patologia de los animales domésticos**. Montevideo: Hemisfério Sur, 1970. p. 371-378.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sistema Imunitário e Órgãos Linfáticos. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 221-243.

KAKOMA, I.; CARSON, C. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; STEPHENSON, E.H.; NYINDO, M. B. A. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine Ehrlichiosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 38, n. 10, p. 1557-1559, 1977.

KAVINSKI, L. C.; FLORIANO, B.; CARON, P. E.; BRONZE, S. J. .M. Ocorrência de um caso de Ehrlichiose Canina em Curitiba. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1-2, p. 217-219, 1998.

KAYLOR, P. S.; CRAWFORD, T. B.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Passive transfer of antibody to Ehrlichia risticii protects mice from ehrlichiosis. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 6, p. 2058-2062, 1991.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **Journal Immunology**, v. 153, n. 11, p. 4948-4958, 1994.

KOLBJØRNSSEN, Ø.; PRESS A. C. M.; MOORE, P. F.; LANDSVERK, T. Lymphoid follicles in the gastric mucosa of dogs. Distribution and lymphocyte phenotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 40, n. 4, p. 299-312, 1994.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Clinical observation in 15 spontaneous cases of canine babesiosis. **Canine Practice**, v. 22, n. 5-6, p. 30-34, 1997.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal American Veterinary Association**, v. 186, n. 4, p. 355-358, 1985.

LAPPIN, M. R. Protozoal diseases In: MORGAN, R.V. **Handbook of small animal practice**. 2.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1992. p.1230-1232.

LEE, E. H.; RIKIHISA, Y. Protein kinase A-mediated inhibition of gamma interferon- induced tyrosine phosphorylation of janus kinase and latent cytoplasmic transcription factors in human monocytes by *Ehrlichia chaffeensis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2514-2520, 1998.

LEWISS, G. E.; RISTIC, M. Effect of canine immune macrophages and canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 39, p. 77-82, 1978.

LI, J. S.; YAGER E.; REILLY, M.; FREEMAN, C.; REDDY G. R.; REILLY, A. A. CHU, F. K.; WINSLOW, G. M. Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1855-1862, 2001

LI, J. S.; WINSLOW, G. M. Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4229-4267, 2003

LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.20, n.4, p.418-431, 1998.

LOUIS, J., GUMY, A.; ROCKEN, M.; LAUNOIS, P. Experimental cutaneous Leishmaniasis: a powerful model to study *in vivo* the mechanisms underlying genetic differences in Th subset differentiation. **European journal of dermatology**, v. 12 n. 4 , p. 316-318, 2002.

MARTIN, C. L.; STILES, J. Ocular infection In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 658-671.

MARTIN, M. E.; CASPERSEN, K.; DUMLER J. S. Immunopathology and Ehrlichial Propagation are regulated by Interferon- γ and Interleukin-10 in a Murine Model of Human Granulocytic Ehrlichiosis. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 5, p. 1881-1888, 2001

MC CLUSKEY, R. T.; BHAN, A. K. Cell-mediated Mechanism in Renal Diseases. **Kidney International**, v. 21, p. S.6-S. 2, 1982. Supplement 11.

MESSICK, J. B.; RIKIHISA, Y. Inhibition of binding, entry, or intracellular proliferation of *Ehrlichia risticii* in P388D₁ cells by anti- *E. risticii* serum, immunoglobulin G, or Fab fragments. **Infection and Immunity**. v. 62, n. 8, p. 3156-3161, 1994.

MESSICK, J. B.; RIKIHISA, Y. Presence of parasite antigen on the surface of P388D₁ cells infected with *Ehrlichia risticii*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 8, p. 3079-3086, 1992

MICHELS, G. M.; BOON, G. D.; JONES, B. D.; PUGET, B. Hypergammaglobulinemia in a dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 5, p. 567-570, 1995.

MURPHY, G.L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; ALAN, A. A molecular and serology survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n. 4, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; BILLINS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 174-184, 2004.

NAVARRO, C. E. K. G.; PACHALY, J. R. Mielograma. In: NAVARRO, C. E. K. G.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1998. p. 109-116.

NAKAGHI, A. C. **Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *Ehrlichia canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose.** 2004, 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

NEWELL, F. W. **Ophthalmology Principles and Concepts.** 9. ed. St Louis: Mosby, 1996. 595 p.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C. A.; STEPHENSON, E. H. Cell-mediated and humoral immune response of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American journal Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

ORIÁ, A. P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (reação de Imunofluorescência Indireta e "dot-blot-Elisa") e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*.** 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Agrária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

PAGE, R. L. Clinical implication of lymphocyte phenotyping. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 9., 1995, Orlando. **Proceedings...** p. 257.

PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; CONFER, A. W. Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 1, p. 43-46, 2001.

PARK, J.; RIKIHISA, Y. Inhibition of *Ehrlichia risticii* infection in murine peritoneal macrophages by interferon, a calcium ionophore, and concavalin A. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3418-3423, 1991.

PARK, J.; RIKIHISA, Y. L-arginine-dependent killing of intracellular *Ehrlichia risticii* by macrophages treated with gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 9, p. 3504-3508, 1992.

PEAKMAN, M.; VERGAN, D. **Imunologia básica clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 327 p.

PEIFFER JR., R. L. Ocular Immunology and Mechanisms of Ocular Inflammation. **Symposium on Ophthalmology**, v. 10, n. 2, p. 281-302, 1980

PEREZ, M; RIKIHISA, Y.; WEN, B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

RABANAL, M. R.; FERRER, L.; ELSE, R. W. Immunohistochemical detection of canine leukocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 47, n. 1/2, p. 13-23, 1995.

REARDON, M. J.; PIERCE, R. K. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of de hemic and lymphoreticular system **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 48-61, 1981a

REARDON, M. J.; PIERCE, R. K. Acute experimental canine ehrlichiosis. II Sequential reaction of de hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 3, p. 384-395, 1981b.

RENEWICK, P. Anterior uveitis: diagnosis and management. **Waltham Focus**, v. 5, n. 1, p. 9-16, 1995.

REHDER, C. L.; BELFORT, JR., R. Anatomia funcional do trato uveal. In: REHDER, C. L.; BELFORT, JR., R. **Uveítes**. São Paulo: Roca, 1987.p. 13-17.

RIKIHISA, Y.; JOHNSON, G. C.; BURGE, C. J. Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with *Ehrlichia risticii*. **Infection Immunity**, v.55, n. 9, p. 2215-2222, 1987.

RIKIHISA, Y.; WADA, R.; REED, S. M., YAMAMOTO, S. Development of neutralizing antibodies in horses infected with *Ehrlichia risticii*. **Veterinary Microbiology**, v. 36, n. 1/2, p. 139-147, 1993.

RISTIC, M. Ehrlichiosis. In: BERAN, G. W. **Handbook of Zoonoses**. 2. ed. Florida: C. R. C. Press, 1994. p. 447-455.

RISTIC, M.; HOLLAND, C. J. Canine Ehrlichiosis In: RISTIC, M. (Ed.) **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993, p.169-186.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; WEISIGER, R. M.; HILDEBRANDT, P. K.; NYINDO, M. B. A. **Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence**. *Infection Immunity*, v. 6, n. 3, p. 226-31, 1972.

RIZZO, L. V.; BELFORT JR., R. Ocular Autoimmunity In: LAHITA, R. G.; CHIORAZZI, N.; REEVES, W. H. **Autoimmune Diseases**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 515-534

ROGERS, K., A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 209, p. 1-7, 2002

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Células envolvidas na resposta imune In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 2.1-2.18.

ROMEIKE, A.; BRÜGMANN, M.; DROMMER, W. Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 515-526, 1998.

SAMUELSON, A. D. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 31-150.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1, n.2, p. 97-109, 1970

SEARCY, G. P. Sistema hematopoético In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 305-352.

SHU-YI LI, J.; YAGER, E.; REILLY, M.; FREEMAN, C.; REDDY, G. R.; REILLY, A.; CHU, F. K.; WINSLOW, G. M. Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1855-1862, 2001.

SILVA, V. L. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea, na erliquiose canina aguda:** estudo experimental. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SLATTER, D. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology.** 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1990. 630 p.

SOUZA, E. R.; TONON, A. P.; GAZETA, G. S.; DUTRA A. E. A.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; SCHUMAKER, T. T. S. Caracterização molecular de erliquias de cães procedentes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 353, 2004.

SPEETI, M.; STAHL, A.; MERI, S.; WESTERMARCK, E. Upregulation of major histocompatibility complex class II antigens in hepatocytes in Doberman hepatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1/2, p. 1-12, 2003.

STELLER-STEVENSON, M.; MEDEIROS, L. J.; JAFFE, E. S. Immunophenotypic methods and findings in the diagnosis of lymphoproliferative diseases. In: JAFFE, E. S. **Surgical pathology of the lymph nodes and related organs.** 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995. p. 1-21.

STILES, J. Canine Rickettsial Infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1135-1149, 2000

STORZ, J. Rickettsiae and Chlamydiae In: CARTER G. R.; COLE JR., J. R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology.** 5. ed. California: Academic Press, 1990. p. 309-331.

SUN, W.; IJDO J. W.; TELFORD III, S. R.; HODZIC, E.; ZHANG, Y.; BARTHOLD, S. W.; FIKRIG, E. Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. **Journal Clinical Investigation**, v. 100, n. 12, p. 3014-3018, 1997.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; KANEKO, C.; OGAWA, S.; DARNEL, A. D.; KROZOWSKI, Z. S. Immunohistochemical distribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human eye. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 173, n. 1/2, p. 121-125, 2001.

SWANGO, L. J.; BANKEMPER, K. W.; KONG, L. I. Infecções bacterianas riquetsiais, protozoais, e outras. In: ETTINGER S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. v. 1. p. 277-311.

TABOADA, J.; MERCHANT, S.R. Babesiosis of companion animals and man. **Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice**, v.21.n.1, p. 103-121, 1991.

THIRUNAVUKKARASU, P. S.; NAMBI A. P.; RAJAN T. S. S.; GNANAPRAKSAM, V. Clinical and hematological findings in canine ehrlichiosis in Madras City. **Indian Veterinary Journal**, v. 71, n. 8, p. 825-828, 1994

THIRUNAVUKKARASU, P. S.; SRINIVASAN, S. R.; RAJAN, T. S. S.; GNANAPRAKASAM, V. Ophthalmoscopic evaluation of canine ehrlichiosis. **Indian Veterinary**, v. 7, n. 12, p. 1215-1216, 1994.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. The Rickettsiaceae In: TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Cornell, 1988. p. 328-330.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 532

TROY, G. C.; FORRESTER S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 404-418.

TURNER, L. H. Leptospirose Animal. In: ENCONTRO NACIONAL DE LEPTOSPIROSE, **Anais 3**, Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Nacional de Saúde, 1993, p. 62-65.

VIEGAS, S. A. R. de A.; TAVARES, C. H. T.; OLIVEIRA, E. M. de D.; DIAS, A.R.; MENDONÇA, F. F.; SANTOS, M. de F. P. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador- Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 2, n. 1, p. 21-30, 2001

WADDLE, J. R.; LITTMAN, M. P. A Retrospective Study of 27 Cases of Naturally Occurring Canine Ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 24, n. 6, p. 615-620, 1988.

WALDE, I.; SCHÄFFER, E. H.; KÖSTLIN, R. G. **Atlas of Ophthalmology in dogs and cats**. Toronto: B.C. Decker Inc., 1990. 325 p.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dog with especial emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kits with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v 12, n. 3, p. 240-244, 2000.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENER, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.7, p. 1852-1855, 1997.

WIBERG, M. E.; SAARI, S. A.; WESTERMARCK, E.; MERI, S. Cellular and humoral immune responses in atrophic lymphocytic pancreatitis in German Shepherd dog and rough-coated collies. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 76, n. 1/2, p. 103-115, 2000.

WILKIE, D. A. Úvea In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual saunders-clínica de pequenos animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1998.p. 1356-1360

WILLIAMS, D. L. Histological and immunohistochemical evaluation of canine chronic superficial keratitis. **Research in Veterinary Science**, v. 67, n. 2, p. 191-195, 1999.

WINSLOW, G., M.; YAGER, E.; SHILO, K.; COLLINS, D. N.; CHU, F. K. Infection of the Laboratory Mouse with the Intracellular Pathogen Ehrlichia Chaffeensis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3892-9899, 1998.

WINSLOW, G., M.; YAGER, E.; SHILO, K.; VOLK, E.; CHU, F. K. Antibody mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen Ehrlichia chaffeensis during active infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2187-2195, 2000

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dog. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 75-98, 1991.

WÜNSCHMANN A. A.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 1, p. 83-98, 2000.

ANEXO A

1) Solução Tampão Citrato- pH 6,0-0,01M

Ácido cítrico monohidratado p.a.----- 4,2 g

Água destilada----- 2000mL

Dissolver e acertar o pH com solução de hidróxido de sódio (NaOH)

2) Solução Tampão Tris base-EDTA pH 9,0

Tris base ----- 2,42g

EDTA ----- 0,74g

Água destilada ----- 2 000 mL

3) Solução salina tamponada (PBS)- 0,01M- pH 7,2-7,6

Cloreto de sódio p.a. (NaCL)----- 16,36g

Fosfato de sódio dibásico anidro p.a.----- 2,1g

Fosfato de sódio monobásico di-hidratado p.a.----- 0,6g

Água destilada ----- 2000mL

APÊNDICE A

Eritrograma e trombograma dos animais com hemoparasitose de ocorrência espontânea. Grupo 2 (G2), cães que apresentam infecção por *Ehrlichia canis* e grupo 3 (G3) animais que apresentam infecção por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* São Paulo, 2006

Animais	He x10 ⁶ µL	Hto %	Hb g/dL	VCM fl	CHCM %	Ret. (%)	Plq x10 ³ µL
Grupo 2							
1	2,58	17,8	5,3	68,9	29,7	0,6	70,00
2	2,26	15,8	4,7	69,9	29,9	0,8	50,00
3	3,36	22,9	7,3	68,1	31,9	0,7	84,00
4	3,34	21,2	6,3	63,4	29,7	0,6	60,00
Grupo 3							
A	4,53	32,0	10,0	70,6	31,25	0,9	21,00
B	2,76	19,0	5,7	68,8	30,0	0,7	6,00
C	4,44	34,6	10,8	77,9	31,2	0,8	73,00
D	3,85	25,1	8,2	65,2	32,6	0,8	75,00
E	4,85	34,7	11,0	71,5	31,7	0,5	8,00

He- hemácias, Hto-hematócrito, Hb-hemoglobina, VCM-volume corpuscular médio, CHCM-concentração de hemoglobina média, Plq-plaqueta, Ret-reticulócitos

APÊNDICE B

Eritrogramas, contagens de reticulócitos e de plaquetas dos animais experimentais (G1= animais 1, 2, 3 e 4 e GC= animais 5, 6 e 7), durante as fases pré e pós-experimentais.

Cães	Colheita	He ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	CHCM (%)	Ret.Rel. (%)	Ret.Abs. (μl)	Plaquetas (μl)
1	0	6370	12,2	38,4	60,3	31,7	0,6	38220	531000
2	0	5700	11,6	35,4	62,1	32,7	0,6	34200	336000
3	0	6300	12,2	38,6	61,2	31,6	1	63000	257000
4	0	6170	13	39,2	63,5	33,2	0,4	24680	248000
5	0	6190	12,4	38,2	61,7	32,5	0,7	43330	342000
6	0	5740	11,7	36,3	63,2	32,2	0,8	45920	210000
7	0	5760	11,8	36,3	63	32,5	0,9	51840	218000
1	1	6160	13,2	38,6	62,6	34,1	*	*	422000
2	1	5970	11,8	35,2	58,9	33,5	*	*	420000
3	1	6590	13,2	39,7	60,2	33,2	*	*	459000
4	1	5910	12,5	36,6	62	34,1	*	*	479000
5	1	6730	14	41,2	61,5	34	*	*	371000
6	1	5690	11,8	35,5	63,4	33,2	*	*	390000
7	1	5660	11,8	34,9	61,6	33,8	*	*	305000
1	2	4880	10	31,1	63,7	32,1	*	*	87000
2	2	5170	10	30,9	59,7	32,3	*	*	152000
3	2	5230	10,1	31,8	60,8	31,7	*	*	177000
4	2	4830	10	30,3	62,7	33	*	*	121000
5	2	5110	10,4	32,3	63,3	32,2	*	*	297000
6	2	4930	10,1	31,5	63,9	32,1	*	*	272000
7	2	5710	11,7	36,3	63,7	32,2	*	*	276000
1	3	3850	8,3	24,2	62,8	34,3	0,4	15400	28000
2	3	5060	9,9	30	59,3	33	0,3	15180	99000
3	3	4600	9,1	27,5	59,8	33,1	0,3	13800	73000
4	3	4170	8,6	26,1	62,5	32,9	0,2	8340	15000
5	3	4650	9,7	29,4	63,2	33	1,5	69750	244000
6	3	4930	10,2	31,6	64,1	32,3	*	*	311000
7	3	6550	13,5	41,8	63,8	32,3	1,6	109385	323000
1	4	3950	8,5	25	63,3	34	0,7	27650	30000
2	4	4480	8,9	27	60,2	32,9	1,1	49280	35000
3	4	3700	7,4	22	59,4	33,6	0,5	18500	28000
4	4	3650	7,8	23	63	33,9	0,4	14600	22000
5	4	5050	10,7	32	64	33,4	0,8	40400	323000
6	4	4800	10,1	31	64,6	32,5	0,8	38400	207000
7	4	6210	12,9	40	64,5	32,2	0,9	55890	352000
1	5	3530	7,2	22	62,3	32,7	0,9	31770	21000
2	5	4000	7,7	24	60	32	1,1	44000	50000
3	5	3280	6,2	20	60,9	31	0,8	26240	27000
4	5	2980	6,1	18	60,4	33,8	0,6	17880	32000
5	5	5010	10,2	31	62	32,9	0,7	35070	353000
6	5	5600	11,8	36	64,3	32,7	0,9	50400	307000
7	5	6390	13,9	41	64,1	33,9	1	63900	369000
1	6	5560	11,6	36	64,7	32,2	0,7	38920	40000
2	6	4440	8,4	26	58,5	32,3	0,6	26640	53000
3	6	5970	11,8	37	61,9	31,9	0,9	53730	41000

Eritrogramas, contagens de reticulócitos e de plaquetas dos animais experimentais (G1= animais 1, 2, 3 e 4 e GC= animais 5, 6 e 7), durante as fases pré e pós-experimentais.

Cães	Colheita	He (x10 ³ /μl)	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	CHCM (%)	Ret.Rel (%)	Ret.Abs. (/μl)	Plaquetas (/μl)
4	6	5100	10,6	32	62,7	33,1	1,1	56100	21000
5	6	4870	10,1	31	63,6	32,5	0,9	43830	297000
6	6	5550	11,5	35	63	32,8	1,2	66600	272000
7	6	6550	13,6	43	65,6	31,6	0,7	45850	390000
1	7	6820	14,3	45	66	31,8	0,9	61380	22000
2	7	4510	8,7	26	57,8	33,5	1,1	49610	73000
3	7	3780	7,5	24	63,5	31,2	1,8	68040	53000
4	7	2700	5,7	17	63	33,5	2,5	67500	11000
5	7	5670	11,7	36	63,5	32,5	0,5	28350	309000
6	7	5000	10,4	31	62	33,5	0,9	45000	265000
7	7	6320	13,2	41	64,9	32,2	0,7	44240	418000
1	8	3540	7,2	23	64,9	31,3	1,5	53100	67000
2	8	3900	7,1	23	58,9	30,8	2,1	81900	151000
3	8	2950	5,8	19	64,4	30,5	2,5	73750	53000
4	8	2990	6,2	19	63,5	32,6	2,5	74750	34000
5	8	6370	13	41	64,3	31,7	0,9	57330	410000
6	8	5760	11,6	37	64,2	31,3	0,8	46080	333000
7	8	6450	13,2	42	65,1	31,4	0,9	58050	464000
1	9	3360	6,8	22,2	66	30,6	1,5	50400	46000
2	9	4310	7,8	25,7	59,6	30,3	3	129300	181000
3	9	3680	7,2	24,1	65,5	29,9	1,4	51520	77000
4	9	3290	6,6	21,4	65	30,8	2	65800	2700
5	9	5850	11,9	37,1	63,4	32,1	0,9	52650	340000
6	9	6000	12,1	38,8	64,6	31,4	1,5	90000	354000
7	9	6300	12,8	41,2	65,4	31	0,9	56700	363000
1	10	3330	6,9	22	66	31,4	1	33300	18000
2	10	3910	7,2	23	58,8	31,3	1	39100	191000
3	10	3940	7,9	26	66	30,4	1,7	66980	41000
4	10	*	*	*	*	*	2,8	*	21000
5	10	6110	12,6	39	63,8	32,3	1	61100	226000
6	10	5710	11,6	36	63	32,2	0,9	51390	350000
7	10	6470	13,4	42	64,9	31,9	0,5	32350	418000

APÊNDICE C

Média da contagem percentual imunofenotípica do infiltrado inflamatório mononuclear, nas diferentes regiões do bulbo ocular, de cães experimentalmente (PA1, PA2, PA3 e PA4) e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (1, 2, 3 e 4) e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (A, B, C, D e E)

CD3	ÂNGULO IRIDOCORNEAL	CORIODE	CORPO CILAR	RETINA	IRIS	LIMBO
PA1	57,3	61,3	61,6	49,6	68,6	63,2
PA2	63	56,6	51,3	64	55,3	56,4
PA3	52	57,3	45	54,2	54,6	41,6
PA4	41,6	48,5	42,3	63,2	65,3	62
1	71,6	52,3	77,3	53,5	57,3	70,6
2	62,3	63	65,6	42,5	45,6	86
3	60	61,3	66	40	69,3	53,3
4	46,6	44,6	44,6	42,6	54	56
A	60,6	60	58,4	54,6	58	60,6
B	53	72	64	50,6	54,3	68,6
C	58	61	72	52,3	63,4	59,6
D	60,2	75,6	54	61	56,3	58,7
E	68	59	66,6	63	57,3	66
CD79						
PA1	16,5	0	12,5	4,5	9,2	17,5
PA2	10,4	11,1	12,7	5,2	12,4	16
PA3	12,3	9,8	7,2	5,3	7,4	19,3
PA4	6,8	6,3	6,3	6,3	3,7	14,3
1	28,3	15	12,6	13	9	13,2
2	21,4	17,3	12,3	8,3	15,3	0
3	16,3	14,2	9,4	0	21,7	26,3
4	7,2	5,2	16,3	12	6,7	18
A	12,56	15	14,3	12,2	19,4	29,8
B	23,9	13,4	15,7	15,7	29,3	20,5
C	16,7	25	20,3	3,4	8,9	22,23
D	4,8	26,2	17,3	12,5	10,1	20,9
E	4,3	7,8	15,2	7,7	10,4	16
IgG2						
PA1	13,3	0	9,3	3,4	8,3	12,5
PA2	7,6	8,3	10,6	4,5	9,6	14,3
PA3	10,2	6,7	3,5	3,3	5	18,4
PA4	4,2	5,3	4,2	0	3,2	12,6
1	17,4	12,5	11,3	12	5,6	12,8
2	19,3	15	14,2	9,4	12,3	6
3	14,3	6	10,7	1,3	23	24
4	4,3	4,2	14,3	8,4	6,5	13,1
A	13,7	15,9	12,1	10,3	16,2	15
B	14,5	12	12,1	13,5	25,3	14,4
C	9,2	21	18,56	4,3	7,9	16,9
D	4,8	26,8	16,8	7,1	11,2	16,6
E	5,2	8,2	18,7	0	10,3	10,1

Média da contagem percentual imunofenotípica do infiltrado inflamatório mononuclear, nas diferentes regiões do bulbo ocular, de cães experimentalmente (PA1, PA2, PA3 e PA4) e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (1, 2, 3 e 4) e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (A, B, C, D e E)

	ÂNGULO IRIDOCORNEAL	CORIODE	CORPO CILAR	RETINA	IRIS	LIMBO
IgG1						
PA1	2	0	2,1	1,1	1,2	3,2
PA2	4,4	2,1	1,5	1,3	2,9	1,1
PA3	2,2	3,1	2,1	0	2,1	0,9
PA4	1	0	3,2	0	1,1	3,9
1	0	0	0	1,1	0	3,8
2	2,2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1,2	1,3
4	2,1	1,2	2,3	4	0	2,3
A	0	0	0	0	2,2	3,3
B	2,1	0	3,7	2,1	3,1	0
C	1,2	0	3	1,6	1,8	3,4
D	2,3	0	2,2	1,3	2,2	2,3
E	1,1	0	3,1	0	1,6	2,1
TAL1B5						
PA1	63,3	3,4	23,3	40,6	63,6	22,6
PA2	64,3	26,3	68,3	68	76,3	30,3
PA3	66,3	67,3	74,3	44	62,3	74,3
PA4	71,3	46,3	82,3	50	65	47,6
1	62,4	15,4	74,4	65,3	57,8	46,7
2	12,3	10,3	28,3	20,2	33,8	34,5
3	78,8	34,3	82,4	84,3	89,7	75,6
4	26,7	13,4	55,3	76,7	72,2	33,2
A	50,6	46,3	58	72,3	73	55,3
B	71,3	41,3	71,3	85	76,3	84,3
C	61	20,3	65,6	41	37	81,3
D	34	32	27	21,3	20,6	50,3
E	48	55,6	79,6	51,6	73,3	80,6
MAC387						
PA1	0	0	0	0	0	0
PA2	0	0	0	0	0	0
PA3	0	0	0	0	0	0
PA4	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0
CD4						
PA1	16,2	21,3	18,3	10,2	15,7	15,7
PA2	10,1	12,2	20,0	13,2	11,2	12,2
PA3	9,2	13,0	12,2	15,6	13,6	13,4
PA4	11,6	16,0	10,2	21,3	19,3	23,3

Média da contagem percentual imunofenotípica do infiltrado inflamatório mononuclear, nas diferentes regiões do bulbo ocular, de cães experimentalmente (PA1, PA2, PA3 e PA4) e naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* (1, 2, 3 e 4) e cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (A, B, C, D e E)

	ÂNGULO IRIDOCORNEAL	CORIOIDE	CORPO CILAR	RETINA	IRIS	LIMBO
1	15,6	9,6	21,3	13,5	16,2	18,6
2	12,6	11,5	17,2	10,7	8,7	25,7
3	13,2	20,3	21,5	8,3	25,6	15,6
4	18,5	15,3	13,2	11,2	21,3	18,6
A	10,2	15,2	11,6	13,5	12,6	16,3
B	15,6	23,6	16,5	11,6	13,6	21,3
C	8,7	12,3	18,3	15,7	18,3	11,5
D	12,3	23,6	16,3	16,7	14,7	11,6
E	17,5	13,4	18,6	12,3	11,4	18,3
CD8						
PA1	45,7	51,2	39,8	50,6	47,8	43,1
PA2	53,2	45,3	37,8	45,7	42,7	47,7
PA3	45,7	32,7	42,3	32,6	42,6	32,3
PA4	32,5	33,2	36,2	42,3	41,6	38,6
1	55,2	43,2	52,2	42,1	41,2	50,3
2	47,3	51,2	48,6	32,3	35,3	58,7
3	45,3	41,7	43,6	33,3	42,6	40,2
4	30,3	31,2	30,2	30,2	32,1	36,2
A	48,3	42,3	46,3	40,3	45,3	45,6
B	40,2	48,7	46,3	39,5	42,2	47,2
C	48,3	46,7	53,2	36,3	43,6	47,3
D	48,3	50,3	37,6	43,2	40,3	44,3
E	51,3	44,6	49,3	49,7	44,4	46,6

APÊNDICE D

Comparação de todas as imunomarcações realizadas entre os grupos nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

CD3-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	-6,65	1,607	P > 0.05	-22.70 to 9.397
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-6,485	1,652	P > 0.05	-21.71 to 8.739
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	0,165	0,04202	P > 0.05	-15.06 to 15.39
G1-Coriode vs G2-Coriode	0,625	0,1698	P > 0.05	-13.65 to 14.90
G1-Coriode vs G3-Coriode	-9,595	2,747	P > 0.05	-23.14 to 3.946
G2-Coriode vs G3-Coriode	-10,22	2,926	P > 0.05	-23.76 to 3.321
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	-13,33	2,698	P > 0.05	-32.47 to 5.825
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-12,95	2,764	P > 0.05	-31.12 to 5.217
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	0,375	0,08003	P > 0.05	-17.79 to 18.54
G1-Iris vs G2-Iris	4,4	1,263	P > 0.05	-9.105 to 17.90
G1-Iris vs G3-Iris	3,09	0,9351	P > 0.05	-9.722 to 15.90
G2-Iris vs G3-Iris	-1,31	0,3964	P > 0.05	-14.12 to 11.50
G1-Limbo vs G2-Limbo	-10,68	2,081	P > 0.05	-30.56 to 9.212
G1-Limbo vs G3-Limbo	-6,9	1,418	P > 0.05	-25.77 to 11.97
G2-Limbo vs G3-Limbo	3,775	0,7758	P > 0.05	-15.09 to 22.64

CD3-Dunn's Multiple Comparison Test

	Difference in rank sum	P value	Summary
G1-Retina vs G2-Retina	6	P > 0.05	ns
G1-Retina vs G3-Retina	1,05	P > 0.05	ns
G2-Retina vs G3-Retina	-4,95	P > 0.05	ns

CD79-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	-6,8	1,818	P > 0.05	-21.30 to 7.705
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-0,952	0,2682	P > 0.05	-14.71 to 12.81
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	5,848	1,648	P > 0.05	-7.913 to 19.61
G1-Coriode vs G2-Coriode	-6,125	1,918	P > 0.05	-18.50 to 6.254
G1-Coriode vs G3-Coriode	-10,68	3,526	P > 0.05	-22.42 to 1.064
G2-Coriode vs G3-Coriode	-4,555	1,504	P > 0.05	-16.30 to 7.189
G1-Iris vs G2-Iris	-5	1,443	P > 0.05	-18.44 to 8.436
G1-Iris vs G3-Iris	-7,445	2,265	P > 0.05	-20.19 to 5.301
G2-Iris vs G3-Iris	-2,445	0,7437	P > 0.05	-15.19 to 10.30
G1-Retina vs G2-Retina	-3	1,347	P > 0.05	-11.63 to 5.632

Comparação de todas as imunomarcações realizadas entre os grupos nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

CD79-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Retina vs G3-Retina	-4,975	2,355	P > 0.05	-13.16 to 3.214
G2-Retina vs G3-Retina	-1,975	0,935	P > 0.05	-10.16 to 6.214
G1-Limbo vs G2-Limbo	2,4	0,6948	P > 0.05	-10.99 to 15.79
G-Limbo vs G3-Limbo	-5,111	1,56	P > 0.05	-17.82 to 7.594
G2-Limbo vs G3-Limbo	-7,511	2,292	P > 0.05	-20.22 to 5.194

CD79-Dunn's Multiple Comparison Test

	Difference in rank sum	P value	Summary
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	-2,25	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-6,65	P < 0.05	*
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-4,4	P > 0.05	ns

IgG2-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	-5	1,954	P > 0.05	-14.92 to 4.919
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-0,655	0,2699	P > 0.05	-10.07 to 8.755
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	4,345	1,79	P > 0.05	-5.065 to 13.76
G1-Retina vs G2-Retina	-4,975	2,322	P > 0.05	-13.28 to 3.331
G1-Retina vs G3-Retina	-4,24	2,086	P > 0.05	-12.12 to 3.640
G2-Retina vs G3-Retina	0,735	0,3616	P > 0.05	-7.145 to 8.615
G1-Iris vs G2-Iris	-5,325	1,665	P > 0.05	-17.73 to 7.077
G1-Iris vs G3-Iris	-7,655	2,522	P > 0.05	-19.42 to 4.111
G2-Iris vs G3-Iris	-2,33	0,7678	P > 0.05	-14.10 to 9.436
G1-Limbo vs G2-Limbo	0,475	0,2031	P > 0.05	-8.593 to 9.543
G1-Limbo vs G3-Limbo	-0,15	0,0676	P > 0.05	-8.753 to 8.453
G2-Limbo vs G3-Limbo	-0,625	0,2817	P > 0.05	-9.228 to 7.978

IgG2-Dunn's Multiple Comparison Test

	Difference in rank sum	P value	Summary
G1-Coriode vs G2-Coriode	-2,25	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G3-Coriode	-6	P > 0.05	ns
G2-Coriode vs G3-Coriode	-3,75	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	-5	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-7,7	P < 0.01	**
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-2,7	P > 0.05	ns

IgG1-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	1,325	2,227	P > 0.05	-0.9817 to 3.632
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	1,06	1,878	P > 0.05	-1.128 to 3.248
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-0,265	0,4695	P > 0.05	-2.453 to 1.923
G1-Coriode vs G2-Coriode	1	2,19	P > 0.05	-0.7703 to 2.770
G1-Coriode vs G3-Coriode	1,3	3,001	P > 0.05	-0.3795 to 2.979
G2-Coriode vs G3-Coriode	0,3	0,6925	P > 0.05	-1.379 to 1.979
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	1,65	2,808	P > 0.05	-0.6285 to 3.928

Comparação de todas as imunomarcações realizadas entre os grupos nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

IgG1-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-0,175	0,3139	P > 0.05	-2.337 to 1.987
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-1,825	3,273	P > 0.05	-3.987 to 0.3365
G1-Retina vs G2-Retina	-0,675	1,073	P > 0.05	-3.114 to 1.764
G1-Retina vs G3-Retina	-0,4	0,6703	P > 0.05	-2.714 to 1.914
G2-Retina vs G3-Retina	0,275	0,4608	P > 0.05	-2.039 to 2.589
G1-Limbo vs G2-Limbo	0,425	0,573	P > 0.05	-2.451 to 3.301
G1-Limbo vs G3-Limbo	0,055	0,07816	P > 0.05	-2.673 to 2.783
G2-Limbo vs G3-Limbo	-0,37	0,5258	P > 0.05	-3.098 to 2.358

IgG1-Dunn's Multiple Comparison Test

	Difference in rank sum	P value	Summary
G1-Iris vs G2-Iris	4,75	P > 0.05	ns
G1-Iris vs G3-Iris	-2,175	P > 0.05	ns
G2-Iris vs G3-Iris	-6,925	P < 0.05	*

TAL1B5-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	21,25	2,216	P > 0.05	-15.93 to 58.43
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	13,32	1,464	P > 0.05	-21.95 to 48.59
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-7,93	0,8717	P > 0.05	-43.20 to 27.34
G1-Coriode vs G2-Coriode	17,48	1,916	P > 0.05	-17.89 to 52.84
G1-Coriode vs G3-Coriode	-3,275	0,3785	P > 0.05	-36.82 to 30.27
G2-Coriode vs G3-Coriode	-20,75	2,398	P > 0.05	-54.30 to 12.80
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	1,95	0,1667	P > 0.05	-43.40 to 47.30
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	1,75	0,1577	P > 0.05	-41.27 to 44.77
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-0,2	0,01802	P > 0.05	-43.22 to 42.82
G1-Retina vs G2-Retina	-10,98	0,9396	P > 0.05	-56.26 to 34.31
G1-Retina vs G3-Retina	-3,59	0,324	P > 0.05	-46.55 to 39.37
G2-Retina vs G3-Retina	7,385	0,6665	P > 0.05	-35.58 to 50.35
G1-Iris vs G2-Iris	3,425	0,326	P > 0.05	-37.31 to 44.16
G1-Iris vs G3-Iris	10,76	1,08	P > 0.05	-27.88 to 49.40
G2-Iris vs G3-Iris	7,335	0,7359	P > 0.05	-31.31 to 45.98
G1-Limbo vs G2-Limbo	-3,8	0,3905	P > 0.05	-41.53 to 33.93
G1-Limbo vs G3-Limbo	-26,66	2,888	P > 0.05	-62.45 to 9.133
G2-Limbo vs G3-Limbo	-22,86	2,476	P > 0.05	-58.65 to 12.93

CD8-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	-0,25	0,06369	P > 0.05	-15.47 to 14.97
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-3,005	0,8069	P > 0.05	-17.44 to 11.43
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-2,755	0,7398	P > 0.05	-17.19 to 11.68
G1-Coriode vs G2-Coriode	-1,225	0,3483	P > 0.05	-14.86 to 12.41
G1-Coriode vs G3-Coriode	-5,92	1,774	P > 0.05	-18.86 to 7.017
G2-Coriode vs G3-Coriode	-4,695	1,407	P > 0.05	-17.63 to 8.242
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	-4,625	1,408	P > 0.05	-17.36 to 8.106

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **entre os grupos** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

CD8-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-7,515	2,412	P > 0.05	-19.59 to 4.563
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-2,89	0,9277	P > 0.05	-14.97 to 9.188
G1-Retina vs G2-Retina	8,325	2,782	P > 0.05	-3.277 to 19.93
G1-Retina vs G3-Retina	1	0,3522	P > 0.05	-10.01 to 12.01
G2-Retina vs G3-Retina	-7,325	2,58	P > 0.05	-18.33 to 3.682
G1-Iris vs G2-Iris	5,875	3,508	P > 0.05	-0.6177 to 12.37
G1-Iris vs G3-Iris	0,515	0,3242	P > 0.05	-5.644 to 6.674
G2-Iris vs G3-Iris	-5,36	3,374	P > 0.05	-11.52 to 0.7995
G1-Limbo vs G2-Limbo	-5,925	1,777	P > 0.05	-18.85 to 7.003
G1-Limbo vs G3-Limbo	-5,775	1,826	P > 0.05	-18.04 to 6.489
G2-Limbo vs G3-Limbo	0,15	0,04742	P > 0.05	-12.11 to 12.41

CD4-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G2-Ang Irid	-3,2	1,981	P > 0.05	-9.463 to 3.063
G1-Ang Irid vs G3-Ang Irid	-1,085	0,708	P > 0.05	-7.027 to 4.857
G2-Ang Irid vs G3-Ang Irid	2,115	1,38	P > 0.05	-3.827 to 8.057
G1-Coriode vs G2-Coriode	1,45	0,5903	P > 0.05	-8.073 to 10.97
G1-Coriode vs G3-Coriode	-1,995	0,8562	P > 0.05	-11.03 to 7.039
G2-Coriode vs G3-Coriode	-3,445	1,478	P > 0.05	-12.48 to 5.589
G1-C Ciliar vs G2-C Ciliar	-3,125	1,644	P > 0.05	-10.49 to 4.244
G1-C Ciliar vs G3-C Ciliar	-1,085	0,6017	P > 0.05	-8.076 to 5.906
G2-C Ciliar vs G3-C Ciliar	2,04	1,131	P > 0.05	-4.951 to 9.031
G1-Retina vs G2-Retina	4,15	2,638	P > 0.05	-1.950 to 10.25
G1-Retina vs G3-Retina	1,115	0,747	P > 0.05	-4.672 to 6.902
G2-Retina vs G3-Retina	-3,035	2,033	P > 0.05	-8.822 to 2.752
G1-Iris vs G2-Iris	-3	1,275	P > 0.05	-12.12 to 6.124
G1-Iris vs G3-Iris	0,83	0,3718	P > 0.05	-7.826 to 9.486
G2-Iris vs G3-Iris	3,83	1,716	P > 0.05	-4.826 to 12.49
G1-Limbo vs G2-Limbo	-3,475	1,544	P > 0.05	-12.20 to 5.250
G1-Limbo vs G3-Limbo	0,35	0,1639	P > 0.05	-7.927 to 8.627
G2-Limbo vs G3-Limbo	3,825	1,792	P > 0.05	-4.452 to 12.10

APÊNDICE E

Comparação de todas as imunomarcações realizadas dentro do mesmo grupo nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.:

CD3-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	-2,45	0,6135	P > 0.05	-20.40 to 15.50
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	3,425	0,8577	P > 0.05	-14.52 to 21.37
G1-Ang Irid vs G1-Retina	-4,275	1,071	P > 0.05	-22.22 to 13.67
G1-Ang Irid vs G1-Iris	-7,475	1,872	P > 0.05	-25.42 to 10.47
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	-2,325	0,5822	P > 0.05	-20.27 to 15.62
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	5,875	1,471	P > 0.05	-12.07 to 23.82
G1-Coriode vs G1-Retina	-1,825	0,457	P > 0.05	-19.77 to 16.12
G1-Coriode vs G1-Iris	-5,025	1,258	P > 0.05	-22.97 to 12.92
G1-Coriode vs G1-Limbo	0,125	0,0313	P > 0.05	-17.82 to 18.07
G1-C Ciliar vs G1-Retina	-7,7	1,928	P > 0.05	-25.65 to 10.25
G1-C Ciliar vs G1-Iris	-10,9	2,73	P > 0.05	-28.85 to 7.050
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	-5,75	1,44	P > 0.05	-23.70 to 12.20
G1-Retina vs G1-Iris	-3,2	0,8013	P > 0.05	-21.15 to 14.75
G1-Retina vs G1-Limbo	1,95	0,4883	P > 0.05	-16.00 to 19.90
G1-Iris vs G1-Limbo	5,15	1,29	P > 0.05	-12.80 to 23.10

CD3-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	4,825	0,8776	P > 0.05	-19.89 to 29.54
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	-3,25	0,5912	P > 0.05	-27.96 to 21.46
G2-Ang Irid vs G2-Retina	15,48	2,815	P > 0.05	-9.237 to 40.19
G2-Ang Irid vs G2-Iris	3,575	0,6503	P > 0.05	-21.14 to 28.29
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	-6,35	1,155	P > 0.05	-31.06 to 18.36
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	-8,075	1,469	P > 0.05	-32.79 to 16.64
G2-Coriode vs G2-Retina	10,65	1,937	P > 0.05	-14.06 to 35.36
G2-Coriode vs G2-Iris	-1,25	0,2274	P > 0.05	-25.96 to 23.46
G2-Coriode vs G2-Limbo	-11,18	2,033	P > 0.05	-35.89 to 13.54
G2-C Ciliar vs G2-Retina	18,73	3,406	P > 0.05	-5.987 to 43.44
G2-C Ciliar vs G2-Iris	6,825	1,241	P > 0.05	-17.89 to 31.54
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	-3,1	0,5639	P > 0.05	-27.81 to 21.61
G2-Retina vs G2-Iris	-11,9	2,165	P > 0.05	-36.61 to 12.81
G2-Retina vs G2-Limbo	-21,83	3,97	P > 0.05	-46.54 to 2.887
G2-Iris vs G2-Limbo	-9,925	1,805	P > 0.05	-34.64 to 14.79

CD3-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	-5,56	2,165	P > 0.05	-16.79 to 5.673
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	-3,04	1,184	P > 0.05	-14.27 to 8.193
G3-Ang Irid vs G3-Retina	3,66	1,425	P > 0.05	-7.573 to 14.89
G3-Ang Irid vs G3-Iris	2,1	0,8176	P > 0.05	-9.133 to 13.33
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	-2,74	1,067	P > 0.05	-13.97 to 8.493
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	2,52	0,9811	P > 0.05	-8.713 to 13.75

Comparação de todas as imunomarcações realizadas dentro do mesmo grupo nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.:

CD3-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Coriode vs G3-Retina	9,22	3,589	P > 0.05	-2.013 to 20.45
G3-Coriode vs G3-Iris	7,66	2,982	P > 0.05	-3.573 to 18.89
G3-Coriode vs G3-Limbo	2,82	1,098	P > 0.05	-8.413 to 14.05
G3-C Ciliar vs G3-Retina	6,7	2,608	P > 0.05	-4.533 to 17.93
G3-C Ciliar vs G3-Iris	5,14	2,001	P > 0.05	-6.093 to 16.37
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	0,3	0,1168	P > 0.05	-10.93 to 11.53
G3-Retina vs G3-Iris	-1,56	0,6073	P > 0.05	-12.79 to 9.673
G3-Retina vs G3-Limbo	-6,4	2,492	P > 0.05	-17.63 to 4.833
G3-Iris vs G3-Limbo	-4,84	1,884	P > 0.05	-16.07 to 6.393

CD79-Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	6,25	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	1,75	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-Retina	10,5	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-Iris	4,75	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	-6,75	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	-4,5	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-Retina	4,25	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-Iris	-1,5	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-Limbo	-13	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G1-Retina	8,75	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G1-Iris	3	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	-8,5	P > 0.05	ns
G1-Retina vs G1-Iris	-5,75	P > 0.05	ns
G1-Retina vs G1-Limbo	-17,25	P < 0.01	**
G1-Iris vs G1-Limbo	-11,5	P > 0.05	ns

CD79-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	5,375	1,48	P > 0.05	-10.95 to 21.70
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	5,65	1,555	P > 0.05	-10.68 to 21.98
G2-Ang Irid vs G2-Retina	9,975	2,746	P > 0.05	-6.354 to 26.30
G2-Ang Irid vs G2-Iris	5,125	1,411	P > 0.05	-11.20 to 21.45
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	3,925	1,08	P > 0.05	-12.40 to 20.25
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	0,275	0,0757	P > 0.05	-16.05 to 16.60
G2-Coriode vs G2-Retina	4,6	1,266	P > 0.05	-11.73 to 20.93
G2-Coriode vs G2-Iris	-0,25	0,06882	P > 0.05	-16.58 to 16.08
G2-Coriode vs G2-Limbo	-1,45	0,3991	P > 0.05	-17.78 to 14.88
G2-C Ciliar vs G2-Retina	4,325	1,191	P > 0.05	-12.00 to 20.65
G2-C Ciliar vs G2-Iris	-0,525	0,1445	P > 0.05	-16.85 to 15.80
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	-1,725	0,4749	P > 0.05	-18.05 to 14.60
G2-Retina vs G2-Iris	-4,85	1,335	P > 0.05	-21.18 to 11.48
G2-Retina vs G2-Limbo	-6,05	1,665	P > 0.05	-22.38 to 10.28
G2-Iris vs G2-Limbo	-1,2	0,3303	P > 0.05	-17.53 to 15.13

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

CD79-Tukey's Multiple Comparison

Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	-5,028	1,706	P > 0.05	-17.91 to 7.858
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	-4,108	1,394	P > 0.05	-16.99 to 8.778
G3-Ang Irid vs G3-Retina	2,152	0,7303	P > 0.05	-10.73 to 15.04
G3-Ang Irid vs G3-Iris	-3,168	1,075	P > 0.05	-16.05 to 9.718
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	-9,434	3,201	P > 0.05	-22.32 to 3.452
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	0,92	0,3122	P > 0.05	-11.97 to 13.81
G3-Coriode vs G3-Retina	7,18	2,437	P > 0.05	-5.706 to 20.07
G3-Coriode vs G3-Iris	1,86	0,6312	P > 0.05	-11.03 to 14.75
G3-Coriode vs G3-Limbo	-4,406	1,495	P > 0.05	-17.29 to 8.480
G3-C Ciliar vs G3-Retina	6,26	2,124	P > 0.05	-6.626 to 19.15
G3-C Ciliar vs G3-Iris	0,94	0,319	P > 0.05	-11.95 to 13.83
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	-5,326	1,807	P > 0.05	-18.21 to 7.560
G3-Retina vs G3-Iris	-5,32	1,805	P > 0.05	-18.21 to 7.566
G3-Retina vs G3-Limbo	-11,59	3,932	P > 0.05	-24.47 to 1.300
G3-Iris vs G3-Limbo	-6,266	2,126	P > 0.05	-19.15 to 6.620

Test	Difference in rank		Summary
	sum	P value	
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	5,375	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	3	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-Retina	10,25	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-Iris	4	P > 0.05	ns
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	-6,875	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	-2,375	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-Retina	4,875	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-Iris	-1,375	P > 0.05	ns
G1-Coriode vs G1-Limbo	-12,25	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G1-Retina	7,25	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G1-Iris	1	P > 0.05	ns
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	-9,875	P > 0.05	ns
G1-Retina vs G1-Iris	-6,25	P > 0.05	ns
G1-Retina vs G1-Limbo	-17,13	P < 0.01	**
G1-Iris vs G1-Limbo	-10,88	P > 0.05	ns

IgG2-Tukey's Multiple Comparison Test

Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	4,4	1,47	P > 0.05	-9.057 to 17.86
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	1,2	0,4008	P > 0.05	-12.26 to 14.66
G2-Ang Irid vs G2-Retina	6,05	2,021	P > 0.05	-7.407 to 19.51
G2-Ang Irid vs G2-Iris	1,975	0,6597	P > 0.05	-11.48 to 15.43
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	-0,15	0,05011	P > 0.05	-13.61 to 13.31
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	-3,2	1,069	P > 0.05	-16.66 to 10.26
G2-Coriode vs G2-Retina	1,65	0,5512	P > 0.05	-11.81 to 15.11
G2-Coriode vs G2-Iris	-2,425	0,81	P > 0.05	-15.88 to 11.03
G2-Coriode vs G2-Limbo	-4,55	1,52	P > 0.05	-18.01 to 8.907
G2-C Ciliar vs G2-Retina	4,85	1,62	P > 0.05	-8.607 to 18.31
G2-C Ciliar vs G2-Iris	0,775	0,2589	P > 0.05	-12.68 to 14.23
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	-1,35	0,4509	P > 0.05	-14.81 to 12.11
G2-Retina vs G2-Iris	-4,075	1,361	P > 0.05	-17.53 to 9.382

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

IgG2-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Retina vs G2-Limbo	-6,2	2,071	P > 0.05	-19.66 to 7.257
G2-Iris vs G2-Limbo	-2,125	0,7098	P > 0.05	-15.58 to 11.33

IgG2-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	-7,3	3,082	P > 0.05	-17.66 to 3.059
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	-6,172	2,606	P > 0.05	-16.53 to 4.187
G3-Ang Irid vs G3-Retina	2,44	1,03	P > 0.05	-7.919 to 12.80
G3-Ang Irid vs G3-Iris	-4,7	1,984	P > 0.05	-15.06 to 5.659
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	-5,12	2,161	P > 0.05	-15.48 to 5.239
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	1,128	0,4762	P > 0.05	-9.231 to 11.49
G3-Coriode vs G3-Retina	9,74	4,112	P > 0.05	-0.6187 to 20.10
G3-Coriode vs G3-Iris	2,6	1,098	P > 0.05	-7.759 to 12.96
G3-Coriode vs G3-Limbo	2,18	0,9203	P > 0.05	-8.179 to 12.54
G3-C Ciliar vs G3-Retina	8,612	3,636	P > 0.05	-1.747 to 18.97
G3-C Ciliar vs G3-Iris	1,472	0,6214	P > 0.05	-8.887 to 11.83
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	1,052	0,4441	P > 0.05	-9.307 to 11.41
G3-Retina vs G3-Iris	-7,14	3,014	P > 0.05	-17.50 to 3.219
G3-Retina vs G3-Limbo	-7,56	3,192	P > 0.05	-17.92 to 2.799
G3-Iris vs G3-Limbo	-0,42	0,1773	P > 0.05	-10.78 to 9.939

IgG1-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	1,1	1,856	P > 0.05	-1.565 to 3.765
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	0,175	0,2952	P > 0.05	-2.490 to 2.840
G1-Ang Irid vs G1-Retina	1,8	3,036	P > 0.05	-0.8647 to 4.465
G1-Ang Irid vs G1-Iris	0,575	0,97	P > 0.05	-2.090 to 3.240
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	0,125	0,2109	P > 0.05	-2.540 to 2.790
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	-0,925	1,56	P > 0.05	-3.590 to 1.740
G1-Coriode vs G1-Retina	0,7	1,181	P > 0.05	-1.965 to 3.365
G1-Coriode vs G1-Iris	-0,525	0,8856	P > 0.05	-3.190 to 2.140
G1-Coriode vs G1-Limbo	-0,975	1,645	P > 0.05	-3.640 to 1.690
G1-C Ciliar vs G1-Retina	1,625	2,741	P > 0.05	-1.040 to 4.290
G1-C Ciliar vs G1-Iris	0,4	0,6748	P > 0.05	-2.265 to 3.065
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	-0,05	0,08434	P > 0.05	-2.715 to 2.615
G1-Retina vs G1-Iris	-1,225	2,066	P > 0.05	-3.890 to 1.440
G1-Retina vs G1-Limbo	-1,675	2,826	P > 0.05	-4.340 to 0.9897
G1-Iris vs G1-Limbo	-0,45	0,7591	P > 0.05	-3.115 to 2.215

IgG1-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	0,775	1,217	P > 0.05	-2.087 to 3.637
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	0,5	0,7852	P > 0.05	-2.362 to 3.362
G2-Ang Irid vs G2-Retina	-0,2	0,3141	P > 0.05	-3.062 to 2.662
G2-Ang Irid vs G2-Iris	0,775	1,217	P > 0.05	-2.087 to 3.637
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	-0,775	1,217	P > 0.05	-3.637 to 2.087
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	-0,275	0,4319	P > 0.05	-3.137 to 2.587
G2-Coriode vs G2-Retina	-0,975	1,531	P > 0.05	-3.837 to 1.887
G2-Coriode vs G2-Iris	0	0	P > 0.05	-2.862 to 2.862

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

IgG1-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Coriode vs G2-Limbo	-1,55	2,434	P > 0.05	-4.412 to 1.312
G2-C Ciliar vs G2-Retina	-0,7	1,099	P > 0.05	-3.562 to 2.162
G2-C Ciliar vs G2-Iris	0,275	0,4319	P > 0.05	-2.587 to 3.137
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	-1,275	2,002	P > 0.05	-4.137 to 1.587
G2-Retina vs G2-Iris	0,975	1,531	P > 0.05	-1.887 to 3.837
G2-Retina vs G2-Limbo	-0,575	0,903	P > 0.05	-3.437 to 2.287
G2-Iris vs G2-Limbo	-1,55	2,434	P > 0.05	-4.412 to 1.312

IgG1-Dunn's Multiple Comparison Test

	Difference in rank sum	P value	Summary
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	8,5	P > 0.05	ns
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	-7,6	P > 0.05	ns
G3-Ang Irid vs G3-Retina	2,7	P > 0.05	ns
G3-Ang Irid vs G3-Iris	-5,8	P > 0.05	ns
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	-6,8	P > 0.05	ns
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	-16,1	P > 0.05	ns
G3-Coriode vs G3-Retina	-5,8	P > 0.05	ns
G3-Coriode vs G3-Iris	-14,3	P > 0.05	ns
G3-Coriode vs G3-Limbo	-15,3	P > 0.05	ns
G3-C Ciliar vs G3-Retina	10,3	P > 0.05	ns
G3-C Ciliar vs G3-Iris	1,8	P > 0.05	ns
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	0,8	P > 0.05	ns
G3-Retina vs G3-Iris	-8,5	P > 0.05	ns
G3-Retina vs G3-Limbo	-9,5	P > 0.05	ns
G3-Iris vs G3-Limbo	-1	P > 0.05	ns

TAL1B5-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	30,48	3,2	P > 0.05	-12.33 to 73.28
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	4,25	0,4463	P > 0.05	-38.55 to 47.05
G1-Ang Irid vs G1-Retina	15,65	1,644	P > 0.05	-27.15 to 58.45
G1-Ang Irid vs G1-Iris	-0,5	0,05251	P > 0.05	-43.30 to 42.30
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	22,6	2,373	P > 0.05	-20.20 to 65.40
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	-26,23	2,754	P > 0.05	-69.03 to 16.58
G1-Coriode vs G1-Retina	-14,83	1,557	P > 0.05	-57.63 to 27.98
G1-Coriode vs G1-Iris	-30,98	3,253	P > 0.05	-73.78 to 11.83
G1-Coriode vs G1-Limbo	-7,875	0,827	P > 0.05	-50.68 to 34.93
G1-C Ciliar vs G1-Retina	11,4	1,197	P > 0.05	-31.40 to 54.20
G1-C Ciliar vs G1-Iris	-4,75	0,4988	P > 0.05	-47.55 to 38.05
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	18,35	1,927	P > 0.05	-24.45 to 61.15
G1-Retina vs G1-Iris	-16,15	1,696	P > 0.05	-58.95 to 26.65
G1-Retina vs G1-Limbo	6,95	0,7299	P > 0.05	-35.85 to 49.75
G1-Iris vs G1-Limbo	23,1	2,426	P > 0.05	-19.70 to 65.90

TAL1B5-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	26,7	2,238	P > 0.05	-26.93 to 80.33
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	-15,05	1,261	P > 0.05	-68.68 to 38.58

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

TAL1B5-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Retina	-16,58	1,389	P > 0.05	-70.21 to 37.06
G2-Ang Irid vs G2-Iris	-18,33	1,536	P > 0.05	-71.96 to 35.31
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	-2,45	0,2053	P > 0.05	-56.08 to 51.18
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	-41,75	3,499	P > 0.05	-95.38 to 11.88
G2-Coriode vs G2-Retina	-43,28	3,627	P > 0.05	-96.91 to 10.36
G2-Coriode vs G2-Iris	-45,02	3,774	P > 0.05	-98.66 to 8.605
G2-Coriode vs G2-Limbo	-29,15	2,443	P > 0.05	-82.78 to 24.48
G2-C Ciliar vs G2-Retina	-1,525	0,1278	P > 0.05	-55.16 to 52.11
G2-C Ciliar vs G2-Iris	-3,275	0,2745	P > 0.05	-56.91 to 50.36
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	12,6	1,056	P > 0.05	-41.03 to 66.23
G2-Retina vs G2-Iris	-1,75	0,1467	P > 0.05	-55.38 to 51.88
G2-Retina vs G2-Limbo	14,13	1,184	P > 0.05	-39.51 to 67.76
G2-Iris vs G2-Limbo	15,88	1,331	P > 0.05	-37.76 to 69.51

TAL1B5-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	13,88	1,571	P > 0.05	-24.74 to 52.50
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	-7,32	0,8288	P > 0.05	-45.94 to 31.30
G3-Ang Irid vs G3-Retina	-1,26	0,1427	P > 0.05	-39.88 to 37.36
G3-Ang Irid vs G3-Iris	-3,06	0,3465	P > 0.05	-41.68 to 35.56
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	-17,38	1,968	P > 0.05	-56.00 to 21.24
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	-21,2	2,4	P > 0.05	-59.82 to 17.42
G3-Coriode vs G3-Retina	-15,14	1,714	P > 0.05	-53.76 to 23.48
G3-Coriode vs G3-Iris	-16,94	1,918	P > 0.05	-55.56 to 21.68
G3-Coriode vs G3-Limbo	-31,26	3,539	P > 0.05	-69.88 to 7.364
G3-C Ciliar vs G3-Retina	6,06	0,6861	P > 0.05	-32.56 to 44.68
G3-C Ciliar vs G3-Iris	4,26	0,4823	P > 0.05	-34.36 to 42.88
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	-10,06	1,139	P > 0.05	-48.68 to 28.56
G3-Retina vs G3-Iris	-1,8	0,2038	P > 0.05	-40.42 to 36.82
G3-Retina vs G3-Limbo	-16,12	1,825	P > 0.05	-54.74 to 22.50
G3-Iris vs G3-Limbo	-14,32	1,621	P > 0.05	-52.94 to 24.30

CD8-Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	3,675	1,088	P > 0.05	-11.51 to 18.86
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	5,25	1,555	P > 0.05	-9.930 to 20.43
G1-Ang Irid vs G1-Retina	1,475	0,4368	P > 0.05	-13.71 to 16.66
G1-Ang Irid vs G1-Iris	0,6	0,1777	P > 0.05	-14.58 to 15.78
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	3,85	1,14	P > 0.05	-11.33 to 19.03
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	1,575	0,4664	P > 0.05	-13.61 to 16.76
G1-Coriode vs G1-Retina	-2,2	0,6514	P > 0.05	-17.38 to 12.98
G1-Coriode vs G1-Iris	-3,075	0,9105	P > 0.05	-18.26 to 12.11
G1-Coriode vs G1-Limbo	0,175	0,05182	P > 0.05	-15.01 to 15.36
G1-C Ciliar vs G1-Retina	-3,775	1,118	P > 0.05	-18.96 to 11.41
G1-C Ciliar vs G1-Iris	-4,65	1,377	P > 0.05	-19.83 to 10.53
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	-1,4	0,4145	P > 0.05	-16.58 to 13.78
G1-Retina vs G1-Iris	-0,875	0,2591	P > 0.05	-16.06 to 14.31
G1-Retina vs G1-Limbo	2,375	0,7032	P > 0.05	-12.81 to 17.56
G1-Iris vs G1-Limbo	3,25	0,9623	P > 0.05	-11.93 to 18.43

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

CD8-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	2,7	0,6427	P > 0.05	-16.18 to 21.58
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	0,875	0,2083	P > 0.05	-18.01 to 19.76
G2-Ang Irid vs G2-Retina	10,05	2,392	P > 0.05	-8.833 to 28.93
G2-Ang Irid vs G2-Iris	6,725	1,601	P > 0.05	-12.16 to 25.61
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	-1,825	0,4344	P > 0.05	-20.71 to 17.06
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	-1,825	0,4344	P > 0.05	-20.71 to 17.06
G2-Coriode vs G2-Retina	7,35	1,75	P > 0.05	-11.53 to 26.23
G2-Coriode vs G2-Iris	4,025	0,9581	P > 0.05	-14.86 to 22.91
G2-Coriode vs G2-Limbo	-4,525	1,077	P > 0.05	-23.41 to 14.36
G2-C Ciliar vs G2-Retina	9,175	2,184	P > 0.05	-9.708 to 28.06
G2-C Ciliar vs G2-Iris	5,85	1,393	P > 0.05	-13.03 to 24.73
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	-2,7	0,6427	P > 0.05	-21.58 to 16.18
G2-Retina vs G2-Iris	-3,325	0,7915	P > 0.05	-22.21 to 15.56
G2-Retina vs G2-Limbo	-11,88	2,827	P > 0.05	-30.76 to 7.008
G2-Iris vs G2-Limbo	-8,55	2,035	P > 0.05	-27.43 to 10.33

CD8-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	0,76	0,4352	P > 0.05	-6.876 to 8.396
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	0,74	0,4238	P > 0.05	-6.896 to 8.376
G3-Ang Irid vs G3-Retina	5,48	3,138	P > 0.05	-2.156 to 13.12
G3-Ang Irid vs G3-Iris	4,12	2,359	P > 0.05	-3.516 to 11.76
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	1,08	0,6185	P > 0.05	-6.556 to 8.716
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	-0,02	0,01145	P > 0.05	-7.656 to 7.616
G3-Coriode vs G3-Retina	4,72	2,703	P > 0.05	-2.916 to 12.36
G3-Coriode vs G3-Iris	3,36	1,924	P > 0.05	-4.276 to 11.00
G3-Coriode vs G3-Limbo	0,32	0,1833	P > 0.05	-7.316 to 7.956
G3-C Ciliar vs G3-Retina	4,74	2,714	P > 0.05	-2.896 to 12.38
G3-C Ciliar vs G3-Iris	3,38	1,936	P > 0.05	-4.256 to 11.02
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	0,34	0,1947	P > 0.05	-7.296 to 7.976
G3-Retina vs G3-Iris	-1,36	0,7788	P > 0.05	-8.996 to 6.276
G3-Retina vs G3-Limbo	-4,4	2,52	P > 0.05	-12.04 to 3.236
G3-Iris vs G3-Limbo	-3,04	1,741	P > 0.05	-10.68 to 4.596

CD4-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Ang Irid vs G1-Coriode	-3,85	1,818	P > 0.05	-13.37 to 5.668
G1-Ang Irid vs G1-C Ciliar	-3,4	1,606	P > 0.05	-12.92 to 6.118
G1-Ang Irid vs G1-Retina	-3,3	1,558	P > 0.05	-12.82 to 6.218
G1-Ang Irid vs G1-Iris	-3,175	1,499	P > 0.05	-12.69 to 6.343
G1-Ang Irid vs G1-Limbo	-4,375	2,066	P > 0.05	-13.89 to 5.143
G1-Coriode vs G1-C Ciliar	0,45	0,2125	P > 0.05	-9.068 to 9.968
G1-Coriode vs G1-Retina	0,55	0,2597	P > 0.05	-8.968 to 10.07
G1-Coriode vs G1-Iris	0,675	0,3188	P > 0.05	-8.843 to 10.19
G1-Coriode vs G1-Limbo	-0,525	0,2479	P > 0.05	-10.04 to 8.993
G1-C Ciliar vs G1-Retina	0,1	0,04723	P > 0.05	-9.418 to 9.618
G1-C Ciliar vs G1-Iris	0,225	0,1063	P > 0.05	-9.293 to 9.743
G1-C Ciliar vs G1-Limbo	-0,975	0,4605	P > 0.05	-10.49 to 8.543
G1-Retina vs G1-Iris	0,125	0,05903	P > 0.05	-9.393 to 9.643

Comparação de todas as imunomarcações realizadas **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA.

CD4-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1-Retina vs G1-Limbo	-1,075	0,5077	P > 0.05	-10.59 to 8.443
G1-Iris vs G1-Limbo	-1,2	0,5667	P > 0.05	-10.72 to 8.318

CD4-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G2-Ang Irid vs G2-Coriode	0,8	0,3567	P > 0.05	-9.281 to 10.88
G2-Ang Irid vs G2-C Ciliar	-3,325	1,483	P > 0.05	-13.41 to 6.756
G2-Ang Irid vs G2-Retina	4,05	1,806	P > 0.05	-6.031 to 14.13
G2-Ang Irid vs G2-Iris	-2,975	1,326	P > 0.05	-13.06 to 7.106
G2-Ang Irid vs G2-Limbo	-4,65	2,073	P > 0.05	-14.73 to 5.431
G2-Coriode vs G2-C Ciliar	-4,125	1,839	P > 0.05	-14.21 to 5.956
G2-Coriode vs G2-Retina	3,25	1,449	P > 0.05	-6.831 to 13.33
G2-Coriode vs G2-Iris	-3,775	1,683	P > 0.05	-13.86 to 6.306
G2-Coriode vs G2-Limbo	-5,45	2,43	P > 0.05	-15.53 to 4.631
G2-C Ciliar vs G2-Retina	7,375	3,288	P > 0.05	-2.706 to 17.46
G2-C Ciliar vs G2-Iris	0,35	0,1561	P > 0.05	-9.731 to 10.43
G2-C Ciliar vs G2-Limbo	-1,325	0,5908	P > 0.05	-11.41 to 8.756
G2-Retina vs G2-Iris	-7,025	3,132	P > 0.05	-17.11 to 3.056
G2-Retina vs G2-Limbo	-8,7	3,879	P > 0.05	-18.78 to 1.381
G2-Iris vs G2-Limbo	-1,675	0,7468	P > 0.05	-11.76 to 8.406

CD4-Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G3-Ang Irid vs G3-Coriode	-4,76	2,877	P > 0.05	-11.99 to 2.474
G3-Ang Irid vs G3-C Ciliar	-3,4	2,055	P > 0.05	-10.63 to 3.834
G3-Ang Irid vs G3-Retina	-1,1	0,665	P > 0.05	-8.334 to 6.134
G3-Ang Irid vs G3-Iris	-1,26	0,7617	P > 0.05	-8.494 to 5.974
G3-Ang Irid vs G3-Limbo	-2,94	1,777	P > 0.05	-10.17 to 4.294
G3-Coriode vs G3-C Ciliar	1,36	0,8221	P > 0.05	-5.874 to 8.594
G3-Coriode vs G3-Retina	3,66	2,213	P > 0.05	-3.574 to 10.89
G3-Coriode vs G3-Iris	3,5	2,116	P > 0.05	-3.734 to 10.73
G3-Coriode vs G3-Limbo	1,82	1,1	P > 0.05	-5.414 to 9.054
G3-C Ciliar vs G3-Retina	2,3	1,39	P > 0.05	-4.934 to 9.534
G3-C Ciliar vs G3-Iris	2,14	1,294	P > 0.05	-5.094 to 9.374
G3-C Ciliar vs G3-Limbo	0,46	0,2781	P > 0.05	-6.774 to 7.694
G3-Retina vs G3-Iris	-0,16	0,09672	P > 0.05	-7.394 to 7.074
G3-Retina vs G3-Limbo	-1,84	1,112	P > 0.05	-9.074 to 5.394
G3-Iris vs G3-Limbo	-1,68	1,016	P > 0.05	-8.914 to 5.554

APÊNDICE F

Comparação da imunomarcção entre CD4 e CD8 **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA. As diferença estatisticamente significante são entre as células imunomarcadas na mesma área do mesmo grupo.

Ângulo Iridocorneal - AI
Tukey's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
GC-AI-CD8 vs GC-AI-CD4	32,5	12,09	P < 0.001	17.53 to 47.47
GC-AI-CD8 vs G2-AI-CD4	29,3	10,9	P < 0.001	14.33 to 44.27
GC-AI-CD8 vs G3-AI-CD4	31,42	12,31	P < 0.001	17.21 to 45.62
G2-AI-CD8 vs GC-AI-CD4	32,75	12,18	P < 0.001	17.78 to 47.72
G2-AI-CD8 vs G2-AI-CD4	29,55	10,99	P < 0.001	14.58 to 44.52
G2-AI-CD8 vs G3-AI-CD4	31,67	12,41	P < 0.001	17.46 to 45.87
G3-AI-CD8 vs GC-AI-CD4	35,51	13,92	P < 0.001	21.30 to 49.71
G3-AI-CD8 vs G2-AI-CD4	32,31	12,66	P < 0.001	18.10 to 46.51
G3-AI-CD8 vs G3-AI-CD4	34,42	14,31	P < 0.001	21.03 to 47.81

Coróide - Cor

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
GC-Cor-CD8 vs GC-Cor-CD4	24,98	9,287	P < 0.001	10.00 to 39.95
GC-Cor-CD8 vs G2-Cor-CD4	26,43	9,827	P < 0.001	11.45 to 41.40
GC-Cor-CD8 vs G3-Cor-CD4	22,98	9,008	P < 0.001	8.775 to 37.18
G2-Cor-CD8 vs GC-Cor-CD4	26,2	9,743	P < 0.001	11.23 to 41.17
G2-Cor-CD8 vs G2-Cor-CD4	27,65	10,28	P < 0.001	12.68 to 42.62
G2-Cor-CD8 vs G3-Cor-CD4	24,21	9,488	P < 0.001	10.00 to 38.41
G3-Cor-CD8 vs GC-Cor-CD4	30,9	12,11	P < 0.001	16.69 to 45.10
G3-Cor-CD8 vs G2-Cor-CD4	32,35	12,68	P < 0.001	18.14 to 46.55
G3-Cor-CD8 vs G3-Cor-CD4	28,9	12,02	P < 0.001	15.51 to 42.29

Corpo Ciliar - CC

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
GC-CC-CD8 vs GC-CC-CD4	23,85	8,869	P < 0.001	8.877 to 38.82
GC-CC-CD8 vs G2-CC-CD4	20,73	7,707	P < 0.001	5.752 to 35.70
GC-CC-CD8 vs G3-CC-CD4	22,77	8,923	P < 0.001	8.560 to 36.97
G2-CC-CD8 vs GC-CC-CD4	28,48	10,59	P < 0.001	13.50 to 43.45
G2-CC-CD8 vs G2-CC-CD4	25,35	9,427	P < 0.001	10.38 to 40.32
G2-CC-CD8 vs G3-CC-CD4	27,39	10,74	P < 0.001	13.19 to 41.59
G3-CC-CD8 vs GC-CC-CD4	31,37	12,29	P < 0.001	17.16 to 45.57
G3-CC-CD8 vs G2-CC-CD4	28,24	11,07	P < 0.001	14.04 to 42.44
G3-CC-CD8 vs G3-CC-CD4	30,28	12,59	P < 0.001	16.89 to 43.67

Comparação da imunomarcção entre CD8 e CD4 **dentro do mesmo grupo** nas diferentes áreas analisadas. Análise feita no programa de estatística PRISMA. As diferença estatisticamente significante são entre as células imunomarcadas na mesma área do mesmo grupo.

Retina – Ret.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
GC-Ret-CD8 vs GC-Ret-CD4	27,73	10,31	P < 0.001	12.75 to 42.70
GC-Ret-CD8 vs G2-Ret-CD4	31,88	11,85	P < 0.001	16.90 to 46.85
GC-Ret-CD8 vs G3-Ret-CD4	28,84	11,3	P < 0.001	14.64 to 43.04
G2-Ret-CD8 vs GC-Ret-CD4	19,4	7,214	P < 0.001	4.427 to 34.37
G2-Ret-CD8 vs G2-Ret-CD4	23,55	8,757	P < 0.001	8.577 to 38.52
G2-Ret-CD8 vs G3-Ret-CD4	20,52	8,042	P < 0.001	6.310 to 34.72
G3-Ret-CD8 vs GC-Ret-CD4	26,73	10,48	P < 0.001	12.52 to 40.93
G3-Ret-CD8 vs G2-Ret-CD4	30,88	12,1	P < 0.001	16.67 to 45.08
G3-Ret-CD8 vs G3-Ret-CD4	27,84	11,57	P < 0.001	14.45 to 41.23

Iris

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
GC-Iris-CD8 vs GC-Iris-CD4	28,73	10,68	P < 0.001	13.75 to 43.70
GC-Iris-CD8 vs G2-Iris-CD4	25,73	9,566	P < 0.001	10.75 to 40.70
GC-Iris-CD8 vs G3-Iris-CD4	29,56	11,59	P < 0.001	15.35 to 43.76
G2-Iris-CD8 vs GC-Iris-CD4	22,85	8,497	P < 0.001	7.877 to 37.82
G2-Iris-CD8 vs G2-Iris-CD4	19,85	7,382	P < 0.001	4.877 to 34.82
G2-Iris-CD8 vs G3-Iris-CD4	23,68	9,282	P < 0.001	9.475 to 37.88
G3-Iris-CD8 vs GC-Iris-CD4	28,21	11,06	P < 0.001	14.01 to 42.41
G3-Iris-CD8 vs G2-Iris-CD4	25,21	9,882	P < 0.001	11.01 to 39.41
G3-Iris-CD8 vs G3-Iris-CD4	29,04	12,07	P < 0.001	15.65 to 42.43

Limbo

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
GC-Lim-CD8 vs GC-Lim-CD4	24,28	9,027	P < 0.001	9.302 to 39.25
GC-Lim-CD8 vs G2-Lim-CD4	20,8	7,735	P < 0.001	5.827 to 35.77
GC-Lim-CD8 vs G3-Lim-CD4	24,63	9,653	P < 0.001	10.42 to 38.83
G2-Lim-CD8 vs GC-Lim-CD4	30,2	11,23	P < 0.001	15.23 to 45.17
G2-Lim-CD8 vs G2-Lim-CD4	26,73	9,938	P < 0.001	11.75 to 41.70
G2-Lim-CD8 vs G3-Lim-CD4	30,55	11,98	P < 0.001	16.35 to 44.75
G3-Lim-CD8 vs GC-Lim-CD4	30,05	11,78	P < 0.001	15.85 to 44.25
G3-Lim-CD8 vs G2-Lim-CD4	26,58	10,42	P < 0.001	12.37 to 40.78
G3-Lim-CD8 vs G3-Lim-CD4	30,4	12,64	P < 0.001	17.01 to 43.79

APÊNDICE G

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Ângulo Iridocorneal

Parameter	CD8-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9706
95% confidence interval	0.1416 to 0.9994
P value (two-tailed)	0,0294
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,9421

Ângulo Iridocorneal

Parameter	CD8-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9965
95% confidence interval	0.8359 to 0.9999
P value (two-tailed)	0,0035
P value summary	**
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,9929

Ângulo Iridocorneal

Parameter	CD8-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,8918
95% confidence interval	0.04420 to 0.9929
P value (two-tailed)	0,042
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,7952

Coróide

Parameter	CD8-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,707
95% confidence interval	-0.7929 to 0.9932
P value (two-tailed)	0,293
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,4999

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Coróide

Parameter	CD8-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,8595
95% confidence interval	-0.5843 to 0.9970
P value (two-tailed)	0,1405
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,7388

Coróide

Parameter	CD8-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,8896
95% confidence interval	0.03363 to 0.9927
P value (two-tailed)	0,0433
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,7913

Corpo Ciliar

Parameter	CD8-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,1886
95% confidence interval	-0.9436 to 0.9733
P value (two-tailed)	0,8114
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,03557

Corpo Ciliar

Parameter	CD8-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,97
95% confidence interval	0.1306 to 0.9994
P value (two-tailed)	0,03
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,9408

Corpo Ciliar

Parameter	CD8-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,9373
95% confidence interval	0.3177 to 0.9960
P value (two-tailed)	0,0187
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,8785

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Retina

Parameter	CD8-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	-0,07468
95% confidence interval	-0.9664 to 0.9550
P value (two-tailed)	0,9253
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,005577

Retina

Parameter	CD8-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9118
95% confidence interval	-0.3991 to 0.9982
P value (two-tailed)	0,0882
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,8313

Retina

Parameter	CD8-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,8837
95% confidence interval	0.006018 to 0.9923
P value (two-tailed)	0,0468
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,7809

Iris

Parameter	CD8-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,5887
95% confidence interval	-0.8577 to 0.9898
P value (two-tailed)	0,4113
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,3466

Iris

Parameter	CD8-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,7251
95% confidence interval	-0.7787 to 0.9937
P value (two-tailed)	0,2749
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,5258

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD3 e CD8, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Iris

Parameter	CD8-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,3721
95% confidence interval	-0.7596 to 0.9444
P value (two-tailed)	0,5374
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,1385

Limbo

Parameter	CD8-GC
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,656
95% confidence interval	-0.8258 to 0.9918
P value (two-tailed)	0,344
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,4303

Limbo

Parameter	CD8-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9692
95% confidence interval	0.1187 to 0.9994
P value (two-tailed)	0,0308
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,9394

Limbo

Parameter	CD8-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,5783
95% confidence interval	-0.6209 to 0.9671
P value (two-tailed)	0,3071
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No

APÊNDICE H

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Ângulo Iridocorneal

Parameter	CD79-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9943
95% confidence interval	0.7469 to 0.9999
P value (two-tailed)	0,0057
P value summary	**
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,9886

Parameter	CD79-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,8851
95% confidence interval	-0.5092 to 0.9976
P value (two-tailed)	0,1149
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,7834

Parameter	CD79-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,8433
95% confidence interval	-0.1526 to 0.9894
P value (two-tailed)	0,0727
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,7112

Coróide

Parameter	CD79-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9912
95% confidence interval	0.6371 to 0.9998
P value (two-tailed)	0,0088
P value summary	**
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,9826

Parameter	CD79-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,8131
95% confidence interval	-0.6775 to 0.9959
P value (two-tailed)	0,1869
P value summary	ns

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Coróide

Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	
R squared		0,6611

Parameter

CD79-G3

Number of XY Pairs		5
Pearson r		0,9663
95% confidence interval	0.5695 to 0.9979	
P value (two-tailed)		0,0074
P value summary	**	
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes	
R squared		0,9337

Corpo ciliar

Parameter

CD79-G1

Number of XY Pairs		4
Pearson r		0,9745
95% confidence interval	0.2115 to 0.9995	
P value (two-tailed)		0,0255
P value summary	*	
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes	
R squared		0,9497

Parameter

CD79-G2

Number of XY Pairs		4
Pearson r		0,7399
95% confidence interval	-0.7659 to 0.9941	
P value (two-tailed)		0,2601
P value summary	ns	
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	
R squared		0,5474

Parameter

CD79-G3

Number of XY Pairs		5
Pearson r		0,5947
95% confidence interval	-0.6052 to 0.9687	
P value (two-tailed)		0,2902
P value summary	ns	
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	
R squared		0,3536

Retina

Parameter

CD79-G1

Number of XY Pairs		4
Pearson r		-0,7982
95% confidence interval	-0.9956 to 0.6998	
P value (two-tailed)		0,2018
P value summary	ns	
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Retina
R squared 0,6371

Parameter **CD79-G2**
Number of XY Pairs 4
Pearson r 0,9363
95% confidence interval -0.2482 to 0.9987
P value (two-tailed) 0,0637
P value summary ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05) No
R squared 0,8766

Parameter **CD79-G3**
Number of XY Pairs 5
Pearson r 0,7816
95% confidence interval -0.3245 to 0.9848
P value (two-tailed) 0,1184
P value summary ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05) No
R squared 0,611

Iris
Parameter **CD79-G1**
Number of XY Pairs 4
Pearson r 0,9633
95% confidence interval 0.02868 to 0.9993
P value (two-tailed) 0,0367
P value summary *
Is the correlation significant? (alpha=0.05) Yes
R squared 0,9279

Parameter **CD79-G2**
Number of XY Pairs 4
Pearson r 0,9675
95% confidence interval 0.09138 to 0.9993
P value (two-tailed) 0,0325
P value summary *
Is the correlation significant? (alpha=0.05) Yes
R squared 0,9361

Parameter **CD79-G3**
Number of XY Pairs 5
Pearson r 0,9897
95% confidence interval 0.8465 to 0.9994
P value (two-tailed) 0,0013
P value summary **
Is the correlation significant? (alpha=0.05) Yes
R squared 0,9794

Análise de correlação entre o percentual de células mononucleares positivas para CD79 α e IgG2, constituinte do infiltrado inflamatório presente nas diferentes regiões do bulbo ocular dos cães do G1, G2 e G3

Limbo

Parameter	CD79-G2
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,9455
95% confidence interval	-0.1708 to 0.9989
P value (two-tailed)	0,0545
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,894

Parameter	CD79-G3
Number of XY Pairs	5
Pearson r	0,5264
95% confidence interval	-0.6646 to 0.9620
P value (two-tailed)	0,3621
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,2771

Parameter	CD79-G1
Number of XY Pairs	4
Pearson r	0,7512
95% confidence interval	-0.7552 to 0.9944
P value (two-tailed)	0,2488
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,5642