



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EXPRESSÃO DO GENE DA INTERLEUCINA-10 NA CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

MÓNICA SOFIA DE ALBUQUERQUE CÔRTE-REAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço

ORIENTADORA

Doutora Esmeralda Sofia
da Costa Delgado

CO-ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EXPRESSÃO DO GENE DA INTERLEUCINA-10 NA CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

MÓNICA SOFIA DE ALBUQUERQUE CÔRTE-REAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço

ORIENTADORA

Doutora Esmeralda Sofia
da Costa Delgado

CO-ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

2015

LISBOA

Aos meus pais,
sem os quais não teria sido possível chegar tão longe.

Agradecimentos

Ao recordar o tempo investido na escrita da presente dissertação de mestrado, é impossível esquecer cada uma das pessoas e/ou instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização. Por esse motivo, quero não só deixar os meus agradecimentos como também expressar o meu reconhecimento:

- à Doutora Esmeralda Delgado, por ter aceitado ser minha orientadora e demonstrado na prática o que isso realmente significa. Pela simpatia, disponibilidade, entusiasmo, confiança em mim depositada, conhecimentos e experiência profissional, dificilmente virá a existir uma pessoa mais indicada para o efeito;
- à Doutora Solange Gil, pela simpatia, boa-disposição e disponibilidade evidentes. Pelos conhecimentos transmitidos numa área, que apesar de não ser a minha predileta, aprendi a gostar graças à simplicidade e entusiasmo com que a abordou: a imunologia;
- à Doutora Ana Mafalda Lourenço, pelo valioso auxílio prestado no âmbito da avaliação dermatológica dos animais envolvidos no estudo realizado e pelas fotografias cedidas no âmbito da ilustração do presente trabalho;
- à Dra. Clara Cartaxeiro, pela dedicação, empenho, persistência e boa-disposição aplicados na componente laboratorial da minha dissertação de mestrado;
- à Dra. Joana Domingues, por todas as dúvidas esclarecidas e disponibilidade em ajudar, mesmo não sendo sua obrigação fazê-lo;
- ao CIISA e à FMV-UL, por financiarem este estudo e permitirem que ele se realizasse;
- ao Dr. Telmo Nunes, pelo seu indispensável contributo quanto à análise estatística dos resultados obtidos;
- à Doutora Maria Luísa Mateus, pelas sequências de primers fornecidas;
- aos médicos, enfermeiros, estagiários e restante equipa do Hospital Escolar da FMV-UL, pelos conhecimentos transmitidos e apoio dado ao longo de todo o estágio curricular;
- aos verdadeiros amigos que fiz no decorrer do meu percurso académico e cuja amizade pretendo levar para a vida. Não subvalorizando os restantes e independentemente da ordem pela qual são mencionados, destaco alguns nomes pelo incentivo e força proporcionadas nesta fase: Daniela Santos, Ana Antunes, Catarina Ramos, Catarina Pissarra, Diogo Vasconcelos, Francisco Cravo, João Cordas, João Romero, Matilde Vítor, Iris Miquel, Nicola Tamarindo e Sarah Feré;
- à minha família, em especial aos meus pais, sem os quais não teria sido possível chegar tão longe. Pela excelente educação que me deram, pela confiança em mim depositada, por me motivarem todos os dias e por outros mil motivos que fazem

deles os melhores pais que alguma vez poderia ter tido, não só lhes agradeço como também dedico esta dissertação de mestrado;

- ao meu gato, que entre arranhões e mordidelas demonstrou ser um “voluntário à força” exemplar no que toca a uma melhor compreensão de certas matérias lecionadas nas aulas;
- aos restantes animais que, à sua maneira, contribuíram para que os admirasse ainda mais e escolhesse este curso.

EXPRESSÃO DO GENE DA INTERLEUCINA-10 NA CONJUNTIVITE ALÉRGICA CANINA

A conjuntivite alérgica canina (CAc) é uma doença cuja manifestação clínica ocorre nas pálpebras, na conjuntiva e/ou na córnea. Caracteriza-se por reações de hipersensibilidade do tipo I e integra frequentemente a sintomatologia da dermatite atópica canina (DAc).

Através do estudo realizado no âmbito da presente dissertação de mestrado, pretende-se contribuir para a caracterização da resposta imunitária da CAc. Nesse sentido, um grupo controlo formado por animais saudáveis (n=10) e um grupo de animais atópicos com conjuntivite alérgica (CA) (n=10) integraram a presente experiência. Ambos foram submetidos a um exame dermatológico e oftalmológico completos, em que se procedeu, apenas para o grupo atópico, à classificação da gravidade das lesões com o *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version* (CADESI-4), bem como à avaliação quantitativa dos sinais clínicos de CAc (corrimento ocular, epífora, hiperémia conjuntival, prurido, quemose e queratite concomitante) através da atribuição de um valor entre 0 (ausente) e 3 (grave). Subsequentemente, após a aplicação tópica ocular de anestésico, uma amostra de conjuntiva palpebral medindo cerca de 2x2 mm foi colhida e submetida a quantificação, por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), dos níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do gene da interleucina (IL) -10.

A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste Mann-Whitney-Wilcoxon e ao teste de correlação de Spearman, sendo que os resultados a seguir apresentados surgem sob a forma de média±desvio-padrão. O *score* de CADESI-4 nos cães atópicos foi de 22,1±15,72. O *score* de CA do olho esquerdo foi de 8,9±15,72 e no olho direito 9,1±2,51. A média do *score* de CA de ambos os olhos foi 9,0±2,30. Os níveis de expressão do gene da IL-10 para o grupo atópico e controlo foram, respetivamente, 0,005±0,0029 e 0,004±0,0024. Verificou-se existir um coeficiente de correlação positivo entre os valores de CADESI-4 e os níveis de expressão do gene da IL-10 (p=0,25), bem como um coeficiente de correlação negativo entre a média do *score* de CA de ambos os olhos e a expressão do mesmo gene (p=0,35). Desta forma, concluímos que aparentemente o grupo atópico apresenta maiores níveis de expressão do gene da IL-10, o que poderá ser útil para o estudo da fisiopatologia e tratamento de atopia canina e respetiva CA. É necessária a realização de mais estudos para confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version*, conjuntivite alérgica canina, níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro do gene da interleucina-10, *score* de conjuntivite alérgica.

INTERLEUKIN-10 GENE EXPRESSION IN CANINE ALLERGIC CONJUNCTIVITIS

Canine allergic conjunctivitis (cAC) is a disease whose clinical manifestation occurs in the eyelids, in the conjunctiva and/or in the cornea. It is characterized by type I hypersensitivity reactions and is often included in the symptoms of canine atopic dermatitis (cAD).

Through the study under this master thesis we aim to contribute to the characterization of cAC immune response. Therefore, a control group consisting of healthy animals (n=10) and a group of atopic animals with allergic conjunctivitis (AC) (n=10) were enrolled in the present experiment. Both underwent complete dermatological and ophthalmic examinations, which included, only for the atopic group, Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version (CADESI-4) classification of the severity of injuries, as well as the quantitative evaluation of clinical signs of AC (ocular discharge, epiphora, conjunctival hyperemia, pruritus, chemosis and concurrent keratitis) by rating them from 0 (absent) to 3 (severe). Subsequently, after ocular topical anesthesia, a sample of palpebral conjunctiva measuring approximately 2x2 mm was collected and subjected to quantification, by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), of the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression levels of interleukin (IL) -10 gene.

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney-Wilcoxon test and the Spearman correlation test, results being presented as mean±standard deviation. CADESI-4 score for the atopic group was 22,1±15,72. AC score in the left eye was 8,9±15,72 and in the right eye 9,1±2,51. The average AC score for both eyes corresponded to 9,0±2,30. IL-10 gene expression levels for the atopic and control group were, respectively, 0,005±0,0029 and 0,004±0,0024. There was a positive correlation coefficient between CADESI-4 values and IL-10 gene expression levels (p=0,25), as well as a negative correlation coefficient between the average of the AC score for both eyes and the expression of the same gene (p=0,35). Thus, we concluded that apparently the atopic group has higher IL-10 gene expression levels which may be useful for the study of the physiopathology and treatment of canine atopy and its respective AC. Further studies are required to confirm this hypothesis.

Keywords: Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version, canine allergic conjunctivitis, messenger ribonucleic acid expression levels of interleukin-10 gene, allergic conjunctivitis score.

CAPÍTULO I – Atividades desenvolvidas na área clínica	1
CAPÍTULO II – Conjuntivite alérgica canina	4
1. Introdução	4
2. Anatomofisiologia da conjuntiva	4
3. Fisiopatologia	8
3.1. Citocinas	10
3.1.1. Interleucina-10	10
4. Epidemiologia	12
5. Etiologia	14
5.1. Alergénios veiculados aereamente	15
5.2. Inalação e ingestão de alergénios	15
5.3. Alergénios veiculados topicamente	16
5.3.1. Neomicina	16
5.3.2. Timerosal	16
5.3.3. Cloreto de benzalcónio	17
5.4. Atopia e resposta alérgica	17
5.5. Toxinas bacterianas	19
6. Sinais clínicos	20
7. Diagnóstico	26
7.1. Anamnese	27
7.2. Sintomatologia clínica ocular e sistémica	27
7.3. Citologia da conjuntiva	28
7.4. Biópsia da conjuntiva	30
7.5. Cultura da conjuntiva	31
7.6. Testes intradérmicos e análises sorológicas	32
7.7. Diagnóstico de conjuntivite alérgica humana	34
7.8. Testes de provocação conjuntival	36
8. Tratamento	38
8.1. Vasoconstritores	39
8.2. Anti-histamínicos	39
8.3. Estabilizadores da membrana celular dos mastócitos	40
8.4. Anti-inflamatórios não esteróides	40
8.5. Corticosteróides	40
8.6. Imunoterapia alérgico-específica	42
8.7. Imunossuppressores	42
8.8. Antibióticos	43
8.9. Anticorpos monoclonais	43
8.10. Tratamento de dermatite atópica canina	43
CAPÍTULO III – Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina	44
1. Objetivos	44
2. Material e métodos	44
2.1. Amostra em estudo	44
2.2. Seleção dos pacientes	44
2.3. Avaliação dermatológica	45
2.4. Avaliação oftalmológica	46
2.5. Colheita de amostras	47
2.6. Processamento de amostras	47
2.6.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA	47
2.6.2. Seleção dos primers	48
2.6.3. qRT-PCR	48
2.6.4. Análise estatística	49
3. Resultados	49

3.1.	Caracterização da amostra	49
3.2.	Avaliação oftalmológica	50
3.3.	Avaliação dermatológica	51
3.4.	Níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10	51
3.5.	Coeficiente de correlação entre variáveis	52
3.5.1.	Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o <i>score</i> de CA	52
3.5.2.	Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4	53
4.	Discussão	54
4.1.	Caracterização da amostra	54
4.2.	Avaliação oftalmológica	55
4.3.	Avaliação dermatológica	56
4.4.	Níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10	57
4.5.	Coeficiente de correlação entre variáveis	58
4.5.1.	Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o <i>score</i> de CA	58
4.5.2.	Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4	58
5.	Conclusão	60
CAPÍTULO IV – Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina		61
ANEXO I		74
ANEXO II		75
ANEXO III		77
ANEXO IV		78
ANEXO V		79
ANEXO VI		80
ANEXO VII		81
ANEXO VIII		82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação da conjuntiva mediante a localização anatômica considerada (adaptado de Maggs, 2008b).	5
Figura 2 - Epitélio estratificado a pseudo-estratificado da conjuntiva palpebral canina, com numerosas células calciformes (setas) (ampliação original de 250x) (adaptado de Gelatt, 2014e).	6
Figura 3 - Esquema representativo da fase de sensibilização e ativação das reações de hipersensibilidade do tipo I (adaptado de Day, 2008b).	9
Figura 4 - Exemplar de Lulu da Pomerânia, raça com predisposição para o surgimento de conjuntivite associada a DA _c (adaptado de cdn.dogdogs.net/2011/04/lulu-pomerania02.jpg).	14
Figura 5 - Vasos sanguíneos (setas) contendo numerosos eosinófilos numa biópsia de pele de cão com hipersensibilidade cutânea do tipo I (adaptado de Day, 2008b).	18
Figura 6 - Esquema representativo do padrão lesional típico da DA _c (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Ana Mafalda Lourenço).	19
Figura 7 - Cão com corrimento ocular purulento exuberante do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).	21
Figura 8 - Cão braquicefálico com epífora do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).	22
Figura 9 - Cão com hiperémia marcada da conjuntiva palpebral do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).	22
Figura 10 - Cão com quemose (edema da conjuntiva) da conjuntiva palpebral do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).	23
Figura 11 - Cão com queratite pigmentar e corrimento purulento exuberante do olho esquerdo (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).	24
Figura 12 - Cão com conjuntivite folicular a nível da superfície palpebral da membrana nictitante (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).	25
Figura 13 - Espátula de Kimura, lâmina esterilizada de bisturi e <i>cytobrush</i> (adaptado de Maggs, 2008a).	28
Figura 14 - Anestésico ocular tópico, pinça e tesoura de tenotomia utilizados no âmbito das biópsias de conjuntiva canina realizadas a propósito do estudo “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina” (fotografia original).	30
Figura 15 - Realização de biópsia de conjuntiva em ambiente cirúrgico, no olho direito de um cão atópico: destaque com pinça (A) e seção com tesoura de tenotomia (B) (fotografias originais).	30
Figura 16 - Reações cutâneas positivas manifestadas por um cão atópico após a administração intradérmica de extratos de alérgenos (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Ana Mafalda Lourenço).	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição e gravidade dos sinais clínicos de CAc mediante o olho avaliado ..	50
Gráfico 2 - Distribuição percentual da classificação da gravidade da DA de acordo com o <i>score</i> total obtido através do sistema de classificação CADESI-4.	51
Gráfico 3 - Distribuição dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 por grupo ...	52
Gráfico 4 – Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o <i>score</i> de CA do grupo atópico.	53
Gráfico 5 – Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4 do grupo atópico.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios clínicos de diagnóstico de DAc segundo Favrot	45
Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados na quantificação, por qRT-PCR, dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 na conjuntiva ocular canina.	48
Tabela 3 - Distribuição dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 por grupo.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antigénio
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
APC	Célula apresentadora de antigénio
CA	Conjuntivite alérgica
CAC	Conjuntivite alérgica canina
CAh	Conjuntivite alérgica humana
CADESI-4	<i>Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version</i>
CALT	<i>Conjunctival Associated Lymphoid Tissue</i>
CB	Cloreto de benzalcónio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DA	Dermatite atópica
DAC	Dermatite atópica canina
DAh	Dermatite atópica humana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMCM s	Estabilizadores da membrana celular dos mastócitos
E.U.A.	Estados Unidos da América
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
Gram-	Gram-negativo
Gram+	Gram-positivo
IFN- γ	Interferão-gama
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IL	Interleucina
ITAE	Imunoterapia alérgico-específica
min.	Minuto
MHC II	Complexo maior de histocompatibilidade de classe II
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>Oaz1</i>	Antizima da ornitina descarboxilase 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogénio iónico
PIO	Pressão intra-ocular
QCS	Queratoconjuntivite seca
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RB	Rosa bengala
RNA	Ácido ribonucleico
r_s	Coefficiente de correlação de Spearman

TC	Tomografia computadorizada
Th	T <i>helper</i>
TI	Testes intradérmicos
TCP	Testes cutâneos por picada
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TPC	Testes de provocação conjuntival
TS	Teste de Schirmer

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Os resultados do estudo “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina” foram apresentados, sob a forma de comunicação oral, no Congresso da Sociedade Europeia de Oftalmologia Veterinária (ESVO – *European Society of Veterinary Ophthalmology*), que se realizou de dia 1 a dia 4 de Outubro de 2015, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), Lisboa, Portugal. Este trabalho ganhou o prémio de melhor comunicação oral no citado congresso e o respetivo *abstract* será publicado na versão on-line da revista *Veterinary Ophthalmology*.

CAPÍTULO I - Atividades desenvolvidas na área clínica

O estágio curricular foi realizado no Hospital Escolar da FMV-UL, entre o dia 15 de Setembro de 2014 e o dia 15 de Março de 2015, num total de 1204 horas de trabalho, sob a orientação da Professora Doutora Esmeralda Delgado e a co-orientação da Professora Doutora Solange Gil. Posteriormente, entre o dia 16 de Março de 2015 e o dia 30 de Abril do mesmo ano, teve lugar a componente laboratorial da presente dissertação de mestrado. Este espaço de tempo foi dedicado ao processamento e análise, por qRT-PCR, de 24 biópsias de conjuntiva canina que se recolheram durante o estágio curricular.

No âmbito da clínica de animais de companhia, foi possibilitada a participação da autora em consultas de referência, bem como de primeira e segunda opinião, sempre sob a orientação de um médico veterinário experiente. As atividades desenvolvidas estavam distribuídas por 4 áreas – medicina interna, cirurgia, imagiologia e internamento – e diziam respeito às especialidades médicas disponibilizadas pelo Hospital Escolar da FMV-UL, de que são exemplo: cardiologia, cirurgia, clínica dos novos animais de companhia, comportamento animal, dermatologia, doenças infecciosas/parasitárias, endocrinologia, estomatologia e odontologia, gastroenterologia, hematologia, oftalmologia, oncologia, ortopedia, neurologia, reprodução e obstetrícia. As consultas de oftalmologia foram as mais frequentadas, dado o particular interesse da autora nesta área relevante da medicina veterinária.

O serviço de medicina interna revelou ser bastante útil na consolidação e desenvolvimento de capacidades respeitantes à comunicação com o proprietário do animal, à elaboração da história pregressa e à realização do exame físico completo. Também a identificação dos diagnósticos diferenciais mais prováveis e a instituição do protocolo terapêutico mais adequado foram aprimoradas, tendo-se procedido à discussão das decisões tomadas neste âmbito, com o médico veterinário responsável pelo caso. De entre os vários procedimentos praticados, a preparação e administração de vacinas e fármacos, a colheita de sangue e urina para análises, a cateterização venosa, a limpeza e desinfeção de feridas seguida da execução de pensos, bem como a colocação do *microchip*, foram, por ordem decrescente, os que apresentaram maior frequência em termos de realização.

Por outro lado, na área da cirurgia a autora teve a oportunidade de desempenhar o papel de circulante, anestesista, instrumentista e ajudante de cirurgião. Após a receção dos animais a serem intervencionados, seguiu-se a respetiva cateterização venosa e cálculo da medicação pré-cirúrgica e indutor anestésico a serem administrados. Procedeu-se ainda à entubação endotraqueal do paciente e à preparação do campo cirúrgico, tendo sido permitida a sua participação em intervenções cirúrgicas de menor relevância e complexidade como suturas de pele, destartarizações e orquiectomias em cães e gatos. No final, todos os animais foram levados até ao internamento para monitorização pós-cirúrgica, preenchimento da respetiva ficha de alta e prescrição da medicação apropriada a cada um deles. As consultas de

seguimento consistiram na desinfecção da sutura realizada, na renovação do penso cirúrgico a par da eventual remoção de pontos e no ajustamento da medicação prescrita conforme a evolução do estado de saúde do paciente. Também se assistiu à realização de endoscopias, sobretudo rinoscopias e vídeo-otoscopias, cuja monitorização anestésica coube, grande parte das vezes, à autora da presente dissertação de mestrado.

Uma vez no serviço de imagiologia, foi facultada e aproveitada a oportunidade de participar em cada uma das 3 áreas em que ele se divide, nomeadamente na radiologia, na tomografia computadorizada (TC) e na ecografia. Neste contexto, as atividades realizadas consistiram no posicionamento do animal, na sua monitorização anestésica e na interpretação das imagens visualizadas mediante o exame complementar de diagnóstico requerido. Outros procedimentos, como a punção aspirativa por agulha fina e a colheita de urina por cistocentese, também foram visualizados e o respetivo fundamento teórico assimilado.

Finalmente, no serviço de internamento do Hospital Escolar da FMV-UL, as funções desempenhadas pela autora incluíram: a prestação de cuidados básicos de higiene; o passeio, alimentação e monitorização dos pacientes; a limpeza e desinfecção de feridas, a par da colocação de pensos; a preparação e administração de fármacos; a colheita de sangue, urina e outras amostras biológicas para análise; a cateterização venosa; a medição da pressão arterial e da glicémia dos animais hospitalizados; a algaliação; bem como a realização de fluido e fisioterapia. No início de cada turno os casos clínicos eram discutidos com o médico veterinário responsável por este serviço. As mesmas atividades foram praticadas na unidade de internamento destinada a indivíduos com doenças infetocontagiosas.

A autora assistiu ainda a palestras relacionadas com produtos comercializados no âmbito da medicina veterinária – vacinas, fármacos e desparasitantes – e com temáticas relevantes na prática clínica, tais como o uso desregrado de antibióticos.

Tal como já mencionado, de entre as diferentes áreas associadas à medicina veterinária, a oftalmologia é, sem dúvida, a que mais interesse e curiosidade despertam por parte da autora. Sempre que possível, durante e após o período correspondente ao estágio curricular, as consultas desta natureza – quase todas referenciadas - foram frequentadas com o intuito de assimilar e consolidar conhecimentos no âmbito da especialidade médica em causa. O facto de serem marcadas com antecedência permitiu o estudo prévio de cada caso clínico, o que contribuiu para uma maior compreensão dos mesmos. Apreendida e registada a história pregressa, efetuou-se o exame oftálmico completo dos animais, que sucinta e ordenadamente incluiu os procedimentos a seguir mencionados: avaliação dos reflexos oculares, teste de Schirmer (TS), medição da pressão intra-ocular (PIO), biomicroscopia com lâmpada de fenda e fundoscopia com oftalmoscópio indireto. Além disso, a autora teve o privilégio de assistir e participar em diferentes exames complementares de diagnóstico como gonioscopia, eletrorretinografia, paracentese da

câmara anterior do olho, ecografias e TCs oculares. Foram várias as cirurgias presenciadas no contexto da oftalmologia veterinária durante o estágio curricular, correspondendo as mais frequentes à enucleação, exenteração, evisceração e colocação de próteses intraesclerais; à resolução de anomalias palpebrais como são o entrópion e o ectrópion; à realização de *flaps* conjuntivais e queratectomias para fins de resolução de sequestros de córnea; e à resolução de cataratas através da técnica de facoemulsificação.

A autora teve ainda a oportunidade de assistir e auxiliar a avaliação oftalmológica de equinos, em que tanto a identificação de lesões na córnea como a de cataratas com indicação cirúrgica prevaleceu.

Pelo facto das manifestações clínicas oculares resultarem frequentemente de doenças dermatológicas, infetocontagiosas, metabólicas, oncológicas e parasitárias – de que são exemplo a dermatite atópica (DA), a hepatite infecciosa canina, a diabetes *mellitus*, o linfoma e a febre da carraça, respetivamente –, procedeu-se, sempre que necessário, ao seu despiste através da realização dos exames complementares de diagnóstico mais adequados para cada caso.

Por fim, a convite da Professora Doutora Esmeralda Delgado, a autora pôde assistir a todas as aulas lecionadas no âmbito da unidade curricular opcional intitulada “Repercussões oculares de doenças sistémicas”, que decorreu entre os dias 9 e 17 de Dezembro de 2014.

1. Introdução

A CAC manifesta-se nas pálpebras, na conjuntiva e/ou na córnea, sendo constituída por uma sequência de eventos imunitários formada por reações de hipersensibilidade do tipo I (Day & Crispin, 2008; Lourenço et al., 2011). A sua fisiopatologia inclui, por ordem, uma fase de sensibilização ao(s) alérgico(s), uma fase aguda e por vezes uma fase tardia, responsável pelo seu prolongamento no tempo (Day, 2008b). A mesma doença caracteriza-se também por uma produção acrescida de imunoglobulinas do tipo E (IgE) e linfócitos T *helper* (Th) 2, a par de uma maior reatividade mastocitária (Day, 2008b).

Apesar do número reduzido de estudos realizados no âmbito da CAC e humana, acredita-se que a percentagem de casos diagnosticados seja influenciada pela especialidade médica do profissional responsável pelos mesmos (Bonini, 2010; Lourenço et al., 2011).

O seu aparecimento deve-se a um conjunto díspar de ocorrências, tais como o contato direto com antigénios (Ag) veiculados aérea ou topicamente, a inalação ou ingestão de substâncias alérgicas, a libertação de toxinas bacterianas e a existência concomitante de outros sinais de atopia ou resposta do foro alérgico (Maggs, 2008b). Destas, a mais relevante em termos de frequência corresponde à última citada, embora ainda não se conheça o valor exato da prevalência da CA na DAC (Maggs, 2008b).

Os principais sinais clínicos de CAC são a hiperémia conjuntival, o prurido, a quemose, o corrimento ocular, a epífora e a queratite (Lourenço et al., 2011), sendo que a presença simultânea dos 3 primeiros mencionados permite chegar ao diagnóstico quase definitivo da doença (Friedlaender, 2011). A existência concomitante de rinite justifica, no âmbito da oftalmologia humana, a sua designação enquanto rinoconjuntivite (Sánchez-Hernández et al., 2015).

De entre os vários métodos utilizados para diagnosticar CA em cães, os frequentemente utilizados na prática clínica veterinária correspondem à anamnese, à sintomatologia ocular e sistémica e ao diagnóstico terapêutico, através do controlo da doença responsável pela sua ocorrência (Martin, 2010b). O tratamento pode ser farmacológico ou não-farmacológico (Sánchez-Hernández et al., 2011), atendendo sempre à evolução da causa primária, que normalmente é a DAC (Maggs, 2008b).

2. Anatomofisiologia da conjuntiva

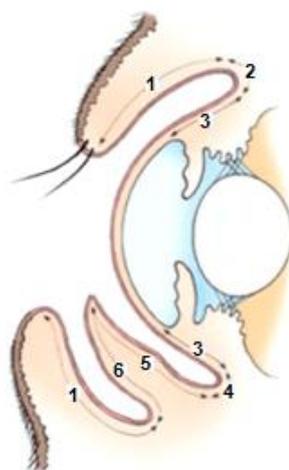
Histologicamente, a conjuntiva é formada por um epitélio estratificado e não queratinizado, colunar ou escamoso consoante a região considerada, constituído por células calciformes (Maggs, 2008b). Tem subjacente uma lâmina própria com duas camadas, uma superficial e a outra profunda. A primeira apresenta glândulas e uma quantidade variável de folículos linfáticos que integram um tecido especial cuja designação abreviada é CALT (*Conjunctival*

Associated Lymphoid Tissue) (Samuelson, 2013). Trata-se de tecido linfóide associado à conjuntiva e existe sobretudo junto às glândulas lacrimais, em particular a pertencente à membrana nictitante. Já a camada profunda é fibrosa, contendo vasos sanguíneos e nervos (Samuelson, 2013).

Macroscopicamente, a conjuntiva consiste numa membrana mucosa cuja classificação varia de acordo com a localização considerada: caso revista a face interna das pálpebras designa-se por conjuntiva palpebral; se revestir o globo ocular, mais precisamente desde a episclera anterior até à região do limbo esclerocorneano, denomina-se por conjuntiva bulbar; revestindo a membrana nictitante, assume a designação de conjuntiva nictitante (Gelatt, 2014e) (Figura 1). Fins descritivos justificam a classificação anterior, pois a conjuntiva não se encontra fisicamente dividida: existe continuidade desde a epiderme das margens palpebrais até ao epitélio da córnea, passando pelo da conjuntiva palpebral, bulbar e do limbo esclerocorneano, ordenadamente (Gelatt, 2014a). É a mais exposta de todas as membranas mucosas do organismo (Gelatt, 2014e)!

Há dois fundos de saco conjuntival – o superior e o inferior - graças ao percurso anatómico descrito pela conjuntiva (Figura 1). O primeiro resulta da inversão de sentido que permite a transição da conjuntiva palpebral superior para a bulbar. O segundo é consequência da sua reflexão sobre as superfícies bulbar e palpebral da membrana nictitante (Gelatt, 2014e). Os fundos de saco conjuntival correspondem portanto à junção da conjuntiva palpebral com a bulbar e a sua exploração é importante dada a acumulação frequente de corpos estranhos no seu interior (Martin, 2010a).

Figura 1 - Classificação da conjuntiva mediante a localização anatómica considerada (adaptado de Maggs, 2008b).



Legenda: 1 - Conjuntiva palpebral; 2 - Fundo de saco conjuntival superior; 3 - Conjuntiva bulbar; 4 - Fundo de saco conjuntival inferior; 5 - Conjuntiva nictitante posterior; 6 - Conjuntiva nictitante anterior.

Dotada de mobilidade, a conjuntiva acompanha os movimentos do globo ocular, embora com algumas limitações: a porção palpebral está intimamente ligada à tarsal, pelo que é destituída desta capacidade (Maggs, 2008b). Já a porção bulbar é praticamente livre, apresentando maior fixação a cerca de 3 mm do limbo esclerocorneano, onde o tecido conjuntivo é mais abundante no cão do que noutras espécies, entre elas a humana (Samuelson, 2013). Também o fundo de saco conjuntival superior tem a sua mobilidade limitada, na medida em que está associado a uma extensão anterior da bainha do músculo levantador da pálpebra superior e do músculo reto dorsal (Maggs, 2008b).

A conjuntiva dispõe de uma vascularização arterial, venosa e límbica. As suas artérias têm origem não só nos vasos arteriais ciliares anteriores, mas também em ramos das artérias palpebrais (superior e inferior) e malar (Murphy, Samuelson & Pollock, 2013). Muitas vezes os seus vasos confundem-se com os da esclera, embora difiram pois são móveis, finos, tortuosos, muito ramificados e superficiais. Recobrem os esclerais que, pelo contrário, são imóveis, de maior calibre, retos e profundos. Existe comunicação entre eles (Maggs, 2008b). A inervação da conjuntiva depende da ação de ramos do nervo longo ciliar, zigomático-facial, zigomático-temporal, infra-trocLEAR e frontal (Gelatt, 2014a).

Em termos de função, a conjuntiva desempenha um papel significativo no bom desenvolvimento e estabilidade do globo ocular: permite que as pálpebras deslizem sobre a sua superfície; contribui para a produção lacrimal; facilita a cicatrização da córnea; e ainda protege física e fisiologicamente o olho através do tecido linfóide que tem a si associado (Samuelson, 2013). Estas funções serão abordadas em seguida.

Mencionou-se inicialmente que o epitélio conjuntival tem na sua constituição células caliciformes. No caso do cão, a sua concentração depende da região anatómica considerada: abundam a nível do fundo de saco conjuntival inferior nasal e medial, bem como na porção tarsal da conjuntiva palpebral inferior (Gelatt, 2014e) (Figura 2).

Figura 2 – Epitélio estratificado a pseudo-estratificado da conjuntiva palpebral canina, com numerosas células caliciformes (setas) (ampliação original de 250x) (adaptado de Gelatt, 2014e).



Legenda: GC – Célula caliciforme.

O mesmo não se verifica na conjuntiva bulbar, onde são escassas, à semelhança do que acontece noutras espécies domésticas (Doughty, 2002; Grahn, Sisler & Storey, 2005; Bourgès-Abella et al., 2007).

Existe um filme ou película lacrimal, que reveste e nutre tanto a córnea como a conjuntiva, formado por 3 camadas (Samuelson, 2013). As diferenças entre elas residem na sua origem, composição e função: a camada lipídica, mais externa, é produzida pelas glândulas de *Meibomius*, previsivelmente constituída por lípidos e impede a evaporação das lágrimas. A camada aquosa resulta da atividade das glândulas lacrimais. Contém sobretudo água e sais minerais, determinando uma eficaz oxigenação do epitélio corneano (Samuelson, 2013). Finalmente, a camada mucosa é a mais interna das 3 e a sua existência depende das células caliciformes. São elas que produzem o seu principal constituinte: a mucina (Murphy et al., 2013). Este componente confere adesão das lágrimas à córnea e de imunoglobulinas e lisozimas microbidas à superfície ocular, protegendo-a (Gelatt, 2014a). Concomitantemente à produção de mucina, gera-se um muco filiforme que tanto pode desembocar no ducto nasolacrimonial como no canto medial do olho. A nível desta última estrutura anatómica mencionada, em raças cujo fundo de saco conjuntival inferior é bem dimensionado, forma-se uma massa gelatinosa acinzentada que se tende a acumular nessa região (Maggs, 2008b).

Para que haja cicatrização de áreas desepitelizadas da córnea por intermédio da conjuntiva, é necessário que o epitélio da segunda adira ao da primeira, possibilitando a ocorrência de processos mitóticos, que num prazo de 24 a 48 horas as vão regenerar (Maggs, 2008b). Daí que se recorra frequentemente a enxertos conjuntivais aquando de úlceras e outras lesões que fragilizam a córnea (Gelatt, 2014e).

A proteção física e fisiológica conferida pela conjuntiva é garantida pelo CALT, presente na camada superficial da lâmina própria. Ele é divisível em 2 plexos, um superficial e o outro profundo (Samuelson, 2013). Tem nódulos ou folículos linfáticos na sua constituição, embora seja maioritariamente do tipo difuso. Aos folículos compete a receção dos antigénios circulantes, seguindo-se uma resposta imunitária que visa a sua destruição (Samuelson, 2013). Por seu lado, a parte difusa caracteriza-se pela abundância em linfócitos T supressores CD8+ responsáveis pela apoptose das células infectadas (Knop & Knop, 2005). Estes mecanismos desempenham um papel importante nos processos inflamatórios da córnea, já que ela não é vascularizada (Cook, Peiffer Jr & Landis, 2009).

A drenagem linfática conjuntival está direccionada para as comissuras das pálpebras, realizando um percurso anatómico que termina nos linfonodos parotídeos ou nos gânglios linfáticos submaxilares, caso consideremos a comissura palpebral lateral ou a medial, respetivamente (Gelatt, 2014a).

3. Fisiopatologia

Existem 4 tipos de reações de hipersensibilidade – I, II, III e IV - passíveis de ocorrer aquando da interação entre certos Ags e o organismo. O facto de integrarem não só respostas imunitárias de carácter protetor como também patológico, contribui para que o termo “mecanismos imunopatológicos” seja uma forma mais simples de as designar (Day, 2008b).

Tanto a CA como a DA, cuja sintomatologia inclui muitas vezes a primeira doença citada (Maggs, 2008b), caracterizam-se pela produção exagerada de IgEs, próprias das reações de hipersensibilidade do tipo I, cuja ocorrência visa a eliminação do Ag (Day, 2008b; Chigbu, 2009). O conjunto de eventos alérgicos respeitantes às duas entidades clínicas mencionadas é desta natureza (Day, 2008b; Bonini, Sgrulletta, Coassin & Bonini, 2009) e será abordado em seguida no âmbito da CA.

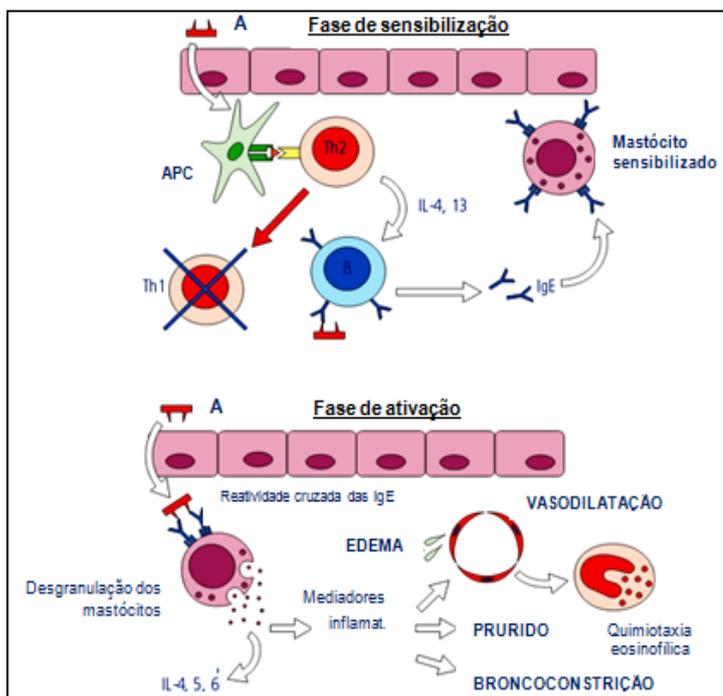
Relembrando o que anteriormente foi escrito, é necessária uma fase de sensibilização ao alérgénio (Figura 3), cuja extensão no tempo varia. Inicialmente o Ag entra no organismo através da conjuntiva, interage com uma célula apresentadora de Ag (APC) – por norma dendrítica -, é digerido no seu interior e disponibilizado na superfície externa da sua membrana sob a forma de fragmentos peptídicos, associado ao respetivo complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (Day, 2008a). Os fragmentos mencionados serão recebidos por linfócitos Th0 cujos recetores apresentam especificidade para o alérgénio em questão (Bonini et al., 2009). O tipo de Ag e APC envolvidos neste processo, a par da sua interação, determinam as características da resposta imunitária adquirida subsequente, que neste caso é mediada por linfócitos Th2 resultantes da diferenciação das células Th0 referidas (Day, 2008a). Através da produção de citocinas - entre elas a IL-4, a IL-10 e a IL-13 -, os linfócitos Th2 inibem a ativação dos Th1 e induzem a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, bem como a síntese de IgEs alérgénio-específicas realizada pelos mesmos (Bonini et al., 2009). Os anticorpos sintetizados desta forma ligam-se aos recetores de elevada afinidade para IgE (Fc ϵ RI) pertencentes aos mastócitos conjuntivais locais, podendo aderir à superfície externa de outros mastócitos – por vezes durante meses - e também de basófilos presentes a nível de diferentes regiões anatómicas da conjuntiva e da corrente sanguínea, respetivamente (Uchio, Ono, Izekawa & Ohno, 2000; Day, 2008b). Grande parte dos mastócitos residentes na conjuntiva encontra-se a nível da sua lâmina própria, concentrando-se no epitélio quando há cronicidade associada (Bielory, 2000a; Chigbu, 2009). Assim termina a fase de sensibilização (Day, 2008b).

A repetição do contacto com o Ag em relação ao qual ocorreu a fase anterior desencadeia uma resposta alérgica imediata, passados cerca de 20 minutos (min.) (Bacon et al., 2000; Chigbu, 2009), que determina o início da fase aguda ou de ativação da CA (Bonini et al., 2009) (Figura 3). Caracteriza-se pela desgranulação, por reatividade cruzada e dependente de um influxo de cálcio intracelular, dos mastócitos associados às IgE alérgénio-específicas

que entretanto se ligaram aos epítopos (Day, 2008b; Sánchez-Hernández et al., 2011). Os grânulos destas células do sistema imunitário contêm potentes mediadores inflamatórios, entre eles a histamina, proteases como a triptase e a quimase, hidrolases, leucotrienos e fatores quimiotáticos de neutrófilos e eosinófilos (Bonini et al., 2009). A sua libertação induz, ainda que indiretamente, a produção de moléculas de adesão, fatores de ativação plaquetária e prostaglandinas pelas células endoteliais (Leonardi, Motterle & Bortolotti, 2008; Chigbu, 2009; Sánchez-Hernández et al., 2011). Dos mediadores citados, a histamina é o único capaz de desencadear grande parte da sintomatologia respeitante à CA, pelo que os seus efeitos virão a ser abordados na presente dissertação de mestrado, a propósito dos sinais clínicos da doença em causa.

Além disso, os mastócitos intensificam a síntese de IgEs alérgénio-específicas e as reações inflamatórias em curso através da produção de citocinas (Day, 2008b), o que resulta no aumento do calibre e permeabilidade dos vasos sanguíneos locais (Maggs, 2008b). Consequentemente, proteínas plasmáticas e células inflamatórias – sobretudo eosinófilos, relevantes neste contexto devido às proteínas citotóxicas sintetizadas (Takamura et al., 2011) – passam para o espaço intersticial, reduzindo a pressão osmótica e aumentando a pressão hidrostática dos capilares, o que leva à extravasão de fluido e ao surgimento de quemose (Day, 2008b; Maggs, 2008b). Também ocorre prurido e possivelmente broncoconstrição ligeira (Day, 2008b).

Figura 3 – Esquema representativo da fase de sensibilização e ativação das reações de hipersensibilidade do tipo I (adaptado de Day, 2008b).



Legenda: A – Alérgénio; APC – Célula apresentadora de antígeno; B – Linfócito B; IgE – Imunoglobulina do tipo E; IL – Interleucina; Mediadores inflam. – Mediadores inflamatórios; Th1 – Linfócito t *helper* 1; Th2 – Linfócito t *helper* 2.

Se por um lado as reações imunitárias do tipo imediato, associadas à CA aguda, têm uma duração máxima de 40 min. e consistem no conjunto de alterações vasculares previamente abordadas (Bacon et al., 2000; Day, 2008b; Chigbu, 2009); as do tipo tardio, dose-dependentes e respeitantes à CA crónica (Bonini et al., 1990), verificam-se até um máximo de 24 horas após a exposição ao Ag, aquando do influxo de eosinófilos, linfócitos T, macrófagos e neutrófilos, responsável pela infiltração da conjuntiva nestas células (Bonini et al., 2009; Sánchez-Hernández et al., 2011). Algumas moléculas de adesão vascular resultantes da atividade de citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 - por exemplo a molécula de adesão celular vascular do tipo 1 - e alguns fatores quimiotáticos de eosinófilos - tais como eotaxinas e proteínas quimiotáticas de monócitos - são responsáveis pelo influxo celular mencionado (Bacon et al., 2000; Day, 2008b; Chigbu, 2009). A fase tardia deste tipo de reações de hipersensibilidade é decisiva para que a CA se perpetue no tempo, o que conduz à manifestação de sinais clínicos distintos dos da forma aguda da doença, como é o caso da queratite (Chigbu, 2009). O surgimento de fibrose graças à proliferação e ativação de fibroblastos resultante da atividade de citocinas ajuda a que se mantenha a inflamação local (Bielory, 2000a).

3.1. Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular que se ligam a recetores específicos, levando assim à ativação de vias de sinalização intracelular. Produzidos por diferentes células, estes mediadores inflamatórios e imunitários podem ter um efeito autócrino, parácrino ou endócrino sobre o organismo (Day, 2008a).

O seu estudo é hoje possível graças à utilização de técnicas laboratoriais como a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. Para isso, há que quantificar a transcrição do mRNA contido em amostras de tecido celular ou culturas de leucócitos, sendo que os valores obtidos são diretamente proporcionais aos dos níveis de expressão do mRNA do gene respeitante à citocina analisada e portanto também às quantidades existentes da mesma (Day, 2008a). Esta técnica foi utilizada no âmbito da componente laboratorial da presente dissertação de mestrado, relativamente a amostras de conjuntiva palpebral canina, tendo-se quantificado os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10, cuja caracterização será realizada em seguida.

3.1.1. Interleucina-10

A descoberta da IL-10 remonta ao ano de 1989, tendo sido encontrada pela primeira vez em linfócitos Th2 pertencentes a roedores da subfamília Murinae (de Kosak et al., 2002). O tipo de atividade exercida sobre os linfócitos Th1 levou à sua classificação inicial enquanto fator inibidor da síntese de citocinas (Fiorentino, Bond & Mosmann, 1989). Trata-se de uma proteína solúvel comum a outras espécies, tais como a canina e a humana, cuja ação

complexa e variada associada a doenças inflamatórias e alérgicas a distingue (de Kosak et al., 2002; Ghasemi et al., 2012). Dada a escassez de estudos realizados no âmbito da sua expressão no cão, a descrição que se segue contempla maioritariamente a ação deste mediador inflamatório no organismo humano.

A produção da citocina em causa é realizada por um conjunto díspar de células, importando as que seguem, no contexto das doenças inflamatórias oculares: macrófagos, que equilibram os níveis de citocinas anti-inflamatórias – IL-4, IL-10, IL-13 e fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β) - e pró-inflamatórias – interferão-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Cavaillon, 1994; McClellan, Huang, Barrett, van Rooijen & Hazlett, 2003); fibroblastos conjuntivais, responsáveis pela presença desta proteína na lágrima aquando de doenças como a conjuntivite alérgica humana (CAh) (Leonard, Curnow, Zhan & Calder, 2006); linfócitos Th2 (Paolieri et al, 1997; Sano, Osawa, Sotozono & Kinoshita, 1998; Day, 2008b); linfócitos B (Ghasemi et al., 2012) e neutrófilos (Stumpf, Case, Shimeld, Easty & Hill, 2002). Das células mencionadas, os macrófagos e os linfócitos Th2 são os seus principais produtores (Day, 2008b; Ghasemi et al., 2012).

Esta citocina endógena desempenha um papel regulador no organismo cujas repercussões oculares variam mediante a origem e órgão-alvo. De uma forma geral, a sua função consiste em modular respostas do foro alérgico, inflamatório e imunitário conforme os níveis de produção que lhe estão associados (Ghasemi et al., 2012). Caso escasseie, torna-se provável o surgimento de doenças inflamatórias ou imunitárias, já que o seu contributo na inibição da libertação de citocinas não se verifica. Pelo contrário, a síntese exagerada da IL-10 pode ter efeitos imunossupressores, ocasionando o desenvolvimento de neoplasias (Sabat, 2010). Assim, ela beneficia o organismo apenas quando produzida em quantidades normais, que caso não se verifiquem colocam em risco o bom funcionamento do sistema imunitário (Mosser & Zhang, 2008). Em tecidos saudáveis de mamíferos é normal existir em quantidades muito reduzidas (Li et al., 2012).

Segundo a maioria dos estudos realizados em animais no âmbito da CA, a IL-10 atua de forma anti-inflamatória e antiangiogénica na sua presença, considerando-se importante para fins de regressão desta doença (Ghasemi et al., 2012). Nesse sentido, não só regula a síntese de citocinas pelos mastócitos (Bundoc & Keane-Myers, 2007) como ainda inibe, através de recetores dose-dependentes, a formação de neovasos a nível de diversas estruturas oculares, entre elas a conjuntiva e a córnea (Ghasemi et al., 2012).

Aquando da manifestação de respostas imunitárias celulares, a IL-10 minimiza a apoptose dos linfócitos T e favorece a sua diferenciação em Th2 através da inibição da libertação de citocinas produzidas pelos do tipo Th1 (de Waal, Yssel & de Vries, 1993; Groux, Bigler, de Vries & Roncarolo, 1998). Outras, como a IL-1, a IL-6, a IL-8, o TNF- α e a IL-12 - sintetizadas por macrófagos - surgem em menores quantidades pelo mesmo motivo (Kube et al., 1995). Nestas circunstâncias também a apoptose das células B é inibida, aumentando

a sua multiplicação, diferenciação e expressão do MHC II (Rousset et al., 1992). A IL-10 induz a morte apoptótica de alguns mastócitos e macrófagos em desenvolvimento, pensa-se, como forma de controlar a intensidade da resposta imunitária em vigor (Bailey, Kashyap, Bouton, Murray & Ryan, 2006; Speiran et al., 2009). Conduz também à produção de células *natural killer* citotóxicas (Carson et al., 1995). A sua síntese é inibida pela IL-4 e pela própria IL-10 de forma autorreguladora (Benjamin, Knoblock & Dayton, 1992).

4. Epidemiologia

Existem poucos estudos sobre a CAc e a CAh. Como consequência, é pouco abundante a bibliografia existente a esse respeito (Lourenço et al., 2011).

Dados de 2005 indicam que a manifestação de sinais clínicos oculares foi a segunda maior causa pela qual se recorreu a centros médicos espanhóis especializados em alergologia durante esse ano (Caballero-Martínez, 2006). No entanto estes pacientes não foram examinados por um oftalmologista. A especialidade clínica do profissional que examina e posteriormente acompanha estes pacientes alérgicos parece justificar, em parte, a falta de informação relacionada com a doença.

Em 2010, no âmbito da oftalmologia humana, o médico Sergio Bonini e a sua equipa realizaram um estudo inédito cujos resultados também levam a crer que assim seja. 2206 indivíduos alérgicos foram submetidos a consultas médicas de alergologia, dermatologia, oftalmologia e pneumologia. Quantificados os diagnósticos de CA decorrentes de cada uma delas, verificou-se a existência de uma discrepância percentual significativa conforme a especialidade médica considerada. Sem que tivesse havido alteração dos indivíduos examinados, foram estes os resultados obtidos no que refere ao diagnóstico de CA: 45% (alergologia), 10% (dermatologia), 90% (oftalmologia) e 35% (pneumologia) (Bonini, 2010). Estando a atenção do médico oftalmologista naturalmente direcionada para os olhos, compreende-se que a maior percentagem de diagnósticos de CA pertença à sua área clínica.

Ainda em 2010, nos Estados Unidos da América (E.U.A.), foi desenvolvido um estudo referente ao intervalo temporal compreendido entre 1988 e 1994 (Singh, Axelrod & Bielory). Os métodos utilizados pretendiam determinar a prevalência da sintomatologia ocular e nasal alérgica numa amostra formada por 20.010 indivíduos. A partir daí, e após comparação dos valores obtidos com os resultantes de testes cutâneos por picada (TCP), passar-se-ia a conhecer a prevalência desses sinais clínicos. Concluiu-se que 40% dos habitantes havia padecido de CA durante os 6 anos de realização do estudo e 6% tinham manifestado apenas sintomatologia ocular. O menor dos valores percentuais apresentados corresponde maioritariamente a indivíduos com idade superior a 50 anos (Singh et al., 2010).

Dados recolhidos entre 2006 e 2013 permitiram a obtenção de percentagens relativas à coexistência de CAh com doenças do foro alérgico (Bonini, 2006; Gradman & Wolthers,

2006; Palmares, Delgado, Cidade, Quadrado & Filipe, 2010; de Bruin Weller, Rockmann, Knulst & Bruijnzeel-Koomen, 2013).

Concluiu-se que 97% das crianças (Gradman & Wolthers, 2006) e 66% dos adultos (Bonini, 2006) também padecia de rinite, 56% (Gradman & Wolthers, 2006) e 16% (Palmares et al., 2010) de asma, 33% (Gradman & Wolthers, 2006) e 25%-42% (de Bruin Weller et al., 2013) de DA, respetivamente.

Títulos de artigos científicos como “*Allergic conjunctivitis: the forgotten disease*” (Bonini, 2006) e “*Prevalence of allergic conjunctivitis: a missed opportunity*” (Riedi & Rosario, 2010) denunciam o quanto havia e há ainda por desvendar no que respeita à CAh.

Também em medicina veterinária a especialidade clínica do médico é apontada como sendo um fator determinante quanto ao diagnóstico da doença em causa. Esta afirmação é corroborada por um estudo recente que teve lugar no Hospital Escolar da FMV-UL (Lourenço et al., 2011): 60 cães atópicos foram examinados pelo serviço de dermatologia e oftalmologia pertencentes à instituição citada, o que resultou em 10 e 36 diagnósticos de CA, respetivamente. A propósito da condição clínica destes pacientes, faz sentido referir a recorrente concomitância do diagnóstico de DAc com o de CAc (Wittich, 1941).

O valor estimado para a quantidade de animais e humanos atópicos é 10% (Hillier & Griffin, 2001), reconhecendo-se uma tendência para o seu aumento nas últimas décadas (Lourenço et al., 2011). No entanto, está ainda por determinar o valor exato da prevalência da CA na DAc. Foram poucos os estudos realizados neste sentido, remontando os 3 primeiros ao início dos anos 80: 30% (Willemse & van den Brom, 1983) e 50% (Scott, 1981; Willemse, 1984) são os resultados obtidos pelos dermatologistas responsáveis pela sua execução, para a variável em causa. Mais tarde, em 2001, a *American College of Veterinary Dermatology Task Force on Canine Atopic Dermatitis* afirmava que os sinais não cutâneos implicados no quadro clínico da DA surgiam com uma frequência baixa ou pelo menos variável, acreditando-se na existência de um número considerável de diagnósticos de CA por reconhecer, tal como chegou a ser publicado (Griffin & DeBoer).

Em 2010 foi realizado um outro estudo com uma amostra de 843 cães atópicos, cuja sintomatologia ocular investigada se resumia à de conjuntivite sazonal, desprezando-se a do tipo perene, muito embora seja comum a sua manifestação em cães europeus. 21% dos pacientes exibiam sinais de conjuntivite do primeiro tipo mencionado (Favrot, Steffan, Seewald & Picco).

Recordando o que anteriormente foi escrito, existe um número relevante de diagnósticos de CA associados à DA, que não chega a ter lugar em animais que padecem desta doença. A especialidade clínica do médico é decisiva para esta situação, mas outros motivos podem estar na sua origem (Lourenço et al., 2011). Por um lado, é possível que lesões graves em outros órgãos – neste contexto quase inevitavelmente a pele – façam com que a atenção despendida aos olhos seja insuficiente para obter um diagnóstico correto. Além disso, nem

sempre é fácil interpretar certos sinais clínicos como o prurido ocular, dado o facto do doente atópico coçar concomitantemente outras estruturas faciais de que são exemplo as orelhas, o focinho e a região perilabial. Também o tratamento a que estes animais são submetidos dissimula a sintomatologia alérgica da doença que, como é já sabido, pode passar pela ocorrência de conjuntivite. Os anti-inflamatórios sistémicos têm este efeito (Lourenço et al., 2011).

O Lulu da Pomerânia (Figura 4) e qualquer variedade de Poodle são exemplos de raças com predisposição para o surgimento de conjuntivite associada a DAc (Maggs, 2008b), embora não apresentem um maior risco relativo de atopia (Griffin & DeBoer, 2001; Lourenço, 2010). Qualquer raça pode ser afetada, sendo que a DA não é requisito obrigatório à manifestação da doença em estudo, havendo outras causas que lhe estão subjacentes (Maggs, 2008b) e que serão posteriormente abordadas nesta dissertação de mestrado.

Figura 4 – Exemplar de Lulu da Pomerânia, raça com predisposição para o surgimento de conjuntivite associada a DAc (adaptado de cdn.dogdogs.net/2011/04/lulu-pomerania02.jpg)



5. Etiologia

Enquanto órgão peculiar que é, o olho possui características anatómicas e histológicas especiais que nem sempre abonam a seu favor. A inexistência de uma barreira mecânica que o proteja dos múltiplos agentes que são veiculados pelo ar é uma delas. Desta forma, consiste numa estrutura anatómica cuja suscetibilidade ao desenvolvimento de reações alérgicas assume grande relevância (Bielory, 2011).

Como já foi referido, a conjuntiva é a mais exposta de todas as membranas mucosas do organismo e protege tanto física como fisiologicamente o globo ocular, através do tecido linfóide que tem na sua constituição (Samuelson, 2013). Trata-se por isso de uma estrutura imunologicamente ativa onde a probabilidade de ocorrência de fenómenos de hipersensibilidade é elevada, graças ao contacto regular com Ags, neste caso denominados alérgénios (Bielory, 2011). O conceito de CA tem por base essa mesma característica, definindo-se a doença em causa como um conjunto de reações do tipo citado, cuja

sintomatologia se manifesta nas pálpebras, na conjuntiva e/ou na córnea (Lourenço et al., 2011).

Apenas identificando a causa se consegue acompanhar e resolver um caso clínico, ou pelo menos fazê-lo da melhor forma. Embora esta condição se aplique aos pacientes de conjuntivite, nem sempre é simples reconhecer a etiologia da doença. De qualquer forma, a importância mantém-se (Maggs, 2008b).

São várias as circunstâncias que podem desencadear CA. O contacto direto com Ags veiculados aérea ou topicamente e a inalação ou ingestão de substâncias alergénicas são duas delas. É possível que a doença em causa surja concomitantemente com outros sinais de atopia ou resposta alérgica (Maggs, 2008b). Finalmente, também as toxinas libertadas por certas bactérias têm repercussões semelhantes no olho (Maggs, 2008b). Segue-se uma breve abordagem de cada um deles.

5.1. Alergénios veiculados aéreamente

De entre os vários alergénios capazes de desencadear este tipo de conjuntivite, o pólen, os fungos e os ácaros domésticos são os mais frequentes (Gelatt, 2014a). Consoante a sua concentração no ambiente em que o animal está inserido, assim será o grau de exposição aos mesmos e a probabilidade de manifestação de doenças oculares. A existência de uma proporcionalidade direta entre a prática da vacinação e a produção de IgEs dirigidas a alimentos e pólenes é uma possibilidade admitida para a espécie canina, embora a sua aplicação em doenças como a DA esteja ainda por desvendar (Day, 2008c).

5.2. Inalação e ingestão de alergénios

Nos humanos está já estabelecida uma associação entre a inalação de poluentes ambientais durante a infância e o desenvolvimento de doenças alérgicas na vida adulta. Novamente, e apesar de ser cada vez menos rara a partilha dos mesmos espaços pelo Homem e pelo cão, desconhece-se a adequação desta realidade à última espécie citada. Alterações da permeabilidade da mucosa e da imunorregulação justificam as consequências da exposição a esses poluentes, de que são exemplo os gases de escape de certos motores (Day, 2008c).

Do mesmo modo que a inalação de alergénios não é uma causa comum de CAc, também a alergia alimentar é pouco frequente enquanto agente ocasionador da doença. Os Ags alimentares que desencadeiam este tipo de reações ainda não foram identificados, variando conforme a formulação da dieta de cada animal, que por sua vez difere consoante a localização geográfica considerada (Day & Shaw, 2008). A sua manifestação é essencialmente gastrointestinal, implicando por vezes sintomatologia cutânea, de que é exemplo a blefarite alérgica e a dermatite periocular (Gelatt, 2014a). Os mecanismos imunopatológicos associados foram pouco estudados até à data, sabendo-se no entanto

que envolvem reações de hipersensibilidade do tipo I e provavelmente também do tipo III e IV. Podem ser desencadeados por mais de uma proteína pertencente à dieta (Day & Shaw, 2008).

5.3. Alergénios veiculados topicamente

Existem fármacos cujo efeito sobre o globo ocular é mal interpretado, razão pela qual se acredita que causem alergia. Tanto os que atuam a nível do sistema nervoso autónomo – por provocarem hiperémia e vasodilatação ocular – como aqueles que são naturalmente irritantes para o olho – por exemplo a pilocarpina devido ao seu potencial de hidrogénio iónico (pH) reduzido (Ramsey, 2011) - suscitam este tipo de confusão (Gelatt, 2014a). Assim, a sua classificação enquanto agente alergénico pressupõe o início de uma crescente irritação ocular logo após a aplicação tópica sobre o olho (Gelatt, 2014a). É o que acontece em relação à neomicina, ao timerosal e ao cloreto de benzalcónio (CB) (Gelatt, 2014a), cuja breve descrição será apresentada em seguida.

5.3.1. Neomicina

A neomicina integra a classe dos aminoglicosídeos, pelo que tem efeitos bactericidas através da inibição da síntese proteica realizada por parte dos microrganismos que lhe são sensíveis (Ramsey, 2011). As bactérias Gram-negativas (Gram-) fazem parte desse grupo, razão pela qual é eficaz aquando de infeções causadas por *Pseudomonas* spp. (Gelatt, 2014d). No entanto, tem-se revelado igualmente útil na presença de alguns Gram-positivos (Gram+), de que são exemplo o *Staphylococcus intermedius* (Gelatt, 2014d) e o *Enterococcus* spp. (Ramsey, 2011). O mesmo não se verifica quando o agente infeccioso é o *Streptococcus pyogenes* ou uma bactéria do tipo anaeróbio estrito (Ramsey, 2011; Gelatt, 2014d). Administra-se sob a forma de um colírio sempre que existem úlceras superficiais da córnea ou infeções superficiais não especificadas. Na presença de um epitélio corneano sem lesões, e portanto íntegro, o seu efeito antimicrobiano não se verifica. Normalmente está incluída em produtos farmacêuticos constituídos por 3 antibióticos diferentes, estando-lhe associado um valor percentual que pode variar entre 0,25 e 0,5 (Gelatt, 2014d). Em Portugal a neomicina é parte integrante de fármacos com unicamente 2 antibióticos, não estando disponível a combinação tripla citada.

5.3.2. Timerosal

Por seu lado, o timerosal, também designado tiomersal, consiste num composto organomercurial cujas reações alérgicas originadas se devem à formação de proteínatos de mercúrio com proteínas bacterianas (Epstein, Ahdoot, Marcus & Asbell, 2009). Na transição dos anos 80 para os 90 foram realizados estudos, tanto em animais como em humanos, com o intuito de conhecer as repercussões oculares deste agente conservante. Assim, em

1991 (Baines, Cai & Backman) e 1998 (Becquet et al.), em coelhos e ratos, respetivamente, foi possível constatar a ocorrência de uma resposta inflamatória significativa como resultado da administração tópica deste composto.

Anteriormente, em 1988, tinha já sido feito em humanos um outro estudo que apontava para a manifestação de sintomatologia ocular alérgica devido à utilização de uma solução para lentes de contacto cuja composição incluía timerosal (Tosti & Tosti). Suspeita-se atualmente que a sua aplicação no âmbito da oftalmologia prejudique o desenvolvimento das células estaminais presentes no limbo esclerocorneano (Nguyen, Srinivasan, Hiscott & Kaye, 2007). Surge em concentrações que variam entre 0,001 e 0,004% (Hong & Bielory, 2009).

5.3.3. Cloreto de benzalcónio

Finalmente, o CB, composto de amónio quaternário com propriedades tensoativas, também provoca irritação ocular. O seu efeito bactericida consiste na destruição da parede e membrana celulares de microrganismos Gram+ (Hong & Bielory, 2009). Não só integra a constituição de fármacos oculares tópicos - variando entre 0,004% e 0,02% em termos de concentração -, como também a de outros produtos de que são exemplo detergentes, desinfetantes, sabonetes e espermicidas (Hong & Bielory, 2009). As suas repercussões oculares interessam tanto à medicina veterinária como à medicina humana, razão pela qual existem estudos a este propósito em ambas as áreas. Recorrendo a ratos para fins experimentais, sabe-se hoje que o CB é tóxico para a conjuntiva e córnea já que altera a componente lipídica da lágrima, provavelmente através da sua ação enquanto detergente (Becquet et al., 1998). No que respeita ao ser humano, 2003 foi um ano de importantes descobertas associadas ao mesmo composto: concluiu-se que é capaz de impedir a proliferação e matar as células do cristalino mediante a dose utilizada (Goto, Ibaraki & Miyake); que a sua administração a longo prazo - enquanto constituinte de outros fármacos tópicos - em pacientes com doenças oculares crónicas, como o glaucoma, é prejudicial e responsável, no caso do exemplo anteriormente citado, pela morte de células pertencentes à rede trabecular do olho (Hamard et al.); e que da sua utilização resultam alterações do filme lacrimal, bastando para isso uma única administração do mesmo (Ishibashi, Yokoi & Kinoshita). Em 2008 um outro estudo viria a reforçar a hipótese de que indivíduos com doenças crónicas, por exemplo a DA, apresentam maior suscetibilidade ao CB e produtos conservantes idênticos (Dastychová, Necas & Vasku).

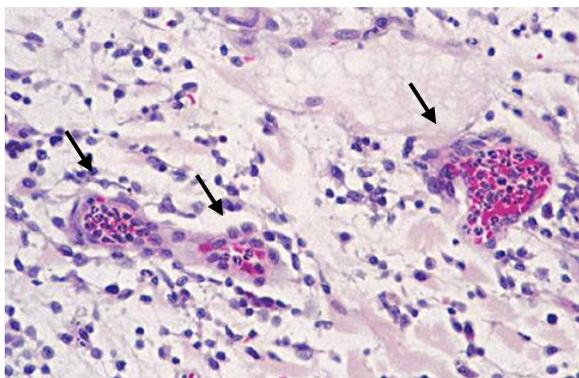
5.4. Atopia e resposta alérgica

Referiu-se anteriormente que a CAc está associada a outros sinais de atopia ou resposta alérgica (Maggs, 2008b). Assim, importa mencionar que a DAc consiste numa doença hereditária e depende de uma maior suscetibilidade de sensibilização aos alérgenos ambientais e cuja via de acesso ao organismo é sobretudo a epicutânea, mais do que a

inalatória (Day & Shaw, 2008). Esta particularidade, aliada ao facto da barreira cutânea estar alterada em animais atópicos, exacerba os sinais clínicos da doença (Marsella, Samuelson & Doerr, 2010).

A sua patogénese - quer no Homem, quer no cão - inclui duas fases, uma aguda e a outra tardia (Day & Shaw, 2008). A primeira delas tem uma duração aproximada de 15 a 20 min., enquanto a última, abundante em eosinófilos (Figura 5) e posteriormente linfócitos, varia entre 6 e 12 horas desde o início da exposição ao agente causal.

Figura 5 – Vasos sanguíneos (setas) contendo numerosos eosinófilos numa biópsia de pele de cão com hipersensibilidade cutânea do tipo I (adaptado de Day, 2008b).



Sabe-se que está envolvida uma reação de hipersensibilidade do tipo I (Figura 3) em que a quantidade de IgE produzida é exagerada.

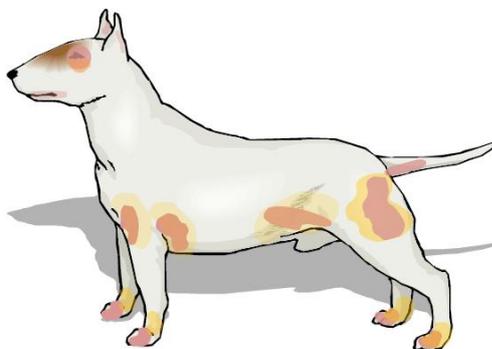
De entre os alérgenos ambientais capazes de ocasionar a dermatite em causa, os ácaros domésticos são os que maior relevância assumem na Europa (Hill & DeBoer, 2001), sendo tanto mais exacerbada a sintomatologia quanto maior for a exposição aos mesmos. Neste contexto, tanto em humanos como em cães atópicos, o quadro clínico associado deve-se sobretudo à ação de proteínas fecais ou do trato digestivo dos insetos citados, respetivamente (Day & Shaw, 2008).

A genética e a idade são parâmetros que condicionam o surgimento da DAC: *West Highland White Terrier* e Labrador são raças predispostas, embora ainda não tenham sido identificados os genes responsáveis por esta situação, ao contrário do que acontece no ser humano (Day & Shaw, 2008). 78% dos cães que manifestam a doença pela primeira vez têm menos de 3 anos, pelo que neste caso ser jovem não é uma vantagem (Favrot et al., 2010). A existência de predisposição sexual é uma hipótese por confirmar: há autores que atribuem uma maior prevalência da doença aos machos, outros às fêmeas e ainda quem duvide que o sexo do paciente possa influenciar o surgimento da DAC (Griffin & DeBoer, 2001; Favrot et al., 2010).

A gravidade das lesões pode ser avaliada com o CADESI-4, que é a versão mais recente das já utilizadas até à data. As lesões localizam-se normalmente no focinho, onde afetam

também a região periocular, e membros, embora seja possível a sua distribuição generalizada na superfície corporal do paciente (Figura 6). Devem-se ao autotraumatismo resultante do prurido (Day & Shaw, 2008).

Figura 6 – Esquema representativo do padrão lesional típico da DAc (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Ana Mafalda Lourenço).



Também a vacinação pode originar reações de hipersensibilidade do tipo I, sendo caracterizada por um aumento da produção de IgE e IgG. Esta capacidade resulta da existência de proteínas bovinas nas vacinas administradas, que se pensa predispor ao desenvolvimento de DAc e hipersensibilidade alimentar (Day, 2008d). Nem sempre há oportunidade para que a fase de sensibilização aos alérgenos vacinais ocorra, colocando-se a hipótese desta preparação para exposições futuras ser feita por transferência materna (Day, 2008d).

5.5. Toxinas bacterianas

Finalmente, também as toxinas libertadas por certas bactérias têm repercussões alérgicas no olho (Maggs, 2008b). Um exemplo das mesmas é o *Staphylococcus aureus*, que se encontra nos fundos de saco conjuntivais e/ou nas glândulas de *Meibomius* (Maggs, 2008b).

No âmbito da alergologia humana, a “teoria da higiene” surge como uma possível explicação para o número crescente de pacientes alérgicos desde os anos 60, no mundo ocidental (Day, 2008c). Segundo esta teoria, a quantidade e qualidade das ações praticadas que visam uma menor exposição aos agentes infecciosos, é responsável pelo aumento da prevalência das doenças alérgicas e imunomediadas. Tanto o cumprimento atempado do plano de vacinação como a aquisição conscienciosa de hábitos de higiene regulares ilustram o que anteriormente foi escrito (Day, 2008c).

São vários os estudos que confirmam esta teoria, levando a crer que o ambiente é um fator determinante no que respeita à ocorrência de fenómenos de hipersensibilidade (Bizikova et al., 2015). Assim, em 2001 foi demonstrada a existência de uma correlação negativa entre o

desenvolvimento de doenças alérgicas em crianças e o respetivo grau de exposição a endotoxinas ambientais (Gehring et al.), sendo que tanto a vida rural como a pecuária parecem assumir um papel protetor relevante relativamente à manifestação do grupo de doenças citado, em que se enquadra a DAh (Kipeläinen, Terho, Helenius & Koskenvuo, 2002; Dimich-Ward, Chow, Chung & Trask, 2006; Tse & Horner, 2008). Sabe-se, no entanto, que este efeito benéfico nem sempre se verifica, tal como acontece no caso da asma (Bertelsen et al., 2010). O tipo de resposta imunitária desencadeado pelo contacto com as endotoxinas presentes no ambiente depende da dose, caracterizando-se pela abundância em linfócitos Th1 sempre que os seus níveis são elevados e Th2 quando reduzidos (Eisenbarth et al., 2002).

6. Sinais clínicos

A CAc pode ser classificada em conjuntivite aguda ou crónica, de acordo com a sua duração no tempo. A sintomatologia que acompanha cada uma delas difere, muito embora a conjuntiva responda limitadamente a estímulos que perturbam o seu normal funcionamento (Gelatt, 2014a). Sendo assim, denomina-se CA aguda aquela cuja duração varia entre horas a dias (Carmichael, 2010). Como consequência, manifestam-se dois tipos de resposta quase indissociáveis: o vascular e o celular. No primeiro caso o fluxo sanguíneo e o calibre dos vasos altera-se; no segundo verifica-se a passagem de células inflamatórias para o espaço extravascular (Carmichael, 2010). Caso persista por semanas ou até mesmo meses, a CA diz-se crónica e implica a exposição prolongada da conjuntiva ao alérgeno que a desencadeou (Carmichael, 2010).

A resposta inflamatória resultante de lesões a nível do olho afeta frequentemente regiões oculares que não a originalmente prejudicada. Esta situação ocorre graças à ação que os mediadores químicos e os fatores de crescimento associados à resposta citada partilham com todo o globo ocular, dificultando a sua recuperação (Carmichael, 2010).

Os sinais clínicos característicos da CAc são corrimento ocular, epífora, hiperémia conjuntival, prurido, quemose e queratite concomitante (Lourenço et al., 2011). Blefarite e infeção bacteriana secundária podem também constar da sintomatologia desta doença (Day & Crispin, 2008). Caso se trate de um processo crónico, é possível que haja hiperplasia dos folículos linfáticos conjuntivais (Lourenço et al., 2011). A sua expressão depende de fatores ambientais, dos microrganismos presentes a nível ocular, da resposta imunitária do paciente e também de condicionantes genéticas (Irkec & Bozkurt, 2012). Segue-se uma breve descrição de cada um dos sinais clínicos mencionados.

O corrimento ocular consiste num exsudado que pode ser do tipo seroso, mucoso, purulento ou apresentar características que justifiquem uma designação que reúne mais do que um destes termos (Peterson-Jones & Stanley, 2009). Animais cuja gravidade da doença seja muito reduzida podem não manifestar este sinal clínico. Comummente, na fase aguda da

CA, é do primeiro tipo citado: o seroso. A sua presença deve-se à migração de fluido do espaço intravascular para o extravascular (Carmichael, 2010). Da sua constituição fazem parte soro, células sanguíneas e proteínas plasmáticas - entre as quais fibrinogênio e imunoglobulinas (Peterson-Jones & Stanley, 2009) -, pelo que é possível a eliminação de agentes nocivos ao globo ocular através da exsudação (Carmichael, 2010). Finda a passagem de fluido para fora dos vasos sanguíneos, as células endoteliais retraem-se, recuperando parcialmente o grau de adesão que existia entre elas (Carmichael, 2010).

Casos mais graves de CA estão normalmente associados à existência de corrimento ocular mucoso resultante da hipersecreção das glândulas lacrimais. A sua atividade exagerada deve-se à estimulação de que são alvo por parte dos alérgenos (Martin, 2010b).

Eventualmente, a coloração do corrimento pode sofrer alterações, assumindo uma tonalidade acinzentada, amarelada, esverdeada ou mesmo avermelhada (Maggs, 2008b). Havendo acumulação de detritos ou células inflamatórias, a cor adquirida corresponde a uma das duas primeiras. Por seu lado, um tom amarelado/esverdeado surge sempre que existe infecção bacteriana concomitante, tratando-se neste caso de um corrimento ocular mucopurulento ou simplesmente purulento, aquele que presenciamos (Figura 7).

Figura 7 – Cão com corrimento ocular purulento exuberante do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).



No contexto da CAC, lesões oculares resultantes muito provavelmente do autotraumatismo decorrente do prurido sentido, causam a presença de corrimento avermelhado (Maggs, 2008b). É possível que haja adesão das margens palpebrais sempre que o sinal clínico em causa se manifesta com maior gravidade (Maggs, 2008b).

A definição de epífora compreende uma produção lacrimal normal concomitante a alterações da sua drenagem (Figura 8). Costuma estar associada a outros sinais, como são a produção excessiva de corrimento mucoso, a hiperémia e a hiperplasia folicular, todos eles característicos da CA (Maggs, 2008b).

Figura 8 – Cão braquicefálico com epífora do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).



Por seu lado, a hiperémia conjuntival é o resultado de um conjunto de alterações nos vasos sanguíneos adjacentes à parte afetada do globo ocular (Carmichael, 2010) (Figura 9). Essas mesmas alterações integram a resposta do tipo vascular que é consequência da inflamação aguda da conjuntiva e dos mediadores inflamatórios que nela atuam (Maggs, 2008b). Inicialmente ocorre vasodilatação graças à ação da histamina sobre os recetores H1 e H2 das terminações nervosas das células endoteliais vasculares (Mortemousque et al., 2006). O aporte sanguíneo dos vasos aumenta, seguindo-se uma redução na velocidade de circulação do sangue contido no seu interior (Carmichael, 2010). Este sinal clínico pode-se manifestar em toda a conjuntiva ou então limitar-se à palpebral, como normalmente acontece. É do tipo difuso e expressa-se bilateralmente com maior intensidade junto ao fórnix (Martin, 2010b).

Tanto a hiperémia conjuntival como a episcleral são sinais precoces de CA, pelo que é conveniente a sua distinção através das características dos vasos de ambas as estruturas oculares citadas (Martin, 2010b). Esta necessidade tem a ver com o facto da hiperémia episcleral implicar quase inevitavelmente a existência de doenças graves, capazes de cegar o paciente, como são o glaucoma e a uveíte (Maggs, 2008b).

Figura 9 – Cão com hiperémia marcada da conjuntiva palpebral do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).



Outro sinal clínico da CAC é o prurido ocular, responsável pelo esfregar dos olhos – normalmente com recurso às patas – que visa o alívio dessa sensação (Maggs, 2008b). Eritema, escoriações e alopecia periocular são algumas das lesões que podem resultar desse comportamento (Gelatt, 2014a). Deve-se à ação da histamina sobre os recetores H1 das terminações nervosas (Mortemousque et al., 2006; Morales, Duran, Delgado & Hernández, 2008). É possível que haja blefarospasmo e semicerrar de olhos associados (Lourenço et al., 2011). Enquanto parte da sintomatologia, a sua importância é de tal ordem que, não existindo, a conjuntivite é de outro foro que não o alérgico (Bielory & Friedlaender, 2008). Além disso, um estudo recente provou existir uma proporcionalidade direta entre o prurido ocular e o score obtido através da avaliação clínica dos sinais de CA (Lourenço et al., 2011).

Também a quemose integra a sintomatologia da doença em causa (Figura 10). Desenvolve-se rapidamente em ambos os olhos graças ao efeito combinado da reação ao alérgeno – em que intervém a histamina e a IgE - com a disposição anatómica do estroma conjuntival (Gelatt, 2014a).

Figura 10 – Cão com quemose (edema da conjuntiva) da conjuntiva palpebral do olho direito (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).



A intensidade com que este sinal se manifesta é variável, sendo que nos casos mais graves pode provocar lagoftalmia (Maggs, 2008b), tal é a quantidade de líquido acumulada graças ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (Martin, 2010b). As alergias alimentares, a administração tópica ocular de fármacos e as picadas de insetos são causas de quemose (Gelatt, 2014a).

Não é frequente a existência de queratite aquando de CAC, tal como comprova um estudo recente cuja amostra abrangeu 60 cães atópicos (Lourenço et al., 2011). Apenas 6 foram afetados desta forma: 1 deles apresentava distrofia da córnea e 5 neovascularização da mesma estrutura ocular. Do grupo formado por estes últimos animais, 2 tinham queratite ulcerativa (Lourenço et al., 2011). Quando na presença de alterações corneanas como a

existência de neovasos, pigmentação, infiltração celular e deposição lipídica ou cálcica, consideramos que haja queratite concomitante (Delgado, 2014) (Figura 11).

Figura 11 – Cão com queratite pigmentar e corrimento purulento exuberante do olho esquerdo (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).



A blefarite alérgica pode ser consequência da administração sistêmica ou tópica ocular de fármacos, ou integrar o quadro clínico da DAc. No primeiro caso, há dermatite facial associada, enquanto no último a sua manifestação deriva do prurido sentido (Martin, 2010c). Além da blefarite, também o blefaroedema pode ocorrer no contexto da CA. Atopia, picadas de insetos (Aroch, Ofri & Sutton, 2008), prática da vacinação, alergias alimentares e novamente a administração tópica ocular de fármacos (Gelatt, 2014a) são causas possíveis deste sinal clínico. As pálpebras ficam edemaciadas e hiperêmicas, associando-se outras alterações como a dermatite, a alopecia, crostas e úlceras na pele (Maggs, 2008c). Quase sempre bilateral, o blefaroedema pode ser unilateral quando provocado por picadas de abelhas ou autotraumatismo de origem prurítica (Martin, 2010c).

Por outro lado, é também provável o desenvolvimento de infecção bacteriana secundária, cujo agente causal é, na maior parte dos casos, a bactéria *Staphylococcus aureus*. Presente nos fundos de saco conjuntivais e/ou nas glândulas de *Meibomius*, as toxinas libertadas originam CA (Maggs, 2008b). No âmbito da dermatologia humana, há estudos que comprovam um maior valor percentual de indivíduos atópicos infetados desta forma (80% a 100%), em comparação com os saudáveis (5% a 30%). Os resultados obtidos podem ser justificados através dos defeitos existentes a nível do sistema imunitário inato quando existe DAh (Novak, Bieber & Leung, 2003; Maintz & Novak, 2007; de Benedetto, Agnihothri, McGirt, Bankova & Beck, 2009; Ozdemir, Akadis & Akadis, 2009). Pouco se sabe acerca deste assunto no que respeita à medicina veterinária.

De uma forma sumária, o diagnóstico correto de CA é quase certo quando presenciamos a existência simultânea de hiperémia conjuntival, prurido ocular e quemose (Friedlaender, 2011). Estes 3 sinais, pela ordem com que foram mencionados, apresentaram uma

prevalência superior à dos restantes num estudo realizado com cães atópicos (Lourenço et al., 2011).

Sempre que a conjuntiva é cronicamente estimulada por substâncias antigénicas, em que se incluem as alergénicas, observa-se um aumento do número e dimensão dos folículos que constituem a superfície bulbar da membrana nictitante (Figura 12). No entanto, outras áreas conjuntivais podem estar igualmente afetadas (Gelatt, 2014a). Esta alteração clínica, designada conjuntivite folicular, ocorre tipicamente em cães com menos de 18 meses de idade e surge concomitantemente a outros sinais como são a hiperémia da conjuntiva e a presença de corrimento ocular mucoso (Gelatt, 2014a). Para que possa ser avaliada em toda a sua extensão, é por vezes necessário proceder à eversão da terceira pálpebra (Martin, 2010b).

Figura 12 – Cão com conjuntivite folicular a nível da superfície palpebral da membrana nictitante (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Esmeralda Delgado).



Finalmente, existem sinais cuja manifestação concomitante à CA não está diretamente relacionada com o globo ocular, como por exemplo rinite serosa, inflamação da gengiva, pavilhão auricular e faringe (Martin, 2010b).

Por outro lado, dado o facto de a CAh estar normalmente associada à existência concomitante de rinite, ela é muitas vezes designada por rinoconjuntivite (Sánchez-Hernández et al., 2015). O principal sinal clínico desta doença é o prurido ocular (Friedlaender, 2011). Costuma estar associado a epífora, hiperémia conjuntival e quemose moderadas, sensação de ardor nos olhos (Sánchez-Hernández et al., 2015) e corrimento ocular seroso ou mucoso (O'Brien, 2013). As pálpebras surgem edemaciadas e a conjuntiva palpebral com um tom rosa-pálido (Sánchez-Hernández et al., 2015). Por norma, não existe queratite concomitante (O'Brien, 2013) e a sintomatologia é bilateral (Sánchez-Hernández et al., 2015).

Eventualmente poderá haver ligeira hipertrofia dos nódulos linfóides a nível da conjuntiva palpebral superior, com distribuição difusa (Sánchez-Hernández et al., 2015). O quadro

clínico dos casos mais graves inclui visão turva (Suzuki et al., 2006), devido a alterações tanto na composição como na estabilidade da lágrima (Suzuki et al., 2006); e fotofobia (Sánchez-Hernández et al., 2015).

7. Diagnóstico

A classificação da conjuntivite depende do parâmetro que analisamos. Tanto a duração da doença, como o aspeto da conjuntiva, o tipo de corrimento ocular produzido e a etiologia são utilizados para esse fim, destacando-se o último citado em termos de relevância (Maggs, 2008b).

Por esse motivo, os dois primeiros parâmetros contribuem apenas para a realização do diagnóstico etiológico, que carece frequentemente de um exame oftálmico completo para corresponder à realidade (Maggs, 2008b). O exame oftálmico efetuado em cães atópicos no âmbito de um estudo de 2011 (Lourenço et al.) elucida os passos que devem constar do procedimento citado. São eles: observação à distância dos olhos, pálpebras e estruturas periorbitais com recurso a um foco de luz; TS; avaliação da resposta de ameaça e dos reflexos corneal, palpebral e pupilar (direto e indireto); tonometria; biomicroscopia com lâmpada de fenda para fins da visualização e posterior identificação de sinais clínicos; fundoscopia com oftalmoscópio indireto; citologia ocular utilizando uma *cytobrush*; e teste de fluoresceína (Lourenço et al., 2011). Esta necessidade resulta do facto da inflamação da conjuntiva nem sempre ser primária: situações há, em que advém de doenças graves capazes de cegar ou mesmo pôr em risco a vida do animal (Maggs, 2008b).

No cão, as causas de conjuntivite são prevalentemente não infecciosas – por exemplo queratoconjuntivite seca (QCS) e corpos estranhos -, ao contrário do que acontece com o gato, em que dependem da atividade de microrganismos como a *Chlamydomphila felis* (Maggs, 2008b).

A inexistência de um protocolo ou critérios que definam como deve ser realizado o diagnóstico de CA, é uma característica partilhada pela medicina veterinária e humana (Lourenço et al., 2011). Ainda assim, é possível enumerar alguns procedimentos que visam a identificação da etiologia da doença em causa, depois de confirmada a sua origem primária. Em relação à espécie canina podemos citar: a anamnese (Martin, 2010b); a sintomatologia clínica ocular e sistémica (Martin, 2010b); os resultados da citologia, biópsia e cultura conjuntivais (Day & Crispin, 2008); bem como a realização de testes alérgicos (Gelatt, 2014a) e análises sorológicas para fins de deteção de IgEs alérgico-específicas (Zemann et al., 2002).

Na prática clínica veterinária, os métodos geralmente utilizados para identificar e confirmar a presença da entidade clínica em causa são a anamnese, a sintomatologia ocular e sistémica, bem como o diagnóstico terapêutico, através do controlo da doença responsável pelo seu surgimento.

Segue-se uma breve abordagem a cada um dos tópicos mencionados.

7.1. Anamnese

Os donos nem sempre têm oportunidade de se fazer acompanhar permanentemente dos seus animais de estimação. Por essa razão, existem manifestações clínicas cuja percepção não ocorre de forma atempada, o que resulta numa ida ao médico veterinário quando são já bastante evidentes. Além desta situação, por vezes o relato dos factos afasta-se da realidade, dificultando a interpretação da história pregressa. Daí que, no contexto da CAc, existam questões que devem ser colocadas e sem as quais o diagnóstico da doença é complicado. Poder-se-á começar por saber qual foi e quais as características do estímulo iatrotópico, como por exemplo o seu início (agudo, subagudo, crónico) e evolução (estática, progressiva, regressiva, intermitente, episódica) (Gelatt, 2014c). Informações respeitantes aos antecedentes médicos familiares (Maggs, 2008a), à raça e idade do animal (Day & Shaw, 2008), ao ambiente em que vive, viagens efetuadas, hábitos alimentares (Maggs, 2008a) e reações adversas à vacinação (Day & Shaw, 2008), são bastante pertinentes quando se quer avaliar a probabilidade de estarmos perante um paciente alérgico. Isto acontece por nos permitirem saber quais os antigénios a que o mesmo esteve ou está exposto regularmente.

7.2. Sintomatologia clínica ocular e sistémica

Existe um método de avaliação quantitativa dos sinais clínicos de CA, desenvolvido para animais, que pretende avaliar a sua gravidade em cães, através da atribuição de um valor entre 0 e 3, tal como realizado num estudo de 2011 (Lourenço et al.). Com o mesmo objetivo, opta-se, no contexto da DAc, pelo CADESI-4 ou outro sistema equivalente, sendo este o mais recente e adequado dos utilizados para o efeito (Olivry et al., 2014). Mediante o *score* total obtido a partir do CADESI-4, assim é classificada a doença: 0-10 ligeira; 11-35 moderada; 36-60 grave (Olivry et al., 2014).

Tanto no Homem como no cão, a presença concomitante de outras doenças oftálmicas ou até mesmo sistémicas, pode dificultar o diagnóstico de CA através das semelhanças sintomatológicas que apresentam relativamente à mesma (Maggs, 2008b; Bielory, 2011). Não só a QCS como também outros tipos de conjuntivite, infeções subagudas ou crónicas e entidades clínicas do foro alérgico referidas na presente dissertação de mestrado, ilustram essa situação (Maggs, 2008b; Bielory, 2011). Neste contexto, o primeiro exemplo citado reforça a importância da realização do TS, encaminhando-nos às seguintes conclusões consoante os valores passíveis de serem obtidos no caso do cão: >15 mm/min. – produção lacrimal normal; 11-14 mm/min. – QCS subclínica; 6-10 mm/min. – QCS moderada; ≤5 mm/min. – QCS grave (Gelatt, 2014b). O corante rosa bengala (RB), ao evidenciar a mucina

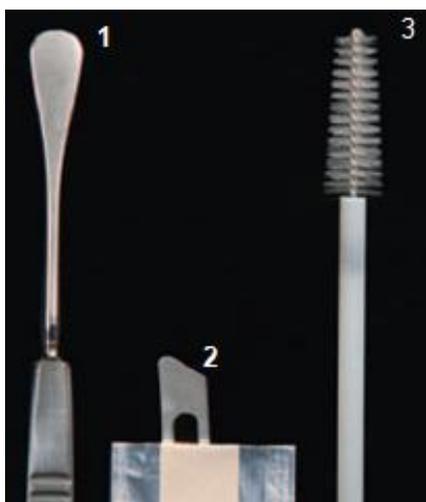
e as células em degenerescência, contribui para o mesmo diagnóstico diferencial (Gelatt, 2014b).

7.3. Citologia da conjuntiva

Por outro lado, a citologia da conjuntiva é um procedimento relativamente simples, cuja realização implica a limpeza prévia da superfície ocular. Isto significa que a recolha de amostras para cultura deve ser efetuada antes, de modo a que os microrganismos existentes não sejam removidos ou alterados pelos corantes utilizados (Gelatt, 2014c) que são o Giemsa ou a coloração de *Diff-Quik*, conforme se pretenda estudar as células ou as bactérias presentes no material biológico recolhido, respetivamente (Maggs, 2008b). A utilidade da citologia conjuntival é indiscutível, pois além de auxiliar o diagnóstico diferencial de conjuntivite aguda, também permite a identificação de corpos de inclusão (Martin, 2010a) e de tumores da conjuntiva (Maggs, 2008b).

As regiões anatómicas oculares preferidas para este efeito são o fundo de saco conjuntival inferior, bem como a superfície bulbar e palpebral da membrana nictitante (Gelatt, 2014c). Existem vários instrumentos médicos passíveis de serem manipulados com o intuito de se realizar uma citologia deste género, tais como: a zaragatoa; a extremidade romba de uma lâmina cirúrgica e esterilizada de bisturi; a espátula de Kimura e a *cytobrush* (Gelatt, 2014c) (Figura 13).

Figura 13 – Espátula de Kimura, lâmina esterilizada de bisturi e *cytobrush* (adaptado de Maggs, 2008a).



Legenda: 1 – Espátula de Kimura; 2 – Lâmina esterilizada de bisturi; 3 – *Cytobrush*.

O primeiro deles garante a menos invasiva das técnicas praticadas, pelo que a integridade das células é preservada. No entanto, a amostra celular obtida desta forma não é abundante, o que o torna menos eficaz que os restantes, cuja capacidade de recolher células por raspagem a maiores profundidades modifica frequentemente o seu aspeto original (Gelatt, 2014c). Daí que as zaragatoas sejam preferencialmente utilizadas na recolha de amostras para cultura de microrganismos (Martin, 2010a). Já os dois últimos foram concebidos especificamente para fins de realização do exame complementar de diagnóstico em causa. Atualmente, em medicina veterinária, a espátula de Kimura é o instrumento de eleição quando se procede a uma citologia conjuntival. Porém, o risco de danificar, tanto as células recolhidas como o próprio olho, é significativo (Gelatt, 2014c). A *cytobrush*, além das vantagens já mencionadas, permite a obtenção de uma só camada de células, prevenindo assim os obstáculos decorrentes da existência de sobreposição celular quando analisamos a amostra ao microscópio (Gelatt, 2014c). O contrário acontece em relação à citologia de impressão da conjuntiva, cujas células obtidas - numerosas, superficiais, ainda viáveis e não descamadas – tendem a sobrepor-se (Gelatt, 2014c). Dependendo das circunstâncias, a amostra poderá vir a ser sujeita à reação em cadeia da polimerase (PCR) ou imunofluorescência indireta, pretendendo-se com isso a identificação de microrganismos ou anticorpos, respetivamente (Martin, 2010a). Considerações a ressaltar em relação a estas técnicas: os resultados obtidos através do PCR dependem da integridade dos ácidos nucleicos, que pode ficar comprometida devido à ação do calor, radiação ultravioleta e/ou enzimas libertadas pelos tecidos danificados (Gelatt, 2014c); a imunofluorescência apenas é possível quando a amostra está simultaneamente por fixar e corar (Martin, 2010a).

Começa-se por anestésiar topicamente o globo ocular; subsequentemente a citologia é realizada utilizando um dos métodos enumerados sem que as estruturas manipuladas sangrem; a amostra é fixada, corada e transferida para uma lâmina a ser analisada microscopicamente e interpretam-se os resultados obtidos (Gelatt, 2014c). Pressupondo que a contenção do paciente é exemplar, a anestesia torna-se facultativa, mas por conferir maior tranquilidade ao exame e não alterar a microbiota local, este passo não costuma ser dispensado (Martin, 2010a).

Células epiteliais com núcleo e citoplasma bem dimensionado, escassas células queratinizadas, leucócitos e bactérias, bem como uma quantidade reduzida de mucina é o que se espera encontrar numa citologia conjuntival proveniente de um animal saudável (Gelatt, 2014a). Tratando-se de um paciente alérgico, a presença de um único eosinófilo confirma o diagnóstico, sendo habitual a abundância de plasmócitos e linfócitos (Gelatt, 2014a).

7.4. Biópsia da conjuntiva

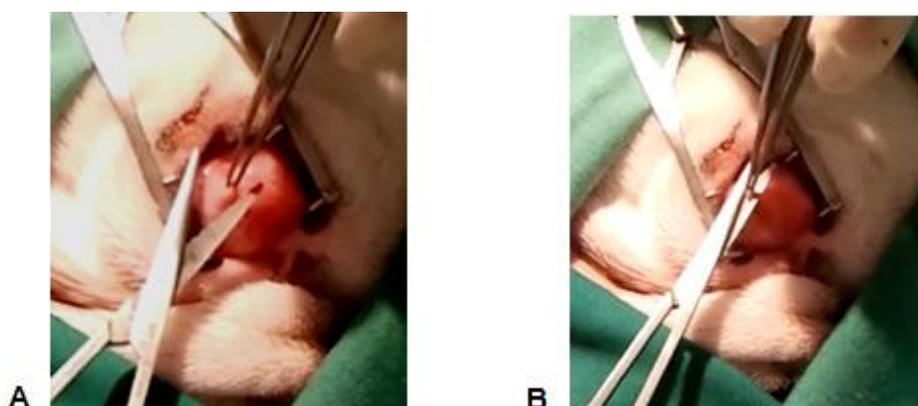
No caso das biópsias conjuntivais, é obrigatória a aplicação de duas gotas de anestésico ocular tópico intervaladas de 5 min. (Figura 14). Segue-se a escolha da região a ser manipulada, que deve abranger poucos ou nenhuns vasos sanguíneos para que a conjuntiva não sangre (Maggs, 2008b). Com o auxílio de uma pinça, destacamos a área selecionada, secionando-a depois com uma tesoura pequena de tenotomia (Figuras 14 e 15).

Figura 14 – Anestésico ocular tópico, pinça e tesoura de tenotomia utilizados no âmbito das biópsias de conjuntiva canina realizadas a propósito do estudo “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina” (fotografia original).



Legenda: 1 – Tesoura de tenotomia; 2 – Pinça; 3 – Anestésico ocular tópico.

Figura 15 – Realização de biópsia de conjuntiva em ambiente cirúrgico, no olho direito de um cão atópico: destaque com pinça (A) e seção com tesoura de tenotomia (B) (fotografias originais).



A amostra deve ser imediatamente conservada num meio adequado, para que não sofra alterações até ao momento em que vai ser fixada visando a sua análise histopatológica (Maggs, 2008b). As biópsias conjuntivais de pacientes alérgicos, à semelhança das citologias com a mesma origem, apresentam eosinófilos. Outras alterações incluem: hiperplasia das células epiteliais e caliciformes, metaplasia escamosa, ulceração, epitélio com poucos mastócitos, e infiltração linfoplasmocitária, caso se trate de uma conjuntivite crónica (Day & Crispin, 2008). Ainda a propósito das biópsias de conjuntiva, a fase laboratorial do estágio curricular implicou a realização de 24, com o intuito de serem conhecidos os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 em animais alérgicos comparativamente aos saudáveis. A experiência em causa será abordada posteriormente na presente dissertação de mestrado.

7.5. Cultura da conjuntiva

Não é habitual a realização de culturas conjuntivais sem que antes a terapêutica prescrita tenha falhado, já que são poucas as bactérias que atuam como causa primária de conjuntivite em pequenos animais (Maggs, 2008b). Aliás, estima-se que 46 a 90% dos cães saudáveis apresente uma flora bacteriana predominantemente Gram+ e aeróbia, localizada no fundo de saco conjuntival inferior. *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp. são espécies prevalentes a esse nível (Gelatt, 2014a). Tanto os microrganismos Gram- e/ou anaeróbios como os fungos estão raras vezes associados à conjuntiva (Gelatt, 2014a). Pelo facto de poder haver infeção bacteriana secundária associada ao quadro clínico de CAc (Day & Crispin, 2008), nem sempre podemos dispensar este meio de diagnóstico.

A aplicação tópica de anestésico ou do corante RB impossibilita a obtenção de informações fidedignas através da cultura realizada, dado o efeito bactericida (Bjerkås, Ekestén, Narfström & Grahn, 2009) e viricida (Roat, Romanowski, Araullo-Cruz & Gordon, 1987) que os caracteriza, respetivamente. Confirmando-se que nenhuma destas situações ocorreu, começamos por escolher o material a ser utilizado, sabendo que a amostra tanto pode ser recolhida com zaragatoa como por esfregaço, recorrendo-se neste último caso a uma lâmina cirúrgica e esterilizada de bisturi ou mesmo à espátula de Kimura (Gelatt, 2014a) para o efeito. Como pretendemos aceder ao fundo de saco conjuntival inferior anteriormente à membrana nictitante, vamos pressionar a pálpebra superior sobre o olho do animal, enquanto a inferior é cuidadosamente puxada para baixo, o que permite a exposição da membrana citada (Gelatt, 2014c). Caso tenhamos optado pela zaragatoa, embeber a sua extremidade em solução salina estéril é uma forma de proporcionar maior segurança a este procedimento - existe menos atrito em relação à superfície da conjuntiva - ao mesmo tempo que o crescimento dos microrganismos recolhidos é favorecido (Gelatt, 2014c). Um estudo de 1972 (Urban, Wyman, Rheins & Marraro) atribui ao alginato de cálcio a última vantagem citada. Os exames microbiológicos ou virológicos que se seguem à colheita da amostra,

determinam o material que constitui a zaragatoa (Gelatt, 2014c). A técnica do PCR não exige cuidados a esse nível (Gelatt, 2014c).

Idealmente ambos os olhos são sujeitos a cultura conjuntival, mas por questões financeiras nem sempre é possível fazê-lo, procedendo-se unilateralmente ao exame em causa (Martin, 2010a).

Finda a realização da cultura da conjuntiva, a amostra deverá ser imediatamente colocada no respetivo meio de transporte (Martin, 2010a). Pode-se optar pela sua introdução num meio de cultura ágar sangue ou num caldo de tioglicolato e nutrientes (Maggs, 2008b).

É importante não esquecer a disparidade de doenças caracterizadas por um sobre crescimento bacteriano conjuntival, de modo a que a microbiota recolhida desta forma não seja erroneamente interpretada como causa da conjuntivite (Maggs, 2008b).

7.6. Testes intradérmicos e análises sorológicas

Relembrando o que inicialmente foi mencionado, tanto a realização de testes alérgicos (Gelatt, 2014a) como a de análises sorológicas são meios capazes de detetar IgEs alérgico-específicas no cão, embora com algumas limitações (Zemann et al., 2002).

Foi já referido que existe uma associação recorrente entre a CAC e outros sinais de atopia ou resposta alérgica (Maggs, 2008b). Assim, ao nos alertar para a provável existência da primeira doença citada, importa abordar na presente dissertação de mestrado, o principal meio de confirmação do diagnóstico de DAC: os testes intradérmicos (TI) (Reedy, Miller & Willemse, 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Scott, Miller & Griffin, 2001).

A importância e subjetividade das conclusões a que permitem chegar, implicam a sua realização por parte de alergologistas veterinários experientes (Lourenço, 2010). Pelo facto da maior parte dos cães apresentar um certo grau de sensibilização para diversos alérgenos ambientais, este exame apenas se aplica àqueles em que foram excluídas outras causas de prurido (Lourenço, 2010).

De forma a evitar níveis de IgE alérgico-específica muito reduzidos ou um período de falha no sistema imunológico, é importante que ocorram imediatamente antes ou depois do pico polínico em animais com DA sazonal (Hillier & DeBoer, 2001).

A realização dos TI requer uma bateria de 25 a 30 alérgenos (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001). A sua produção resulta da diluição de extratos concentrados dos mesmos (Hillier & DeBoer, 2001) e a constituição varia conforme a localização geográfica e o estilo de vida do paciente (Matias, 2013). Pólenes, fungos e ácaros domésticos e de armazenamento integram frequentemente o painel de alérgenos utilizado (Hillier & DeBoer, 2001). Encontram-se no estado líquido e devem ser refrigerados (Hillier & DeBoer, 2001), bem como substituídos a cada 14 dias, caso estejam contidos em seringas de plástico (Reedy et al., 1997).

Os TI incluem obrigatoriamente dois controlos (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001): um negativo, que corresponde a uma solução salina utilizada para diluir os extratos de alérgenos, e um positivo, que é por norma o fosfato de histamina (Reedy et al., 1997). O resultado das provas alergológicas realizadas considera-se positivo sempre que no local da administração do alérgeno surge uma pápula eritematosa passados cerca de 15 min. (Matias, 2013) (Figura 16).

Figura 16 – Reações cutâneas positivas manifestadas por um cão atópico após a administração intradérmica de extratos de alérgenos (fotografia gentilmente cedida pela Doutora Ana Mafalda Lourenço).



Caso este tipo de manifestação clínica tenha lugar 6 horas após o teste (Olivry, Dunston, Murphy & Moore, 2001; Hillier, Cole, Kwochka & McCall, 2002), a interpretação depende do autor, encontrando-se ainda por definir a sua relevância no âmbito da DAC (Hill, Hillier & Olivry, 2001; Scott et al., 2001). A pele do tórax lateral é a região anatómica preferida para este meio de diagnóstico, sendo necessário tricotomizá-la antes (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001). Devido às alterações provocadas pelos níveis serológicos de cortisol e também por questões de segurança e conforto, os animais estão sedados durante todo o procedimento (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001).

Infelizmente, e à semelhança do que acontece para os mais variados testes, também neste podem surgir falsos positivos e/ou negativos, pelo que uma anamnese rigorosa e detalhada é essencial aquando da análise dos resultados (Scott et al., 2001). Se por alguma razão o controlo positivo não funcionar, o teste deixa de ser considerado válido (Hillier & DeBoer, 2001).

7.7. Diagnóstico de conjuntivite alérgica humana

Relativamente ao Homem, são considerados úteis, para fins de diagnóstico de CA, os seguintes parâmetros: antecedentes familiares e pessoais de atopia, sintomatologia clínica, testes cutâneos, análises sorológicas para deteção de IgEs alérgico-específicas (Leonardi et al., 2012), citodiagnóstico (Kari & Saari, 2010), resposta a anti-histamínicos e estabilizadores da membrana celular dos mastócitos (EMCMs) (Owen, Shah, Henshaw, Smeeth & Sheikh, 2004) e testes de provocação conjuntival (TPC) (Leonardi, 2005).

À semelhança do que acontece no caso do cão, foi criado um algoritmo de diagnóstico a ser aplicado em pacientes humanos, que visa o reconhecimento do tipo de conjuntivite existente (Mantelli, Lambiase & Bonini, 2009).

Por outro lado, de entre os vários testes alérgicos disponíveis, os TCP são os mais utilizados em medicina humana (Oppenheimer & Nelson, 2006b), sendo necessário conhecer o historial médico do paciente antes da sua realização (Antunes, Borrego, Romeira & Pinto, 2009; Bousquet et al., 2012). A sua aplicabilidade nos animais está muito pouco estudada, desconhecendo-se quão eficazes poderiam ser neste contexto (Rocha, 2012).

A preferência por estes testes – em relação aos TI, por exemplo - resulta de diferentes vantagens que lhes estão associadas, tais como: a segurança, simplicidade e rapidez de execução; o facto de não serem nem dolorosos, nem caros; dos resultados serem obtidos pouco tempo depois, podendo ser confirmados visualmente pelo próprio paciente (Antunes et al., 2009; ASCIA, 2009); e ainda de poderem ser utilizados extratos alérgicos em glicerina 50%, minimizando-se desta forma a probabilidade de ocorrência de falsos positivos graças a uma menor irritação da pele (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Oppenheimer, Durham & Nelson, 2007; Bernstein et al., 2008). Esta última particularidade torna-os mais específicos em relação aos TI, mas não mais sensíveis, uma vez que requerem doses superiores de alérgico para que a resposta obtida seja idêntica (Oppenheimer et al., 2007; Bernstein et al., 2008; ASCIA, 2009).

Sempre que a pápula associada aos controlos positivo e negativo tem um diâmetro médio inferior (Antunes et al., 2009; Bousquet et al., 2012) ou superior a 3 mm (Antunes et al., 2009), respetivamente, considera-se que o teste é inválido. O mesmo se passa para reações eritematosas cujo diâmetro supera ou iguala os 10 mm no caso do controlo negativo (Antunes et al., 2009). A realização dos TCP não deve ocorrer em pacientes com dermatofimose grave e/ou em regiões anatómicas onde exista dermatite ativa (Bernstein et al., 2008; Bousquet et al., 2012).

No caso dos TI, recomenda-se o uso de lancetas esterilizadas com ponta de 1 mm (Dreborg, 2001), uma única vez por cada alérgico (Antunes et al., 2009). Cada picada deverá distar, no mínimo, 2 cm em relação à anterior (Dreborg, 2001; Antunes et al., 2009).

A leitura dos resultados faz-se idealmente 15 min. após a introdução do alérgico até uma profundidade que não ultrapasse a derme superficial (Bousquet et al., 2012). Segue-se a

classificação dos mesmos em “positivo” ou “negativo”, havendo quem lhes atribua um valor de 0 a +4 de acordo com uma escala concebida para esse efeito (Oppenheimer et al., 2007). Podem ocorrer resultados falsos positivos e/ou negativos que não devem ser desconsiderados (Antunes et al., 2009).

Nem sempre os testes cutâneos anteriormente abordados, ou mesmo a realização de análises sorológicas, possibilitam a deteção de níveis de IgEs alérgico-específicas que sejam esclarecedores e concordantes com o diagnóstico de CA (Pallasaho, Rönmark, Haahtela, Sovijärvi & Lundbäck, 2006). Os motivos variam: sensibilização a múltiplos alérgenos (Pallasaho et al., 2006), a presença de outras glicoproteínas como a IgG, níveis de IgE inferiores ao limiar de deteção (Fujishima, Toda, Shimazaki & Tsubota, 1996) e falta de cooperação por parte do paciente (Antunes et al., 2009; ASCIA, 2009), são exemplos.

Não só as IgEs alérgico-específicas totais e livres, como também as citocinas e mediadores inflamatórios (Leonardi, 2005), fazem parte do grupo de mediadores químicos pertencentes ao filme lacrimal cuja medição é realizada em humanos para fins de identificação de um marcador específico de alergia ocular (Leonardi, 2013). Estudos realizados permitiram concluir que a concentração dessas imunoglobulinas na lágrima é quantitativamente reduzida em indivíduos saudáveis, ao contrário do que acontece nos alérgicos, em que se encontra aumentada (Leonardi, 2013). Além disso, existe uma maior coerência entre os resultados obtidos desta forma - quando comparados aos que provêm de análises sorológicas ou testes cutâneos - e os que derivam dos TPC (Hoffmann-Sommergruber et al., 1996; Leonardi, 2013).

De uma forma geral, apenas os níveis das citocinas lacrimais associados a doenças alérgicas graves e não sazonais são considerados significativos (Möller, Björkstén, Nilsson & Dreborg, 1984).

Em relação aos mediadores da inflamação passíveis de serem analisados a partir da lágrima, a histamina, a triptase e a proteína catiónica eosinofílica são os que importam mencionar no contexto da CAh. Os dois primeiros revelaram ser mais úteis na avaliação da eficácia dos EMCs do que no diagnóstico do tipo de conjuntivite em causa (Leonardi, 2005), apresentando pouca especificidade nesse sentido (Leonardi, 2013). Já a proteína citada, não só está aumentada em qualquer doença ocular do foro alérgico (Leonardi, Borghesan, Faggian, Secchi & Plebani, 1995; Montan & van Hage-Hamsten, 1996; Pucci et al., 2003), como também em situações que envolvam lesões na córnea.

O citodiagnóstico a que se procede em medicina humana pode ser realizado de formas distintas, nomeadamente por: recolha de poucos microlitros de lágrima por capilaridade; esfregaço; citologia de impressão e biópsia (Leonardi, 2005). O primeiro destes métodos realiza-se em poucos minutos e quase garante a presença de CA quando se deteta, no mínimo, um eosinófilo (Leonardi, 2005). No entanto, a sua ausência não é condição suficiente para que se possa garantir a inexistência da doença em causa, tal como acontece

na citologia da conjuntiva (Leonardi, 2005; Leonardi et al., 2012). Dado o facto da amostra celular colhida por esfregaço conjuntival ser quantitativamente superior àquela que se obtém através da lágrima, a probabilidade de serem encontrados eosinófilos é maior neste caso (Leonardi, 2005).

Tratando-se de um meio de diagnóstico não invasivo, a citologia de impressão da conjuntiva é ideal para o estudo de doenças relacionadas com o filme lacrimal (Leonardi, 2005).

Atualmente, o citodiagnóstico tem uma reduzida aplicabilidade à prática clínica, contrariamente ao que acontece em termos de investigação (Kari & Saari, 2010).

Se por um lado a resposta aos anti-histamínicos e aos EMCs não será abordada, para já, nesta dissertação de mestrado, o mesmo não se passa em relação aos TPC, cujas características se mencionarão em seguida.

7.8. Testes de provocação conjuntival

Caso pretendamos saber quais os alergénios responsáveis pelo quadro clínico observado, optar pela realização de um teste de provocação alérgico será o mais indicado (Høst & Halken, 2003). Existem várias estruturas anatómicas passíveis de serem analisadas desta forma, nomeadamente a mucosa brônquica, a mucosa nasal, a pele e a conjuntiva (Bernstein et al., 2008), interessando-nos, neste contexto, a última referida.

Os TPC tanto são úteis quando se trata de um paciente sensível a múltiplos alergénios – situação comum em casos crónicos de conjuntivite (Mortemousque et al., 2006) -, como na presença de análises sorológicas para fins de deteção de IgEs alérgico-específicas e testes cutâneos negativos em indivíduos cuja anamnese sugere a existência de CA (Leonardi, 2005). Caso a doença tenha carácter sazonal, o exame em causa é vantajoso se o alergénio para o qual foram identificadas IgEs alérgico-específicas não for o esperado (Mortemousque et al., 2006). Partindo desses pressupostos, um estudo de 2011 realizado no âmbito da medicina veterinária associou, através deste meio de diagnóstico, as reações do foro alérgico presentes na conjuntiva de cães atópicos a ácaros para os quais se sabia existir hipersensibilidade (Lourenço et al.).

Finalmente, os TPC também permitem estudar a fisiopatologia do tipo de conjuntivite em questão e avaliar o êxito da terapêutica instituída, tal como se tem vindo a verificar em relação a múltiplos fármacos oculares antialérgicos (Friedlaender, 2002).

Tanto em animais como em humanos, a elevada especificidade e sensibilidade que caracteriza estes testes (Bertel, Mortemousque, Sicard & André, 2001; Lourenço et al., 2011) consegue-se através do cumprimento de algumas condições sem as quais o rigor e validade dos mesmos seriam questionados. Por um lado é necessário interromper a administração de certos fármacos como são os anti-histamínicos H1 ou antagonistas dos recetores H1 da histamina. Uma semana é o intervalo de tempo requerido para o efeito, podendo estender-se a 3 no caso do cetotifeno (Mortemousque et al., 2006). Os

corticosteróides deverão ser suspensos 2 semanas ou pelo menos 2 dias antes dos TPC, aplicando-se o último intervalo temporal àqueles cuja administração é tópica e ocular (Mortemousque et al., 2006).

Este exame decorre idealmente em ambiente hospitalar (Lourenço et al., 2011) e obrigatoriamente numa altura em que o paciente não está, nem exposto à ação dos alérgenos, nem a manifestar sinais clínicos de CA (Mortemousque et al., 2006). A presença de um oftalmologista não é essencial durante todo o procedimento, podendo cingir-se à fase inicial, em que o indivíduo a ser testado é interrogado e o seu estado de saúde avaliado (Mortemousque et al., 2006). Isto não se aplica ao médico responsável pelo teste, que deverá estar pronto a atuar em caso de reação anafilática (Lourenço et al., 2011), pelo que dispõe de anti-histamínicos, corticosteróides e broncodilatadores para o efeito. À conclusão do exame segue-se um período mínimo de 2 horas de vigilância do paciente (Mortemousque et al., 2006).

Estudos realizados indicam que 2 TPC consecutivos deverão distar uma semana entre si (Willemse & van den Brom, 1983; Hillier & Griffin, 2001; Lourenço et al., 2011).

É desaconselhada a utilização de misturas de alérgenos, pois a resposta alérgica induzida por cada um deles dificilmente coincidirá, suscitando dúvidas aquando da interpretação dos resultados (Radcliffe, Lewith, Prescott, Church & Holgate, 2006). Os extratos mais comuns correspondem a pólenes, ácaros, pêlos de animais e um género de fungo denominado *Alternaria* (Mortemousque et al., 2006). Os controlos positivo e negativo associados aos TPC são os mesmos que se utilizam para os TI efetuados no âmbito da medicina veterinária (Bernstein et al., 2008).

Sobre o olho que funciona como controlo, aplica-se topicamente uma gota de solução salina (Mortemousque et al., 2006). O fundo de saco conjuntival contralateral será testado através da administração tópica de concentrações crescentes de extratos de alérgenos previamente diluídos (Radcliffe et al., 2006). Esta tarefa repete-se de 15 em 15 min. até que o resultado do exame seja positivo (Mortemousque et al., 2006) e surjam sinais clínicos de rinoconjuntivite (Garcia-Ortega, Costa & Richart, 1989). Para que isso aconteça, o *score* de CA deverá ser igual ou superior a 5 (Radcliffe et al., 2006). Este protocolo demonstrou ser eficaz também em cães, pelo que há quem sugira a sua prática recorrente no âmbito da medicina veterinária (Lourenço et al., 2011).

Até à data não se conhece qualquer teste laboratorial cuja especificidade seja de tal forma elevada que permita por si só chegar ao diagnóstico definitivo de CAh (Leonardi, 2013).

8. Tratamento

A abordagem terapêutica a que se procede no contexto da CA poderá ser de 2 tipos que se complementam: o não-farmacológico e o farmacológico (Sánchez-Hernández et al., 2011).

Se optarmos pela regressão e controlo da doença em causa através de métodos que prescindem da utilização de fármacos, minimizar a exposição aos alérgenos que desencadeiam sintomatologia alérgica no paciente é uma prática a ser considerada (Bilkhu, Wolffsohn & Naroo, 2012). No caso do ser humano, a utilização de óculos-de-sol que protejam os olhos, consiste numa medida simples e eficaz de o fazer, reduzindo simultaneamente a fotofobia manifestada (Bilkhu et al., 2012). Também a aplicação de compressas frias e húmidas, a administração de lubrificantes oculares e a realização de lavagens com soro fisiológico são úteis por várias razões: não só contribuem para a remoção dos alérgenos, reforçando assim a proteção da superfície ocular (Leonardi et al., 2012; La Rosa et al., 2013), como também promovem a vasoconstrição, o que diminui a hiperémia e o edema (Bilkhu et al., 2012).

Por outro lado, a terapêutica farmacológica instituída pode compreender vários grupos de fármacos e procedimentos, nomeadamente: vasoconstritores, anti-histamínicos, EMCs, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), corticosteróides, imunoterapia alérgico-específica (ITAE) e anticorpos monoclonais.

Há que mencionar a abordagem terapêutica da CAC a que habitualmente se recorre no âmbito da prática clínica veterinária, agora que as várias opções de tratamento foram mencionadas. Assim, além da evicção alérgica e da aplicação de lubrificantes oculares (Gelatt, 2014a), também a administração tópica de corticosteróides na menor dose e frequência possíveis é praticada (Maggs, 2008b; Gelatt, 2014a). Existindo infeção bacteriana concomitante, a prescrição de antibióticos locais deve ser realizada (Maggs, 2008b). Casos mais graves - em que há envolvimento da pele - requerem um controlo rigoroso da causa primária, que é normalmente a DAC (Maggs, 2008b). Segue-se uma breve abordagem a cada um deles.

8.1. Vasoconstritores

Através da estimulação direta dos recetores α -adrenérgicos, os vasoconstritores provocam midríase, ao mesmo tempo que reduzem a hiperémia conjuntival e o eritema resultantes da vasodilatação existente aquando de CA (Leonardi et al., 2012; La Rosa et al., 2013). Apesar desta vantagem, a utilização desregrada dos mesmos é prejudicial, dado o ardor e aumento da PIO que lhe estão associados (Leonardi et al., 2012). Embora raros, já foram identificados casos de cães e gatos com hipertensão arterial e arritmia cardíaca provocadas pela aplicação tópica ocular de fenilefrina (Gelatt, 2014d).

A sua ação é pouco duradoura - inferior ou equivalente a 2 horas –, apresenta elevada taquifilaxia (Sánchez-Hernández et al., 2015) e baixa especificidade em relação à cascata de eventos inflamatórios e alérgicos próprios da conjuntivite do mesmo tipo (Gelatt, 2014d). Por isso, a utilização de vasoconstritores deverá ser realizada com particular cuidado em indivíduos que padeçam de glaucoma, doenças cardiovasculares e/ou hipertiroidismo (Bielory, 2012).

8.2. Anti-histamínicos

Existem duas vias de administração possíveis para os anti-histamínicos: a sistémica e a ocular tópica. A via sistémica é a mais indicada no controlo e regressão de casos agudos de CAc (Maggs, 2008d). Tratando-se de antagonistas dos recetores H1 da histamina, eles reduzem a hiperémia conjuntival, o prurido e a rinite através da ligação reversível aos mesmos (Sánchez-Hernández et al., 2015).

No contexto da medicina humana, estudos realizados revelaram a possibilidade de ocorrerem alterações no filme lacrimal provocadas pela utilização destes fármacos, que intensificam as reações inflamatórias desencadeadas por alérgenos (Gomes et al., 2013). Preferem-se os anti-histamínicos de primeira geração aos de segunda, por terem menos efeitos secundários e eficácia semelhante (Bousquet et al., 2008).

A via ocular tópica prima pela rapidez com que origina efeito. A ação do medicamento utilizado tanto pode ser breve e pouco intensa, como duradoura e segura, caso optemos por um anti-histamínico de primeira ou segunda geração, respetivamente (Verin et al., 2001; Kari & Saari, 2010; Abelson, McLaughlin, & Gomes, 2011; Sánchez-Hernández et al., 2015). Com o objetivo de maximizar a eficiência da atividade terapêutica dos primeiros mencionados, é frequente a sua associação aos do tipo sistémico – o que também acontece em relação aos de segunda geração - ou a vasoconstritores (Sánchez-Hernández et al., 2015). De uma forma geral, os corticosteróides são mais eficazes na resolução de quadros clínicos de CAc (Maggs, 2008d), embora existam poucos estudos a este respeito (Gelatt, 2014a).

Tanto em medicina veterinária como em medicina humana, a cetirizina consiste num exemplo de anti-histamínico cuja administração é feita pela via oral; e a azelastina, a par do cetotifeno, cuja aplicação se realiza topicamente a nível ocular (Sánchez-Hernández et al., 2011). Os dois últimos fármacos mencionados pertencem ao grupo dos anti-inflamatórios de dupla ação, cujo efeito é duradouro e quase imediato (Bielory, 2012). Enquanto que a azelastina também se comporta como um inibidor do fator de ativação das plaquetas e de expressão das moléculas de adesão intercelular (Sánchez-Hernández et al., 2015), o cetotifeno reúne características que permitem a sua classificação como EMCM (Sánchez-Hernández et al., 2015).

8.3. Estabilizadores da membrana celular dos mastócitos

Tal como a própria designação sugere, os EMCMs impedem a desgranulação dos mastócitos, levando ao bloqueio da cascata do ácido araquidónico (Cook, Stahl, Barney & Graziano, 2002; Owen et al., 2004; Sánchez-Hernández et al., 2015). A dose terapêutica mínima leva duas semanas até ser atingida, o que implica a administração ocular tópica repetida destes fármacos (Owen et al., 2004). Raramente são prescritos a animais, estando associados a corticosteróides se isso acontecer (Maggs, 2008d). A olopatadina, a lodoxamida e o cromoglicato de sódio são exemplos de EMCMs utilizados em animais e humanos (Maggs, 2008d; Sánchez-Hernández et al., 2011).

8.4. Anti-inflamatórios não esteróides

O mecanismo de ação dos AINEs compreende a inibição da via da ciclooxigenase, o que impossibilita a síntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidónico (Sánchez-Hernández et al., 2015). Dado o facto de serem aplicados topicamente sobre a superfície ocular, os seus efeitos sistémicos são minimizados, o que beneficia o paciente (Gelatt, 2014d). Reduzem o prurido e a hiperémia conjuntival (Swamy, Chilov, McClellan & Petsoglou, 2007) sem provocarem alterações a nível da barreira hemato-aquosa (Maggs, 2008d). Apesar de serem menos potentes que os corticosteróides, são por vezes preferidos em relação aos mesmos por não inibirem a cicatrização de feridas (Maggs, 2008d). A sua administração tópica está associada a uma sensação de ardor e irritação ocular que causa blefarospasmo, epífora e hiperémia conjuntival (Gelatt, 2014d). Também pode ocorrer aumento da PIO em cães e gatos, embora esta situação ainda não tenha sido detetada em humanos. Resulta de uma provável redução da drenagem do humor aquoso e incita a que haja um maior cuidado aquando da prescrição destes fármacos a indivíduos com hipertensão ocular (Gelatt, 2014d). Sendo possível o agravamento de infeções pré-existentes devido à sua administração ocular tópica, estão contraindicados na presença de queratite infecciosa (Gelatt, 2014d).

O diclofenac, o ketorolac e o flurbiprofeno são AINEs utilizados no âmbito da medicina veterinária e humana (Maggs, 2008d; Sánchez-Hernández et al., 2011).

8.5. Corticosteróides

Relativamente aos corticosteróides, importa referir a capacidade de bloquearem a via da ciclooxigenase e da lipoxigenase através da produção de inibidores da fosfolipase A₂ (Grahm & Wolfer, 2009). Para que isso aconteça, ligam-se a recetores específicos que existem na conjuntiva, córnea, esclera, íris, coróide e retina (Gelatt, 2014d). Considerando níveis fisiológicos, a sua ação no organismo manifesta-se de diversas formas: reduzem a quantidade de exsudado celular e fibrinoso produzido e a de mediadores inflamatórios libertados; inibem a desgranulação dos mastócitos, bem como a formação de colagénio e

fibroblastos; dificultam a regeneração e reparação do epitélio e do endotélio; diminuem a neovascularização e restauram a permeabilidade dos capilares na fase pós-inflamatória (Grahm & Wolfer, 2009).

A prescrição destes fármacos justifica-se na presença de doenças imunomediadas como a CA, não devendo ser usados como primeira escolha no seu tratamento. Pretende-se assim controlar a inflamação ocular que lhe está associada, que sendo do tipo crónico ou grave pode causar cegueira no paciente (Maggs, 2008d).

Parâmetros como a permeabilidade da córnea, o tipo de célula-alvo, a capacidade de ligação ao recetor correspondente e o grau de metabolização associado condicionam o sucesso terapêutico obtido através da administração de corticosteróides tópicos oculares (Gelatt, 2014d). Caso a sua eficácia fique aquém das expectativas, devemos optar pelo aumento da frequência em detrimento do aumento da dose administrada (Maggs, 2008d), já que os efeitos nocivos resultantes do seu uso abusivo são relevantes, nomeadamente: a intensificação da atividade da enzima colagenase presente na córnea, o que origina úlceras ou agrava as já existentes (Gelatt, 2014d); o desenvolvimento de infeções oculares através da redução da migração dos leucócitos e da fagocitose realizada pelos macrófagos (Gelatt, 2014d; Sánchez-Hernández et al., 2015); o aumento da PIO (Gelatt, 2014d; Sánchez-Hernández et al., 2015); o aparecimento de cataratas, embora esta desvantagem careça de estudo no âmbito da medicina veterinária (Gelatt, 2014d; Sánchez-Hernández et al., 2015); a manifestação clínica de queratopatia cálcica em banda e lipídica em animais e humanos, respetivamente (Gelatt, 2014d); e a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, tal como se verificou em cães (Gelatt, 2014d). Devem, portanto, ser usados por curtos espaços de tempo, convenientemente inferiores a 2 semanas (Leonardi et al., 2012; La Rosa et al., 2013).

A prednisolona, a dexametasona, a fluorometolona, a rimexolona e o loteprednol são exemplos de corticosteróides utilizados em animais e humanos (Sánchez-Hernández et al., 2011; Gelatt, 2014d). Os dois primeiros mencionados são administrados aquando de inflamação ocular grave (Mishra, Tamboli, Jwala & Mitra, 2011). Os restantes adequam-se a processos inflamatórios moderados (Mishra et al., 2011) e provocam um menor aumento da PIO, desconhecendo-se a sua eficácia em animais (Gelatt, 2014d). A via de administração é a ocular tópica (Gelatt, 2014d; Sánchez-Hernández et al., 2015).

No âmbito da medicina humana há que considerar ainda os corticosteróides nasais – que através da diminuição do reflexo naso-ocular vão melhorar o quadro clínico da rinoconjuntivite – e os antileucotrienos – que atuam sobre a sintomatologia nasal típica da mesma doença (Sánchez-Hernández et al., 2015).

8.6. Imunoterapia alérgico-específica

Recorre-se à ITAE, não só no tratamento da DAC, mas também no de diversas doenças do foro alérgico que afetam o Homem, incluindo a rinoconjuntivite e casos de CA ligeira (Malling, 1998; Griffin & Hillier, 2001; Durham et al., 2010; Leonardi et al., 2012;). A sua realização tem por objetivo uma maior tolerância do paciente em relação aos alérgenos para os quais está sensibilizado, sendo o único método disponível para o efeito (Griffin & Hillier, 2001; Bousquet et al., 2008; Calderon et al., 2012; Kovse, Zrimsek & Kotnik, 2012). Identificados aqueles que originam um quadro clínico mais grave, dever-se-á proceder à sua administração faseada e crescente até que a dose de manutenção seja atingida (Griffin & Hillier, 2001). De entre os vários protocolos disponíveis, existem uns mais rápidos, que se designam por ITAE *rush*, em que a dose previamente mencionada é administrada passadas algumas horas do seu início (Rico, 2014). Consequentemente, a probabilidade de ocorrência de efeitos secundários é maior e o sucesso terapêutico, verificando-se, surge precocemente (Rico, 2014).

Embora a eficácia deste procedimento não se possa prever (La Rosa et al., 2013), é possível, no entanto, avaliá-la: parâmetros como a regressão dos sinais clínicos, a reatividade cutânea e nasal, a redução na farmacoterapia instituída, bem como a qualidade de vida do indivíduo alérgico, são usados com essa finalidade em humanos (Rico, 2014). No âmbito da medicina veterinária, também os TPC deverão ser utilizados nesse sentido, de acordo com as conclusões obtidas a partir de um estudo de 2014 envolvendo cães atópicos com CA (Rico, 2014). Sabe-se que 50% a 100% dos casos de DAC tratados com recurso à ITAE são bem-sucedidos (Loewenstein & Mueller, 2009).

8.7. Imunossupressores

Por outro lado, os imunossupressores - como a ciclosporina A e o tacrolimus, ambos de origem fúngica - podem ser prescritos com o intuito de minimizar quadros clínicos graves do tipo de conjuntivite em causa (Martin, 2010e). A administração ocular tópica dos exemplos mencionados (Martin, 2010e) impede a ativação dos linfócitos T através da inibição da calcineurina, o que impossibilita a transcrição do gene da IL-2 (Gelatt, 2014d).

A ciclosporina A é sobretudo utilizada aquando de QCS por aumentar a produção de lágrima, estando também indicada na presença de doenças imunomediadas superficiais, tal como a CA (Martin, 2010d). O tacrolimus é cerca de 10 a 100 vezes mais potente que a ciclosporina A, sendo eficaz no tratamento de QCS e queratites superficiais (Gelatt, 2014d). Considera-se que a sua administração possa ser útil sempre que a utilização de ciclosporina A não seja suficientemente benéfica para o paciente (Gelatt, 2014d).

Apesar destes fármacos serem uma opção terapêutica normalmente segura, é proibida, tanto na Europa como nos E.U.A., a administração de inibidores da calcineurina para fins de tratamento de doenças do foro alérgico ocular humano (Leonardi et al., 2012). A exceção

existe para indivíduos que sejam acompanhados em centros de referência (Leonardi et al., 2012). A sua utilização em medicina veterinária está reservada para casos clínicos crónicos cuja recorrência implicaria a administração excessiva de corticosteróides.

8.8. Antibióticos

Havendo infeção bacteriana secundária concomitante, está indicada a utilização de antibióticos tópicos oculares, como por exemplo a tobramicina (Maggs, 2008b).

8.9. Anticorpos monoclonais

Um estudo realizado em 2008, no âmbito da medicina humana, testou a eficácia do omalizumab no controlo e regressão dos sinais clínicos de rinite alérgica decorrente do contacto com pólen de cedro, tendo sido apreciadas melhorias a nível nasal e ocular (Nagakura et al., 2008). O omalizumab consiste num anticorpo monoclonal humanizado que através da ligação à IgE, ao invés dos mastócitos, impede a desgranulação destes últimos e a subsequente ativação da cascata inflamatória (Sánchez-Hernández et al., 2015).

8.10. Tratamento de dermatite atópica canina

A existência concomitante de DA e CAc (Maggs, 2008b) justifica que seja mencionado, ainda que de forma breve, o tratamento instituído para a primeira doença citada. A abordagem terapêutica varia conforme se trate de um quadro clínico agudo ou grave e mediante a distribuição anatómica das lesões (Olivry et al., 2010). Neste contexto, perante reações agudas do foro alérgico, é aconselhada a realização de banhos com substâncias não irritantes e glucocorticóides tópicos, tentando sempre identificar a causa da sintomatologia que presenciamos (Olivry et al., 2010). Existindo cronicidade associada, está indicada a administração de glucocorticóides tópicos e orais, inibidores da calcineurina e a realização de ITAE (Olivry et al., 2010).

1. Objetivos

No âmbito da presente dissertação de mestrado foi realizado um estudo em que se quantificaram os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 na conjuntiva de 20 cães, 10 deles com sinais clínicos de CAc, pretendendo-se desta forma contribuir para a caracterização da resposta imunitária da referida doença.

2. Material e métodos

2.1. Amostra em estudo

Da amostra em estudo fizeram parte 20 cães (Anexo IV) que se apresentaram à consulta de medicina geral e/ou oftalmologia e/ou dermatologia do Hospital Escolar da FMV-UL, distribuídos por dois grupos: o grupo controlo, formado por 10 animais saudáveis; e o grupo experimental, denominado atópico, constituído por 10 pacientes com DA e CA associada. Relativamente à última doença citada, todos os cães que dela padeciam se encontravam num período de crise da mesma, pelo que o processo inflamatório em curso era do tipo agudo.

2.2. Seleção dos pacientes

Um dos critérios de inclusão comum a todos os animais que integraram o estudo em causa foi a autorização, por escrito, dos seus donos, relativamente à participação no mesmo (Anexo I).

Do grupo controlo apenas fizeram parte cães considerados saudáveis ao exame de estado geral e sem história de doenças do foro oftalmológico e dermatológico que invalidassem a sua participação na presente experiência.

O grupo atópico incluiu animais diagnosticados tanto com DA como com CA – no Hospital Escolar da FMV-UL ou noutras instituições semelhantes -, excluindo-se todos aqueles que: estivessem a ser tratados com anti-histamínicos nos últimos 14 dias e com ciclosporina A ou glucocorticóides, tanto do tipo oral como tópico, nas últimas 3 semanas; tivessem sido sujeitos a administração parentérica de glucocorticóides nas últimas 8 semanas; apresentassem desequilíbrios eletrolíticos, gravidez ou final de estro há menos de 3 semanas; tivessem terminado ou iniciado imunoterapia nos últimos 6 meses; apresentassem outras doenças oculares e/ou dermatológicas e tivessem sido previamente sujeitos a cirurgia do mesmo tipo.

2.3. Avaliação dermatológica

Todos os animais envolvidos no estudo foram submetidos a um exame dermatológico completo. Nesse sentido, procedeu-se à sua identificação e dos eventuais fatores de risco epidemiológico associados; à análise da respetiva história dermatológica e clínica geral; e ao registo da sintomatologia exibida, a par da resposta a terapêutica conhecida, numa ficha concebida para esse efeito (Anexo II).

Para fins de diagnóstico de DAC, procedeu-se inicialmente à análise da história e sinais clínicos de cada paciente constante do grupo experimental, bem como à exclusão de outras causas de prurido passíveis de ocasionar sintomatologia idêntica à observada. As mais comuns consistem na sarna sarcóptica, na dermatite alérgica à picada da pulga e nas infeções cutâneas primárias (Lourenço, 2010). Realizou-se ainda uma dieta de eliminação durante um período mínimo de 6 a 8 semanas – hidrolisada ou com uma nova fonte de proteína – que não melhorou o quadro clínico de qualquer um dos animais. Posteriormente utilizaram-se os critérios de diagnóstico de Favrot (Tabela 1), que confirmam a existência da doença em questão com uma sensibilidade de 85,4% e uma especificidade de 79,1% sempre que 5 dos mesmos se verificam (Olivry, 2010).

Tabela 1 – Critérios clínicos de diagnóstico de DAC segundo Favrot.

CRITÉRIOS de FAVROT
Surgimento dos primeiros sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
Cães que vivem maioritariamente dentro de casa
Prurido favoravelmente responsivo ao tratamento com glucocorticoides
Prurido não associado a lesões numa fase inicial
Patas anteriores atingidas
Pavilhões auriculares atingidos
Ausência de lesões nas margens dos pavilhões auriculares
Ausência de lesões na região lombossagrada

Finalmente, foram realizados TI como complemento do diagnóstico clínico da DAC.

O sistema de classificação CADESI-4 utilizou-se unicamente em relação aos pacientes atópicos, como forma de estimar a gravidade das lesões existentes. Deste modo, avaliaram-se 20 regiões anatómicas quanto à presença de eritema, liquenificação, escoriações e/ou alopecia. Subsequentemente atribuiu-se um valor entre 0 (ausente) e 3 (grave) relativo à gravidade com que cada um desses sinais clínicos se manifestava, recorrendo para isso a uma adaptação da tabela de classificação original utilizada (Anexo III). De acordo com o score total obtido, assim foi classificada a DAC: 0-10 ligeira, 11-35 moderada ou 36-60 grave (Olivry et al., 2014).

2.4. Avaliação oftalmológica

Todos os animais envolvidos no estudo foram submetidos a um exame oftálmico completo, a que se seguiu o registo dos resultados obtidos numa ficha concebida para esse efeito (Anexo II). O exame mencionado incluiu várias etapas, nomeada e ordenadamente:

- 1) Observação externa dos olhos, pálpebras e estruturas periorbitárias com recurso a uma fonte de luz focalizada;
- 2) Avaliação da resposta de ameaça e do reflexo palpebral, corneano, pupilar direto e consensual, de ambos os olhos;
- 3) Realização do TS (STT, Dina strips Schirmer-plus; Luneau SAS, Chartres, França) para fins de avaliação da produção lacrimal, sendo considerados normais os valores entre 15 mm/min e 25 mm/min (Gelatt & MacKay, 1998);
- 4) Medição tripla e consecutiva da PIO de cada olho (Icare TONOVET tonometer TV01; Icare Finland Oy; Vantaa, Finlândia), seguindo-se o cálculo da média dos valores obtidos e a sua validação mediante um coeficiente de variação de 5%. Pressões entre 15 mm Hg e 25 mm Hg foram consideradas normais (Gelatt & MacKay, 1998);
- 5) Biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa SL15, Tóquio, Japão), numa sala escura, que incluiu a identificação e subsequente avaliação quantitativa da gravidade dos sinais clínicos oculares de CAC (corrimento ocular, epífora, hiperémia conjuntival, prurido, quemose, queratite concomitante), através da atribuição de um valor entre 0 (ausente) e 3 (grave), unicamente em relação ao grupo atópico;
- 6) Fundoscopia com oftalmoscópio indireto (Heine ómega 500, Herrsching, Alemanha), numa sala escura, posteriormente à dilatação das pupilas com tropicamida (Tropicamida a 1%, Tropicil Top®; Edol, Linda-a-Velha, Portugal);
- 7) Realização de outros exames complementares, considerados relevantes conforme o caso clínico, para fins de exclusão de causas não-alérgicas capazes de desencadear a sintomatologia ocular observada. Exemplo: teste da fluoresceína (Fluoresceína; Haag-Streit International, Köniz, Suíça).

A soma dos valores registados para a gravidade dos sinais clínicos de CAC observados, permitiu a obtenção de um *score* para cada olho, cujo resultado podia variar entre 0 e 18.

De forma a tornar mais rigorosa a avaliação quantitativa do prurido ocular sentido, foi solicitado o testemunho dos donos relativamente ao comportamento exibido pelo paciente fora da consulta. Com esse objetivo, deram-se-lhes antes a conhecer as diferentes manifestações deste sinal clínico, entre elas a existência de blefarospasmo e as tentativas de esfregar ou coçar a região ocular e periorbitária.

2.5. Colheita de amostras

Colheu-se uma amostra de cada animal envolvido no estudo, o que totalizou 24 biópsias de conjuntiva canina (2x2 mm). Começou-se por administrar duas gotas de anestésico ocular tópico (0,4% cloridrato de oxibuprocaína, Anestocil®; Oftalder, Oeiras, Portugal) intervaladas de 5 min., a que se seguiu a escolha de uma região pouco vascularizada da conjuntiva palpebral inferior do olho manipulado neste contexto. Com o auxílio de uma pinça destacou-se a área selecionada, tendo-se recorrido a uma tesoura pequena de tenotomia para fins da sua seção. Terminada a colheita da amostra, procedeu-se à sua conservação individual segundo as instruções do fabricante - de forma a proteger o ácido ribonucleico (RNA) -, num microtubo contendo solução de estabilização RNAlater® (Qiagen), por um período mínimo de 24 horas e máximo de 3 dias, devidamente identificadas. Todas as biópsias de conjuntiva foram armazenadas num mesmo frigorífico a -80°C.

2.6. Processamento de amostras

2.6.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

O processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Imunologia e Virologia da FMV-UL. O RNA total foi extraído com o RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH; Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, a que se seguiu a digestão do ácido desoxirribonucleico (DNA) concomitante, utilizando para isso o RNase-free DNase Set (Promega; Wood Hollow road, Madison, E.U.A.). A concentração e pureza do RNA obtido para cada amostra foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop 1000, Thermo Scientific; E.U.A.) a 260 nm e 280 nm.

De seguida, procedeu-se à síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) através do Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemanha): após a adição de 1 µL de Oligo (dT)₁₈ primer ancorado (50µM; Roche), foram reversamente transcritas 250 ng de RNA total, diluídas numa quantidade de água esterilizada que perfizesse um volume total de 30 µL por amostra. Estas misturas foram aquecidas a 65°C durante 10 min. e imediatamente arrefecidas a 4°. Subsequentemente introduziu-se em cada um dos microtubos os seguintes reagentes e respetivas doses, pela ordem com que são mencionados: 4 µL 5x de Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (Roche), 0,5 µL de Protector RNase Inhibitor (40 U µL⁻¹; Roche), 2 µL de Deoxynucleotide Mix (10 mM; Roche) e 0,5 µL de Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U µL⁻¹; Roche). As misturas assim formadas foram inicialmente aquecidas a 55°C durante 30 min. e finalmente a 85°C durante 5 min. A concentração e pureza do cDNA de cada amostra foram determinadas espectrofotometricamente (NanoDrop 1000, Thermo Scientific; E.U.A.) a 260 nm e 280 nm. A sua pureza foi também avaliada através da realização de eletroforese em gel de agarose a 1%, com tampão Tris acetato contendo ácido etilenodiamino tetra-acético, em que se utilizou o brometo de etídio como corante.

Todas as amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até serem amplificadas por qRT-PCR.

2.6.2. Seleção dos primers

O gene *housekeeping* escolhido foi o da antizima da ornitina descarboxilase 1 (*Oaz1*) (Henriques et al., 2015), após comparação, por qRT-PCR, com outros 2 candidatos: o gene da beta-actina e o gene da beta-glucoronidase. Foram quantificados os níveis de expressão do mRNA de cada um deles, optando-se pelo que tinha valores de transcrição de mRNA mais próximos dos do gene da IL-10. O equipamento e placas de poços utilizadas, o esquema de amplificação, o conteúdo de cada reação de polimerização, bem como o método empregado na análise dos dados obtidos a partir do qRT-PCR realizado, coincidem com a descrição que surge no subcapítulo seguinte da presente dissertação de mestrado, relativamente aos mesmos.

Os primers que constam da Tabela 2 foram gentilmente cedidos pela Professora Doutora Luísa Mateus e utilizados para fins de quantificação do mRNA respeitante ao gene da IL-10.

Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados na quantificação, por qRT-PCR, dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 na conjuntiva ocular canina.

Gene	Sequência (5' → 3')
<i>IL-10</i>	D: ACATCAAGAACCACGTGAACTCC R: ACTCACTCATGGCTTTGTAGACACC
<i>Oaz1</i>	D: CAGGTGGGCGAGGGAATAG R: ATGTGTTTGGAGCCCGTGA

Legenda: D - Primer direto; R - Primer reverso.

2.6.3. qRT-PCR

Para fins de concretização do qRT-PCR realizado no âmbito da quantificação dos níveis de expressão de mRNA da IL-10 na conjuntiva ocular canina, recorreu-se ao equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e a placas de 96 poços para PCR quantitativo (Applied Biosystems; Warrington, Reino Unido). Cada reação de polimerização foi preparada em poços duplicados, com um volume final de 20 µL contendo 2 µL de primer reverso (100 nM), 2 µL de primer direto (100 nM), 4 µL de água esterilizada, 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 2 µL de cDNA. O esquema de amplificação consistiu numa fase inicial de desnaturação de 10 min. a 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificação (15 segundos a 95°C e *annealing* aos 60°C durante 1 min.). Os resultados obtidos relativamente à quantificação do mRNA foram analisados através do algoritmo Real-Time PCR Miner (Zhao & Fernald, 2005).

2.6.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados recolhidos foi efetuada através da utilização do programa Rcommander versão 3.2.1 (Core team, 2014). Primeiramente procedeu-se à sua análise descritiva para fins de caracterização da amostra, que incluiu o cálculo da média, do desvio-padrão, dos máximos e mínimos das variáveis e da sua frequência relativa e absoluta. Os valores referentes aos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 por grupo, ao *score* de CA e ao CADESI-4, são apresentados sob a forma de média±desvio-padrão.

Em seguida analisou-se a distribuição das variáveis em estudo com o teste de Shapiro-Wilk. A inexistência de normalidade associada, a par do facto de serem do tipo quantitativo e pertencerem a grupos independentes, determinou a realização do teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon em relação aos valores obtidos, por grupo, para os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10.

A associação entre os níveis de expressão previamente citados e os valores de CADESI-4 foi avaliada através do teste de correlação de Spearman, tendo-se procedido da mesma forma relativamente ao *score* de CA. Independentemente do teste escolhido, o intervalo de confiança foi sempre de 95%, pelo que apenas valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

Embora os resultados analisados digam respeito a uma amostra constituída por 20 animais, foi realizado um total de 24 biópsias de conjuntiva canina. A obtenção de curvas de amplificação do qRT-PCR inválidas para duas delas, ambas pertencentes ao grupo atópico, obrigou à sua exclusão para efeitos de participação neste estudo. De forma a tornar mais rigorosa e exequível, não só a análise estatística dos dados, como também as conclusões passíveis de serem retiradas a partir dos mesmos, decidimos reduzir o número de amostras de conjuntiva pertencente ao grupo controlo para 10. Consequentemente, um total de 20 cães distribuído de forma equitativa por dois grupos, um controlo e outro experimental, cada um deles com 10 animais, integrou o estudo em causa (Anexo IV).

40% (4/10) dos indivíduos constantes no grupo controlo eram machos, enquanto 60% (6/10) eram fêmeas. A idade média calculada foi de $8,2 \pm 4,2$ anos, havendo apenas dois animais com idade inferior a 3 anos (20%). Relativamente à distribuição das raças, há que assinalar a existência de 4 distintas, correspondentes a 5 dos 10 animais deste grupo (50%). Desses 5, 4 eram de raça pura – 2 Labradores retriever, 1 Pequinês e 1 Barbado da Terceira - e 1 de raça cruzada – cruzado de Boxer. Todos os outros cães (50%) tinham raça indeterminada, a qual prevaleceu neste caso.

Também no grupo atópico havia 40% (4/10) machos e 60% (6/10) fêmeas. A média de idades calculada foi de $4,4 \pm 3,4$ anos, sendo que 5 dos 10 animais estudados tinham idade

inferior ou igual a 3 anos (50%). Identificaram-se 6 raças distintas correspondentes a 9 dos 10 animais considerados (90%), todos eles de raça pura. De entre elas prevaleceu a Weimaraner e a Labrador retriever, representadas por 3 (30%) e 2 (20%) dos 10 animais do grupo, respetivamente. 1 exemplar (10%) de cada uma das raças mencionadas em seguida constava também desta amostra: Bulldog inglês, Shih tzu, Fox terrier e Boxer. Apenas um dos cães (10%) era de raça indeterminada

3.2. Avaliação oftalmológica

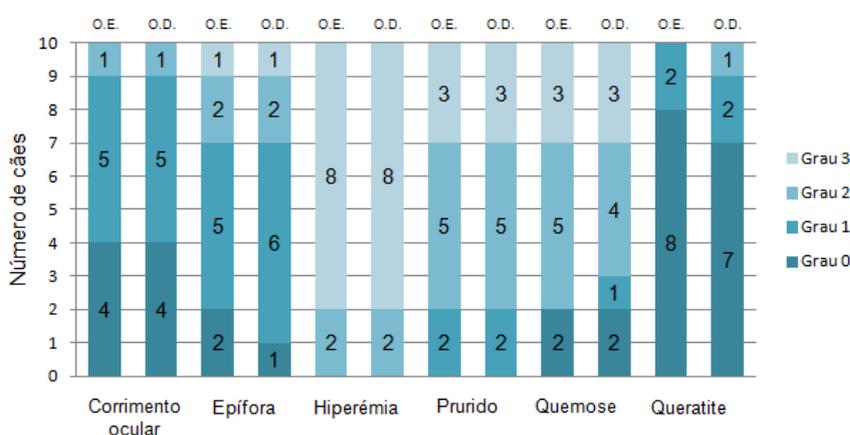
O exame oftálmico completo a que todos os animais estudados foram submetidos não revelou existir sintomatologia clínica capaz de invalidar a sua participação no presente estudo. Os dados assim recolhidos constam do Anexo V.

Numa sala escura, recorrendo ao biomicroscópio com lâmpada de fenda, avaliou-se quantitativamente a gravidade dos sinais clínicos de CAC apresentados pelos 10 pacientes do grupo atópico. Desta etapa do exame oftalmológico resultou um *score* total relativo à doença mencionada (Anexo VI), cujo valor da média±desvio-padrão referente ao olho esquerdo, direito e média dos dois olhos foi o seguinte, respetivamente: 8,9±2,13; 9,1±2,51; 9,0±2,30.

Todos os animais (10/10) avaliados desta forma apresentavam hiperémia conjuntival e prurido ocular. À prevalência de 100% associada a ambos, segue-se, por ordem decrescente, a dos restantes sinais clínicos quantificados: epífora 90%, quemose 80%, corrimento ocular 60% e queratite concomitante 30%. Apenas 3 em 10 animais exibiam um quadro clínico assimétrico, não se tendo verificado a existência de sintomatologia alérgica ocular do tipo unilateral.

O Gráfico 1 elucida-nos acerca do número absoluto de pacientes em que foi detetada a presença de cada um dos sinais clínicos mencionados e da gravidade com que os mesmos se manifestaram mediante o olho considerado.

Gráfico 1 - Distribuição e gravidade dos sinais clínicos de CAC mediante o olho avaliado.

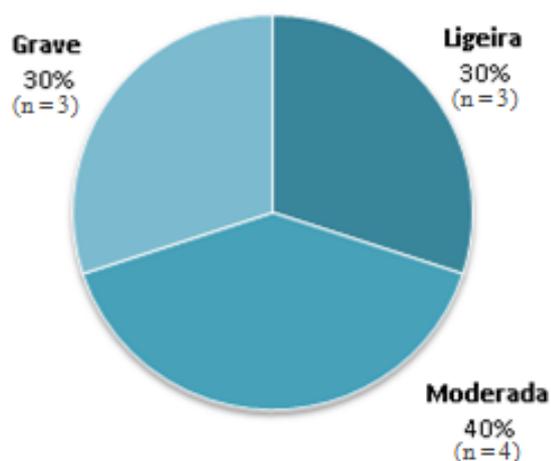


Legenda: O.E. – Olho esquerdo; O.D. – Olho direito.

3.3. Avaliação dermatológica

Tal como já mencionado, utilizou-se o sistema de classificação CADESI-4 unicamente em relação ao grupo experimental, do qual faziam parte os pacientes de DA pertencentes ao conjunto de animais estudados. O valor da média±desvio-padrão para este parâmetro foi de 22,1±15,72. Mediante o *score* total obtido desta forma (Anexo VII), a doença em causa foi classificada como ligeira, moderada ou grave (Olivry et al., 2014), sendo possível visualizar a distribuição percentual deste aspeto no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Distribuição percentual da classificação da gravidade da DA de acordo com o *score* total obtido através do sistema de classificação CADESI-4.



3.4. Níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10

Os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 foram determinados para cada um dos animais pertencentes ao grupo controlo e ao grupo atópico (Anexo VIII), sendo que a sua distribuição consta do Gráfico 3 e da Tabela 3. O valor da média±desvio-padrão é de 0,004±0,0024 e 0,005±0,0029, respetivamente.

Em seguida, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon para perceber se havia diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos relativamente ao parâmetro em análise, o que se verificou não existir ($p=0,53$).

Gráfico 3 - Distribuição dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 por grupo.

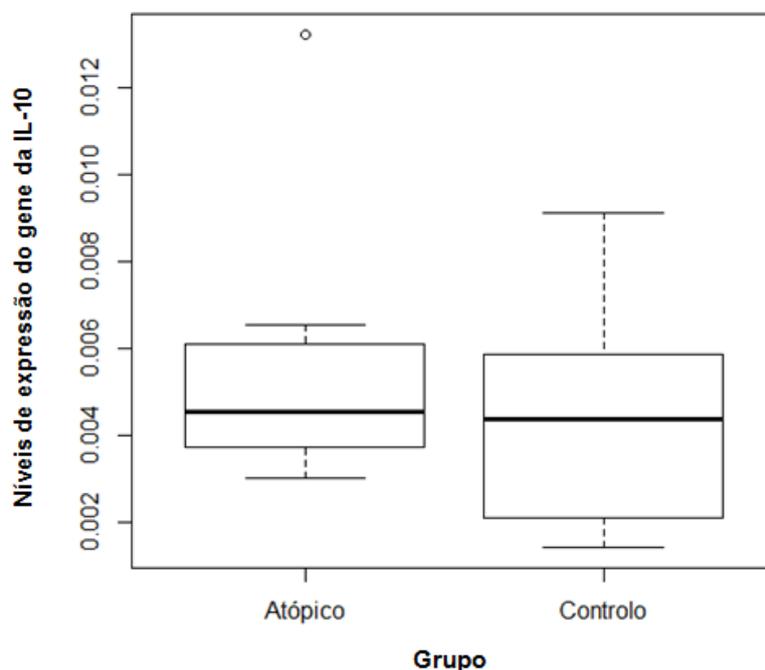


Tabela 3 - Distribuição dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 por grupo.

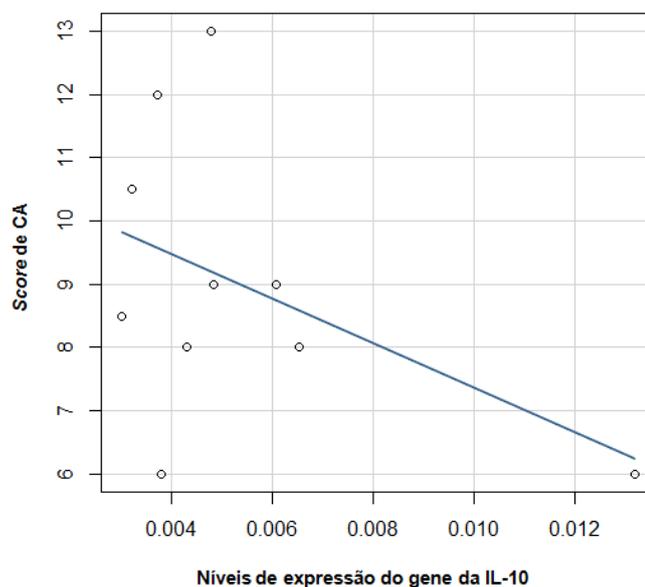
	Grupo atópico	Grupo controlo
Mínimo	0,0030	0,0014
Percentil 25%	0,0037	0,0025
Mediana	0,0045	0,0044
Percentil 75%	0,0058	0,0056
Máximo	0,0132	0,0090

3.5. Coeficiente de correlação entre variáveis

3.5.1. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o score de CA

Relativamente ao grupo atópico, foi estudado o grau de associação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o valor obtido para a média do score de CA de ambos os olhos (Gráfico 4). Nesse sentido, realizou-se o teste de correlação de Spearman que nos permitiu verificar a existência de um coeficiente de correlação negativo entre os parâmetros analisados (coeficiente de correlação de Spearman (r_s)=-0,33), o qual era estatisticamente não significativo ($p=0,35$).

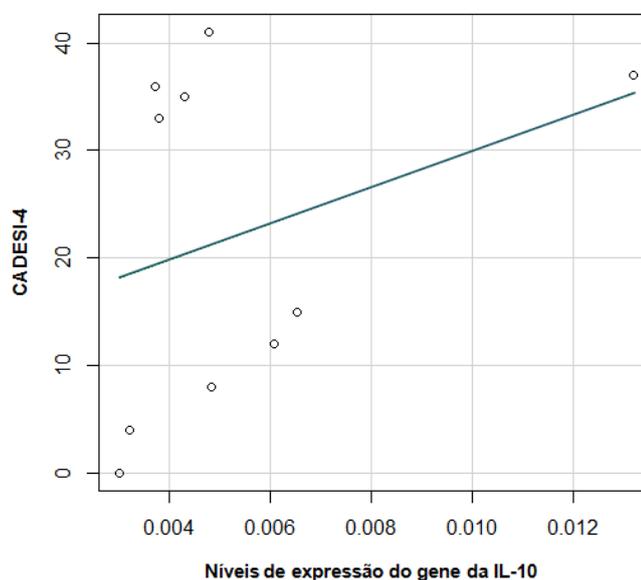
Gráfico 4 – Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o score de CA do grupo atópico.



3.5.2. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4.

O grau de associação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4 obtidos para o grupo atópico foi estudado através da realização do teste de correlação de Spearman (Gráfico 5). Verificou-se existir um coeficiente de correlação positivo entre os parâmetros citados ($r_s=0,41$), ainda que estatisticamente não significativo ($p=0,25$).

Gráfico 5 – Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4 do grupo atópico.



4. Discussão

4.1. Caracterização da amostra

Como já mencionado, o estudo em causa envolveu a participação de dois grupos de 10 cães para fins da sua realização. O género, a idade e a raça de cada um deles foram registados (Anexo IV) e analisados estatisticamente.

Apesar da bibliografia existente a respeito da CAc ser escassa (Lourenço et al., 2011), a sua manifestação, frequentemente associada à de DA, leva a crer que haja uma forte associação entre as duas doenças (Wittich, 1941). A prevalência exata desta situação ainda está por determinar, correspondendo a 50% o maior valor até hoje obtido (Scott, 1981; Willemse, 1984). Fatores como a especialidade clínica do médico veterinário ou a gravidade das lesões cutâneas, parecem justificar as dificuldades inerentes ao seu cálculo realista (Lourenço et al., 2011). Dada a associação referida e pelo facto do grupo experimental ser unicamente formado por animais atópicos, faz sentido comentar as características da amostra recorrendo ao padrão de manifestação clínica próprio da DA.

As opiniões variam no que respeita à predisposição sexual para o desenvolvimento de DA em cães: há autores que acreditam numa maior tendência para o seu surgimento em fêmeas, outros em machos e outros ainda que afirmam não existir qualquer influência do género do animal sobre o aparecimento desta doença do foro alérgico (Griffin & DeBoer, 2001; Favrot et al., 2010). De facto, a maioria dos cães atópicos que integraram o presente estudo eram fêmeas (60%), o que corroboraria uma possível predisposição deste género para apresentar DA, não fosse a amostra ser tão pequena (n=10). Curiosamente obteve-se a mesma percentagem de fêmeas para o grupo controlo.

Relativamente à idade, constatou-se que os animais pertencentes ao grupo atópico eram, na sua maioria, mais jovens que os do grupo controlo. No entanto, mais importante que a idade do animal no momento da consulta é a idade correspondente ao início dos sinais clínicos de atopia canina.

Consultando a ficha clínica dos animais do grupo experimental, foi possível constatar, nos casos em que esta informação estava disponível, a data aproximada respeitante ao início dos sintomas de DA. Verificou-se que a maioria os manifestou pela primeira vez com menos de 1 ano, idade consensual relativamente ao que está descrito na bibliografia (Favrot et al., 2010). Além desta, também a idade associada ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos de CAc foi investigada: embora não exista informação a este nível quanto a metade dos animais examinados, sabe-se que ela coincidia com a do surgimento do quadro clínico de DA em relação aos restantes pacientes. Tratando-se de dados cuja obtenção depende da atenção e memória dos donos, é importante a sua colaboração e empenho para que o diagnóstico e acompanhamento desta e outras doenças sejam conseguidos mais eficazmente.

A existência de DA não é requisito obrigatório para que se padeça de CAC, sendo que qualquer raça está sujeita ao seu desenvolvimento (Maggs, 2008b). Novamente, pelo facto do grupo experimental apenas incluir animais atópicos, este tipo de conjuntivite deverá ser encarado como uma manifestação clínica local da primeira doença citada.

Apesar de certas limitações, como são uma deficiente análise estatística ou uma amostra não representativa da população analisada (Lourenço, 2010), alguns estudos comprovaram a existência de predisposição rásica associada à DAC (Griffin & DeBoer, 2001; Sousa & Marsella, 2001), havendo raças identificadas como particularmente propensas ao desenvolvimento desta doença sem que essa característica dependa da localização geográfica considerada (Lourenço, 2010). Quanto ao grupo atópico, a raça Boxer (n=1) e a Bulldog (n=1) enquadram-se nesta situação (Lourenço, 2010), acontecendo o mesmo relativamente a um cruzado de Boxer (n=1) do grupo controlo. Por seu lado, a raça Labrador retriever é a única, de entre as que constituem a amostra em estudo, que apresenta predisposição para DA mediante a região em causa (Lourenço, 2010). Um e dois exemplares da mesma fazem parte do grupo atópico e controlo, respetivamente. Finalmente, e de acordo com a bibliografia consultada, 3 dos animais pertencentes ao grupo controlo apresentavam um maior risco relativo de dermatite atópica, à semelhança de 5 dos 10 cães constantes do grupo experimental (Griffin & DeBoer, 2001; Lourenço, 2010). As raças que justificam as presentes afirmações quanto ao grupo anteriormente citado correspondiam à Labrador Retriever (n=2), Bulldog inglês (n=1), Fox Terrier (n=1) e Boxer (n=1). No caso do grupo controlo consistiam na Labrador Retriever (n=2) e num cruzado de Boxer (n=1).

4.2. Avaliação oftalmológica

O *score* de CAC foi determinado unicamente para o grupo atópico, já que os restantes animais da população estudada eram saudáveis e não apresentavam esta doença. Os resultados obtidos quanto à sua média±desvio-padrão foram de 8,9±2,13 para o olho esquerdo e 9,1±2,51 para o olho direito. Estes números revelam a manifestação maioritária de um quadro clínico idêntico em ambos os olhos e assimétrico unicamente em relação a 3 dos 10 animais estudados. Em todos os casos (n=10) a sintomatologia alérgica ocular exibida foi do tipo bilateral. Tanto a simetria como a lateralidade dos sinais clínicos característicos dos pacientes avaliados desta forma estão em conformidade com a bibliografia existente a esse respeito (Bielory, 2000b).

Apesar deste método de avaliação quantitativa da CAC ser uma ferramenta útil no seu diagnóstico, a classificação da doença mediante a sua gravidade a partir do *score* calculado ainda não é uma realidade, nem para a medicina veterinária, nem para a medicina humana. Relativamente à última área citada, importa mencionar a existência de um sistema de classificação recentemente criado: baseia-se na interferência deste tipo de conjuntivite sobre

a acuidade visual do paciente e diferentes atividades cotidianas como ler e praticar exercício físico (Sánchez-Hernández et al., 2015). Cada um dos parâmetros analisados neste contexto exige da parte do indivíduo examinado uma resposta que varia entre “sim” e “não”. Os resultados que daí advêm conduzem à classificação da CAh enquanto ligeira, moderada ou grave (Sánchez-Hernández et al., 2015). De qualquer forma, os valores relativos ao *score* de CAc serão abordados mais à frente a propósito da sua correlação com os de CADESI-4 e com os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10.

São 3 os sinais clínicos oculares cuja manifestação concomitante permite diagnosticar quase definitivamente CA em cães. A hiperémia conjuntival, o prurido ocular e a quemose formam, nesta ordem, a tríade em causa (Friedlaender, 2011). Não havendo prurido, então a conjuntivite é de outro tipo que não o alérgico e deverá ser investigada nesse sentido (Bielory & Friedlaender, 2008). Todos os animais do grupo atópico (10/10) apresentavam hiperémia conjuntival e prurido ocular, sendo que 80% deles também tinha quemose. Isto significa que para 8 dos 10 cães alérgicos avaliados, a existência de CA era praticamente certa obedecendo ao que anteriormente foi escrito. A ação da histamina é decisiva para que se verifiquem os três sinais clínicos mencionados. Isto acontece precocemente aquando da inflamação aguda da conjuntiva (Mortemousque et al., 2006; Morales, Duran, Delgado & Hernández, 2008), situação que se constatou estar associada a cada um dos animais deste grupo no momento da sua avaliação oftalmológica. Daí que as elevadas percentagens respeitantes aos sinais previamente abordados sejam de certa forma previsíveis.

Nem sempre há produção de corrimento ocular aquando de CAc, situação característica de formas ligeiras da doença. Existindo, é do tipo seroso na fase aguda da inflamação (Carmichael, 2010) e mucoso em casos considerados graves (Martin, 2010b). 6 dos 10 animais avaliados exibiam este sinal clínico, contrastando com os restantes 4, cuja sintomatologia seria, muito provavelmente, de menor gravidade.

Finalmente, vamos abordar a queratite concomitante. Raramente se verifica (Lourenço et al., 2011), tendo ocorrido unicamente em relação a 30% dos pacientes. Relembrando as várias percentagens obtidas, é possível constatar ser esta a menor de todas elas, o que coincide com o que foi referido a propósito da reduzida frequência com que este sinal clínico se manifesta.

4.3. Avaliação dermatológica

Também o sistema de classificação CADESI-4 foi utilizado apenas no grupo experimental, visto que os restantes animais da população estudada eram saudáveis e não padeciam de DAc. O valor da média±desvio-padrão para este parâmetro foi de 22,1±15,72, o que segundo a bibliografia consultada corresponde a uma forma moderada da doença (Olivry et al., 2014). O valor percentual calculado relativamente à frequência relativa de casos ligeiros e graves de DA exibidos pelos cães avaliados desta forma foi 30%.

Os resultados referentes ao CADESI-4 voltarão a ser abordados a propósito do seu coeficiente de correlação com os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10.

4.4. Níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10

Os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 relativos às biópsias de conjuntiva canina efetuadas (Anexo VIII) foram calculados por qRT-PCR, tendo-se obtido um valor de média±desvio-padrão equivalente a $0,004\pm 0,0024$ no grupo controlo e a $0,005\pm 0,0029$ no grupo atópico. Estes resultados permitem verificar que os níveis de expressão estudados foram superiores no caso do grupo atópico, embora as diferenças que lhes estão associadas não sejam estatisticamente significativas, pois o valor de p corresponde a 0,53.

Em amostras celulares saudáveis, de que são exemplo os fragmentos de conjuntiva canina recolhidos a partir dos animais constantes do grupo controlo, a citocina investigada é produzida em reduzidas quantidades (Li et al., 2012) como forma de controlar a progressão de eventuais processos alérgicos e/ou inflamatórios que tenham início (Speiran et al., 2009; Li et al., 2012). Por outro lado, importa lembrar que os linfócitos Th2 são um dos principais produtores de IL-10 no contexto das reações de hipersensibilidade do tipo I, características da sequência de eventos imunitários próprios da CAc (Day, 2008b; Bonini et al., 2009; Ghasemi et al., 2012). Nesse sentido, as expectativas corresponderam à realidade aquando da obtenção de um valor de média superior quanto aos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 por parte dos animais pertencentes ao grupo atópico. No entanto, esses mesmos valores não só são próximos dos obtidos pelo grupo controlo, à semelhança dos calculados para o desvio-padrão, como a diferença existente entre eles não é estatisticamente significativa. Uma possível justificação para esta situação tem a ver com a dimensão da amostra de ambos os grupos ($n=10$). Simultaneamente e pelo mesmo motivo, a influência individual de cada nível de expressão de mRNA do gene da IL-10 determinado tem um maior impacto sobre os valores de média e desvio-padrão calculados, o que torna a existência de *outliers* particularmente relevante nestas circunstâncias.

De acordo com a pesquisa efetuada, tanto em animais como em humanos, ainda está por definir a forma como o gene estudado se expressa em tecidos celulares saudáveis comparativamente aos que se encontram associados a processos inflamatórios e/ou alérgicos. Por esse motivo, seria interessante e importante a realização de estudos nesse sentido envolvendo amostras de animais constituídas por um maior número de indivíduos e também de citocinas.

4.5. Coeficiente de correlação entre variáveis

4.5.1. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e o score de CA

De acordo com os resultados obtidos através do teste de correlação de Spearman, foi possível constatar que não existe qualquer associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e a média do score de CA de ambos os olhos dos animais atópicos, pelo que os valores obtidos para um e outro parâmetro não estão relacionados.

Há uma tríade de sinais clínicos cuja manifestação permite, de forma quase definitiva, diagnosticar CAC. Ela é formada pela hiperémia conjuntival, pela quemose e pelo prurido ocular (Friedlaender, 2011), cuja ausência implica que a doença em causa seja de outro tipo que não o alérgico (Bielory & Friedlaender, 2008). De entre os 10 animais constantes do grupo atópico, 8 apresentavam a tríade referida, o que significa que em relação a 80% dos mesmos, o diagnóstico dificilmente estaria errado.

A CA, enquanto doença do foro inflamatório e alérgico ocular que é, implica uma maior produção de IL-10 graças à existência de um número superior de linfócitos Th2 circulantes (Day, 2008b; Bonini et al., 2009; Ghasemi et al., 2012). Esta particularidade leva a crer que os níveis de expressão de mRNA da citocina mencionada e os valores correspondentes ao score de CA estejam correlacionados, conclusões que não podem ser retiradas a partir dos resultados obtidos. A reduzida dimensão da amostra e a conseqüente sobrevalorização dos *outliers* nestas circunstâncias são exemplos de motivos pelos quais os parâmetros estudados não estão associados de forma estatisticamente significativa. A presença concomitante de outras doenças oftálmicas ou até mesmo sistémicas com uma sintomatologia clínica idêntica à da CA poderia justificar os resultados obtidos, caso a ausência das mesmas não fizesse parte do conjunto de critérios de exclusão utilizados. De acordo com a pesquisa efetuada não existem referências bibliográficas de estudos que contemplem a correlação em causa, tanto no âmbito da medicina veterinária como também no da humana, pelo que seria interessante a sua realização com uma amostra de animais quantitativamente superior à utilizada neste estudo.

4.5.2. Coeficiente de correlação entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4

Os resultados obtidos através do teste de correlação de Spearman revelaram que os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e os valores de CADESI-4 estão associados de forma estatisticamente não significativa.

Por um lado, enquanto sistema de avaliação quantitativa dos sinais clínicos de DA em cães, o CADESI-4 possibilita a classificação desta doença em “ligeira”, “moderada” ou “grave”, conforme a gravidade das lesões existentes (Olivry et al., 2014). Por outro, a DAC, à

semelhança da CAc, pertence ao conjunto de doenças cujas reações são de hipersensibilidade do tipo I, o que significa que neste caso também se verifica um aumento do número de linfócitos Th2 circulantes e da síntese de IL-10, ambos importantes relativamente à exuberância da sintomatologia manifestada (Day, 2008b). Nesse sentido, o coeficiente de correlação positivo existente entre os dois parâmetros analisados coincide com a bibliografia consultada a este respeito, ainda que os resultados em causa não possam ser comparados. Isto porque até à data e segundo se apurou, não existem estudos dedicados à mesma questão.

A reduzida dimensão da amostra é uma causa provável para que as diferenças existentes não sejam estatisticamente significativas, pelo que mais uma vez seria interessante a repetição desta experiência – e/ou outras mais abrangentes – com uma maior amostra de animais.

5. Conclusão

O estudo realizado no âmbito da presente dissertação de mestrado subordinada ao tema “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina” teve como principal objetivo contribuir para a caracterização da resposta imunitária da doença citada.

Depois de serem analisados estatisticamente, os resultados obtidos foram interpretados, deles se retirando as conclusões a seguir enunciadas. Por um lado, constatou-se que os animais pertencentes ao grupo atópico apresentaram maiores níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 em relação aos do grupo controlo. O facto dos valores em causa serem próximos poderá estar relacionado com a reduzida dimensão da amostra utilizada. Por outro, estabeleceram-se dois coeficientes de correlação que abrangem os parâmetros analisados. O primeiro, negativo, verificou-se entre os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-10 e a média do *score* de CA de ambos os olhos. O segundo, positivo, entre os mesmos níveis de expressão e os valores de CADESI-4 registados. Em ambos os casos as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas. Deste modo constatou-se que a quantidade de IL-10 produzida está aparentemente associada à gravidade das lesões de DA mas não de CAC, pelo que a quantificação dos seus níveis de expressão na conjuntiva poderá ser utilizada unicamente em relação ao estudo da fisiopatologia e tratamento de atopia em cães.

As conclusões a que a experiência em questão permitiu chegar requerem a realização de estudos similares - ou mais abrangentes - para que sejam validadas, graças à reduzida dimensão da amostra utilizada. Esta necessidade é reforçada pela inexistência de bibliografia capaz de as confirmar, razão pela qual não foi possível comparar os resultados obtidos e abordar de forma mais pormenorizada a temática da CAC. Para que os estudos vindouros sejam bem-sucedidos, há um conjunto de condições relevantes que deverão estar reunidas. Entre elas, a cooperação de donos atentos, informados e sensibilizados para esta doença, a definição de critérios que visem o seu diagnóstico e a comunicação eficaz entre oftalmologistas e dermatologistas são particularmente importantes. Nessas circunstâncias, é quase certo o diagnóstico atempado da doença e uma maior eficácia do protocolo terapêutico instituído.

- Abelson, M.B., McLaughlin, J.T. & Gomes, P.J. (2011). Antihistamines in ocular allergy: are they all created equal?. *Current Allergy and Asthma Reports*, 11, 205-211.
- Antunes, J., Borrego, L., Romeira, A. & Pinto, P. (2009). Skin prick tests and allergy diagnosis. *Allergologia et Immunopathologia*, 37(3), 155-164.
- Aroch, I., Ofri, R. & Sutton, G.A. (2008). Ocular manifestations of systemic diseases. In D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, (4th ed.). (pp. 374-418). Missouri: Saunders Elsevier.
- Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy (ASCIA) (2009). *Skin prick testing for the diagnosis of allergic disease: a manual for practitioners*. Acedido em Jul. 09, 2015 em: <http://www.allergy.org.au/health-professionals/papers/skin-prick-testing>
- Bacon, A.S., Ahluwalia, P., Irani, A.M., Schwartz, L.B., Holgate, S.T., Church, M.K. & McGill, J.I. (2000). Tear and conjunctival changes during the allergen-induced early and late phase responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(5), 948-954.
- Bailey, D.P., Kashyap, M., Bouton, L.A., Murray, P.J. & Ryan, J.J. (2006). Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3), 581-589.
- Baines, M.G., Cai, F. & Backman, H.A. (1991). Ocular hypersensitivity to thimerosal in rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(8), 2259-2265.
- Becquet, F., Goldschild, M., Moldovan, M.S., Ettaiche, M., Gastaud, P. & Baudouin, C. (1998). Histopathological effects of topic ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. *Current Eye Research*, 17(4), 419-425.
- Benjamin, D., Knoblock, T.J. & Dayton, M.A. (1992). Human B cell interleukin-10 cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood*, 80(5), 1289-1298.
- Bernstein, I.L., Li, J.T., Bernstein, D.I., Hamilton, R., Spector, S.L., Tan, R., Sicherer, S., Golden, D.B., Khan, D.A., Nicklas, R.A., Portnoy, J.M., Blessing-Moore, J., Cox, L., Lang, D.M., Oppenheimer, J., Randolph, C.C., Schuller, D.E., Tilles, S.A., Wallace, D.V., Levetin, E., Weber, R., American Academy of Allergy, Asthma and Immunology & American College of Allergy, Asthma and Immunology (2008). Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 100(3 Suppl 3), S1-148.
- Bertel, F., Mortemousque, B., Sicard, H. & André, C. (2001). Conjunctival provocation test with *Dermatophagoides pteronyssinus* in the diagnosis of allergic conjunctivitis from house mites. *Journal Français d'Ophthalmologie*, 24(6), 581-589.
- Bertelsen, R.J., Carlsen, K.C., Carlsen, K.H., Granum, B., Doekes, G., Haland, G., Mowinkel, P. & Lovik, M. (2010). Childhood asthma and early life exposure to indoor allergens, endotoxin and beta(1, 3)-glucans. *Clinical Experimental Immunology*, 40(2), 307-316.
- Bielory, L. (2000a). Allergic and immunologic disorders of the eye. Part I: immunology of the eye. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(5), 805-816.

- Bielory, L. (2000b). Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(5), 1019-1032.
- Bielory, L. (2011). Ocular allergy. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 78(5), 740-758.
- Bielory, L. (2012). Allergic conjunctivitis: the evolution of therapeutic options. *Allergy & Asthma Proceedings*, 33, 129-139.
- Bielory, L. & Friedlaender, M.H. (2008). Allergic conjunctivitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 28(1), 43-58.
- Bilkhu, P.S., Wolffsohn, J.S. & Naroo, S.A. (2012). A review of non-pharmacological and pharmacological management of seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Contact Lens & Anterior Eye*, 35, 9-16.
- Bizikova, P., Pucheu-Haston, C., Eisenschenk, M., Marsella, R., Nuttall, T. & Santoro, D. (2015). Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2), 95-e26.
- Bjerkås, E., Ekesten, B., Narfström, K. & Grahn, B. (2009). Visual impairment. In R.L. Peiffer Jr & S.M. Petersen-Jones (Eds.), *Small animal ophthalmology: a problemoriented approach*. (4th ed.). (pp. 116-202). London: Elsevier Limited.
- Bonini, S. (2006). Allergic conjunctivitis: the forgotten disease. *Chemical Immunology and Allergy*, 91, 110-120.
- Bonini, S. (2010). *Allergic conjunctivitis*. 1st International Congress of Southern European Allergy Societies, Firenze (Italy).
- Bonini, S., Bonini, S., Bucci, M.G., Berruto, A., Adriani, E., Balsano, F. & Allansmith, M.R. (1990). Allergen dose response and late symptoms in a human model of ocular allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(6), 869-876.
- Bonini, S., Sgrulletta, R., Coassin, M. & Bonini, S. (2009). Allergic conjunctivitis: update on its pathophysiology and perspectives for future treatment. In R. Pawankar, S.T. Holgate & L.J. Rosenwasser (Eds.), *Allergy frontiers: clinical manifestations*. (Volume 3). (pp. 25-48). New York: Springer.
- Bourgès-Abella, N., Raymond-Letron, I., Diquelou, A., Guillot, E., Regnier, A. & Trumel, C. (2007). Comparison of cytologic and histologic evaluations of conjunctiva in normal equine eye. *Veterinary Ophthalmology*, 10(1), 12-18.
- Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N.G., Bousquet, P.J., Burney, P.G., Canonica, G.W., Haahtela, T., Lodrup Carlsen, K.C., Price, D., Samolinski, B., Simons, F.E., Wickman, M., Annesi-Maesano, I., Baena-Cagnani, C.E., Bergmann, K.C., Bindslev-Jensen, C., Casale, T.B., Chiriac, A., Cruz, A.A., Dubakiene, R., Durham, S.R., Fokkens, W.J., Gerth-van-Wijk, R., Kalayci, O., Kowalski, M.L., Mari, A., Mullol, J., Nazamova-Baranova, L., O'Hehir, R.E., Ohta, K., Panzner, P., Passalacqua, G., Ring, J., Rogala, B., Romano, A., Ryan, D., Schmid-Grendelmeier, P., Todo-Bom, A., Valenta, R., Woehrl, S., Yusuf, O.M., Zuberbier, T., Demoly, P., Global Allergy and Asthma European Network & Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (2012). Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 67(1), 18-24.
- Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A.A., Denburg, J., Fokkens, W.J., Togias, A., Zuberbier, T., Baena-Cagnani, C.E., Canonica, G.W., van Weel, C., Agache, I., Ait-Khaled, N., Bachert, C., Blaiss, M.S., Bonini, S., Boulet, L.P., Bousquet P.J., Camargos, P.,

Carlsen, K.H., Chen, Y., Custovic, A., Dahl, R., Demoly, P., Douaqui, H., Durham, S.R., van Wijk, R.G., Kalayci, O., Kaliner, M.A., Kim, Y.Y., Kowalski, M.L., Kuna, P., Le, L.T., Lemiere, C., Lockey, R.F., Mavale-Manuel, S., Meltzer, E.O., Mohammad, Y., Mullol, J., Naclerio, R., O'Hehir, R.E., Ohta, K., Ouedraogo, S., Palkonen, S., Papadopoulos, N., Passalacqua, G., Pawankar, R., Popov, T.A., Rabe, K.F., Rosado-Pinto, J., Scadding, G.K., Simons, F.E., Toskala, E., Valovirta, E., van Cauwenberge, P., Wang, D.Y., Wickman, M., Yawn, B.P., Yorgancioglu, A., Yusuf, O.M., Zar, H., Annesi-Maesano, I., Bateman, E.D., Ben Kheder, A., Boakye, D.A., Bouchard, J., Burney, P., Busse, W.W., Chan-Yeung, M., Chavannes, N.H., Chuchalin, A., Dolen, W.K., Emuzyte, R., Grouse, L., Humbert, M., Jackson, C., Johnston, S.L., Keith, P.K., Kemp, J.P., Klossek, J.M., Larenas-Linnemann, D., Lipworth, B., Malo, J.L., Marshall, G.D., Naspitz, C., Nekam, K., Niggemann, B., Nizankowska-Mogilnicka, E., Okamoto, Y., Orru, M.P., Potter, P., Price, D., Stoloff, S.W., Vandenplas, O., Williams, D., World Health Organization, Global Allergy and Asthma European Network & AllerGen (2008). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update. *Allergy*, 63(86), 8-160.

Bundoc, V.G. & Keane-Myers, A. (2007). IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Experimental Eye Research*, 85(4), 575-579.

Caballero-Martínez, F. (2006). Características generales de la muestra: descripción sociodemográfica y sanitaria de la población de estudio. In Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica & Schering-Plough (Eds.), *Alérgica 2005: Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de la enfermedades alérgicas en España en 2005*. (pp. 71-106). Madrid: Luzán.

Calderon, M.A., Demoly, P., Gerth van Wijk, R., Bousquet, J., Sheikh, A., Frew, A., Scadding, G., Bachert, C., Malling, H.J., Valenta, R., Bilo, B., Nieto, A., Akdis, C., Just, J., Vidal, C., Varga, E.M., Alvarez-Cuesta, E., Bohle, B., Bufe, A., Canonica, W.G., Cardona, V., Dahl, R., Didier, A., Durham, S.R., Eng, P., Fernandez-Rivas, M., Jacobsen, L., Jutel, M., Kleine-Tebbe, J., Klimek, L., Lötval, J., Moreno, C., Mosques, R., Muraro, A., Niggemann, B., Pajno, G., Passalacqua, G., Pfaar, O., Rak, S., Senna, G., Senti, G., Valovirta, E., van Hage, M., Virchow, J.C., Wahn, U., Papadopoulos, N. (2012). EAACI: a european declaration on immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clinical and translational allergy*, 20(2), 1-8.

Carmichael, K.P. (2010). Basic ocular pathology. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*, (pp. 71-92). London: Manson Publishing Ltd.

Carson, W.E., Lindemann, M.J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J.C., Chou, C.C, Narula, S. & Caligiuri, M.A. (1995). The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*, 85(12), 3577-3585.

Cavaillon, J.M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 48(10), 445-453.

Chigbu, G.I. (2009). The pathophysiology of ocular allergy: a review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 32(1), 3-15.

Cook, C.S., Peiffer Jr, R.L. & Landis, M.L. (2009). Clinical basic science. In R.L. Peiffer Jr & S.M. Petersen-Jones (Eds.), *Small animal ophthalmology: a problem oriented approach*, (4th ed.). (pp. 1-13). London: Elsevier Limited.

Cook, E.B., Stahl, J.L., Barney, N.P. & Graziano, F.M. (2002). Mechanisms of antihistamines and mast cell stabilizers in ocular allergic inflammations. *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy*, 1, 167-180.

- Dastychová, E., Necas, M. & Vasku, V. (2008). Contact hypersensitivity to selected excipients of dermatological topical preparations and cosmetics in patients with chronic eczema. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 17(2), 61-68.
- Day, M.J. (2008a). Basic immunology. In M. J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, (2nd ed.). (pp. 11-60). London: Manson Publishing Ltd.
- Day, M.J. (2008b). Immunopathological mechanisms. In M. J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, (2nd ed.). (pp. 61-74). London: Manson Publishing Ltd.
- Day, M.J. (2008c). The basics of immune-mediated disease. In M. J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, (2nd ed.). (pp. 75-93). London: Manson Publishing Ltd.
- Day, M.J. (2008d). Vaccination. In M.J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, (2nd ed.). (pp. 413-431). London: Manson Publishing Ltd.
- Day, M.J. & Crispin, S. (2008). Immune-mediated ocular disease. In M. J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, (2nd ed.). (pp. 263-286). London: Manson Publishing Ltd.
- Day, M.J. & Shaw, S.E. (2008). Immune-mediated skin disease. In M.J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, (2nd ed.). (pp. 122-171). London: Manson Publishing Ltd.
- de Benedetto, A., Agnihothri, R., McGirt, L.Y., Bankova, L.G. & Beck, L.A. (2009). Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects?. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(1), 14-30.
- de Bruin Weller, M.S., Rockmann, H., Knulst, A.C. & Bruijnzeel-Koomen, C.A. (2013). Evaluation of the adult patient with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 43(3), 279-291.
- de Kosak, Y., Thillaye-Goldenberg, B., Naud, M.C., da Costa, A.V., Auriault, C. & Verwaerde, C. (2002). Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by systemic and subconjunctival adenovirus-mediated transfer of the viral IL-10 gene. *Clinical Experimental Immunology*, 130(2), 212-223.
- de Waal, M.R., Yssel, H. & de Vries, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *The Journal of Immunology*, 150(11), 4754-4765.
- Delgado, E. (2014). Patologia não ulcerativa da córnea. *Opcional – Manifestações oculares de doenças sistémicas*. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Dimich-Ward, H., Chow, Y., Chung, J. & Trask, C. (2006). Contact with livestock – a protective effect against allergies and asthma?. *Clinical Experimental Immunology*, 36(9), 1122-1129.
- Doughty, M.J. (2002). Surface features and morphology of bulbar conjunctival cells of bovine eyes obtained from a slaughterhouse: a scanning electron microscope and impression cytology study. *Current Eye Research*, 24(5), 341-353.
- Dreborg, S. (2001). Histamine reactivity of the skin. *Allergy*, 56(5), 359-364.

- Durham, S.R., Emminger, W., Kapp, A., Colombo, G., de Monchy, J.G., Rak, S., Scadding, G.K., Andersen, J.S., Riis, B. & Dahl, R. (2010). Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 131-138.
- Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A. & Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(12), 1645-1651.
- Epstein, S.P., Ahdoot, M., Marcus, E. & Asbell, P.A. (2009). Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 25(2), 113-119.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 23-31.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(6), 2081-2095.
- Friedlaender, M.H. (2002). Conjunctival provocation testing: overview of recent clinical trials in ocular allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2(5), 413-417.
- Friedlaender, M.H. (2011). Ocular allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11(5), 477-482.
- Fujishima, H., Toda, I., Shimazaki, J. & Tsubota, K. (1996). Allergic conjunctivitis and dry eye. *British Journal of Ophthalmology*, 80(11), 994-997.
- Garcia-Ortega, P., Costa, B. & Richart, C. (1989). Evaluation of the conjunctival provocation test in allergy diagnosis. *Clinical and Experimental Allergy*, 19(5), 529-532.
- Gehring, U., Bolte, G., Borte, M., Bischof, W., Fahlbusch, B., Wichmann, H.E., Heinrich, J. & LISA study group. (2001). Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(5), 847-854.
- Gelatt, K.N. (2014a). Canine conjunctiva: diseases and surgery. In K.N. Gelatt (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, (3rd ed.). (pp. 200-215). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Gelatt, K.N. (2014b). Canine nasolacrimal duct and lacrimal secretory systems: diseases and surgery. In K.N. Gelatt (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, (3rd ed.). (pp. 186-199). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Gelatt, K.N. (2014c). Eye examination and diagnostics. In K.N. Gelatt (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, (3rd ed.). (pp. 103-144). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Gelatt, K.N. (2014d). Ocular pharmacology and therapeutics. In K.N. Gelatt (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, (3rd ed.). (pp. 66-99). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Gelatt, K.N. (2014e). Ophthalmic structures. In K.N. Gelatt (Ed.), *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, (3rd ed.). (pp. 12-39). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

- Gelatt, K.N. & MacKay, E.O. (1998). Distribution of intraocular pressure in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 1(2-3), 109-114.
- Ghasemi, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R., Owlia, P., Hassan, Z.M. & Faghihzadeh, S. (2012). Roles of IL-10 in ocular inflammations: a review. *Ocular Immunology & Inflammation*, 20(6), 406-418.
- Gomes, P.J., Ousler, P.W., Welch, D.L., Smith, L.M., Coderre, J. & Abelson, M. (2013). Exacerbation of signs and symptoms of allergic conjunctivitis by a controlled adverse environment challenge in subjects with a history of dry eye and ocular allergy. *Journal of Clinical Ophthalmology*, 7, 157-165.
- Goto, Y., Ibaraki, N. & Miyake, K. (2003). Human lens epithelial cell damage and stimulation of their secretion of chemical mediators by benzalkonium chloride rather than latanoprost and timolol. *Archives of Ophthalmology*, 121(6), 835-839.
- Gradman, J. & Wolthers, O.D. (2006). Allergic conjunctivitis in children with asthma, rhinitis and eczema in a secondary outpatient clinic. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17(7), 524-526.
- Grahn, B.H. & Wolfer, J. (2009). Therapeutics. In R.L. Peiffer Jr & S.M. Petersen-Jones (Eds.), *Small animal ophthalmology: a problemoriented approach*. (4th ed.). (pp. 50-66). London: Elsevier Limited.
- Grahn, B.H., Sisler, S. & Storey, E. (2005). Qualitative tear film and conjunctival goblet cells assessment of cats with corneal sequestra. *Veterinary Ophthalmology*, 8(3), 167-180.
- Griffin, C.E. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 255-269.
- Griffin, C.E. & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 363-383.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E. & Roncarolo, M.G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*, 160(7), 3188-3193.
- Hamard, P., Blondin, C., Debbasch, C., Warnet, J.M., Baudouin, C. & Brignole, F. (2003). In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 241(12), 1037-1043.
- Henriques, S., Silva, E., Cruz, S., Silva, M.F., Ferreira-Dias, G., Lopes-da-Costa, L. & Mateus, L. (2015). Oestrous cycle-dependent expression of *Fas* and *Bcl2* family gene products in normal canine endometrium. In G. Martin (Ed.), *Reproduction, Fertility and Development*. Acedido em Ago. 08, 2015 em: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD14245>
- Hill, P.B., Hillier, A. & Olivry, T. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VI): IgE-induced immediate and late-phase reactions, two inflammatory sequences at sites of intradermal allergen injections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81 (3-4), 199-204.

- Hill, P.B. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 169-186.
- Hillier, A. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 289-304.
- Hillier, A. & Griffin, C.E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 147-151.
- Hillier, A., Cole, L.K., Kwochka, K.W. & McCall, C. (2002). Late phase reactions to intradermal testings with *Dermatophagoides farina* in healthy dogs and dogs with house dust mite-induced atopic dermatitis. *American Journal of Veterinary Research*, 63(1), 69-73.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Ferreira, F.D., Ebner, C., Barisanit, T.L.K., Kraft, D. & Baumgartner, I. (1996). Detection of allergen-specific IgE in tears of grass pollen-allergic patients with allergic rhinoconjunctivitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 26(1), 79-87.
- Hong, J. & Bielory, L. (2009). Allergy to ophthalmic preservatives. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(5), 447-453.
- Høst, A. & Halcken, S. (2003). Practical aspects of allergy-testing. *Paediatric Respiratory Reviews*, 4(4), 312-318.
- Irkec, M.T. & Bozkurt, B. (2012). Molecular immunology of allergic conjunctivitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 12(5), 534-539.
- Ishibashi, T., Yokoi, N. & Kinoshita, S. (2003). Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *Journal of Glaucoma*, 12(6), 486-490.
- Kari, O. & Saari, K.M. (2010). Updates in the treatment of ocular allergies. *Journal of Asthma and Allergy*, 3, 149-158.
- Kilpeläinen, M., Terho, E.O., Helenius, H. & Koskenvuo, M. (2002). Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy*. 57(12), 1130-1135.
- Knop, E. & Knop, N. (2005). The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *Journal of Anatomy*, 206(3), 271-285.
- Kovse, M., Zrimsek, P. & Kotnik, T. (2012). Evaluation of the effect of allergen-specific immunotherapy in atopic dogs using CADESI-03 scoring system: a methylprednisolone-controlled clinical study. *Veterinary Archive*, 82(3), 251-264.
- Kube, D., Platzer, C.von Knethen, A., Straub, H., Bohlen, H., Hafner, M. & Tesch, H. (1995). Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine*, 7(1), 1-7.
- La Rosa, M., Lionetti, E., Reibaldi, M., Russo, A., Longo, A., Leonardi, S., Tomarchio, S., Avitabile, T. & Reibaldi, A. (2013). Allergic conjunctivitis: a comprehensive review of the literature. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(18), 1-8.

- Leonardi, A. (2005). In-vivo diagnostic measurements of ocular inflammation. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5(5), 464-472.
- Leonardi, A. (2013). Allergy and allergic mediators in tears. *Experimental Eye Research*, 117, 106-117.
- Leonardi, A., Bocagka, E., Fauquert, J.L., Kowalski, M.L., Groblewska, A., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Doan, S., Marmouz, F., Demoly, P. & Delgado, L. (2012). Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy*. 67(11), 1327-1337.
- Leonardi, A., Borghesan, F., Faggian, D., Secchi, A. & Plebani, M. (1995). Eosinophil cationic protein in tears of normal subjects and patients affected by vernal keratoconjunctivitis. *Allergy*, 50(7), 610-613.
- Leonardi, A., Curnow, S.J., Zhan, H. & Calder, V.L. (2006). Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(6), 777-784.
- Leonardi, A., Motterle, L. & Bortolotti, M. (2008). Allergy and the eye. *Clinical and Experimental Immunology*, 153(1), 17-21.
- Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., Wang, H. & Yang, X. (2012). IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine – a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. In B. Ryffel (Ed.), *PLoS One*. Acedido em Abr. 14, 2015 em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033628>
- Loewenstein, C. & Mueller, R.S. (2009). A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*, 20(2), 84-98.
- Lourenço, A.M. (2010). *Contribuição para o estudo da dermatite atópica canina na área metropolitana de Lisboa*. Tese de Doutoramento em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Lourenço, A.M., Delgado, E., Neto, I., Peleteiro, M.C., Morais-Almeida, M. & Correia J.H. (2011). Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 14(4), 248-256.
- Maggs, D.J. (2008a). Basic diagnostic techniques. In D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, (4th ed.). (pp. 81-106). Missouri: Saunders Elsevier.
- Maggs, D.J. (2008b). Conjunctiva. In D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, (4th ed.). (pp. 135-150). Missouri: Saunders Elsevier.
- Maggs, D.J. (2008c). Eyelids. In D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, (4th ed.). (pp. 107-134). Missouri: Saunders Elsevier.
- Maggs, D.J. (2008d). Ocular pharmacology and therapeutics. In D.J. Maggs, P.E. Miller & R. Ofri (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, (4th ed.). (pp. 33-61). Missouri: Saunders Elsevier.
- Maintz, L. & Novak, N. (2007). Getting more and more complex: the pathophysiology of atopic eczema. *European Journal of Dermatology*, 17(4), 267-283.

- Malling, H.J.(1998). Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy*, 53(5), 461-472.
- Mantelli, F., Lambiase, A. & Bonini, S. (2009). A simple and rapid diagnostic algorithm for the detection of ocular allergic diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(5), 471-476.
- Marsella, R., Samuelson, D. & Doerr, K. (2010). Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 81-88.
- Martin, C.L. (2010a). Anamnesis and the ophthalmic examination. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*, (pp. 11-40). London: Manson Publishing Ltd.
- Martin, C.L. (2010b). Conjunctiva and third eyelid. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*, (pp. 183-218). London: Manson Publishing Ltd.
- Martin, C.L. (2010c). Eyelids. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*, (pp. 145-182). London: Manson Publishing Ltd.
- Martin, C.L. (2010d). Lacrimal system. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*, (pp. 219-240). London: Manson Publishing Ltd.
- Martin, C.L. (2010e). Ophthalmic Pharmacology. In C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*, (pp. 41-70). London: Manson Publishing Ltd.
- Matias, D.F. (2013). *Avaliação de uma nova técnica em alergologia veterinária: testes cutâneos por picada em cães*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- McClellan, S.A., Huang, X., Barrett, R.P., van Rooijen, N. & Hazlett, L.D. (2003). Macrophages restrict *Pseudomonas aeruginosa* growth, regulate polymorphonuclear neutrophil influx, and balance pro- and anti-inflammatory cytokines in BALB/c mice. *Journal of Immunology*, 170(10), 5219-5227.
- Mishra, G.P., Tamboli, V., Jwala, J. & Mitra, A.K. (2011). Recent patents and emerging therapeutics in the treatment of allergic conjunctivitis. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 5, 26-36.
- Möller, C., Björkstén, B., Nilsson, G. & Dreborg, S. (1984). The precision of the conjunctival provocation test. *Allergy*, 39(1), 37-41.
- Montan, P.G. & van Hage-Hamsten, M. (1996). Eosinophil cation protein in tears in allergic conjunctivitis. *The British Journal of Ophthalmology*, 80(6), 556-560.
- Morales, C.A.W., Duran, A.J.G., Delgado, J.A. & Hernández, A.T. (2008). Conjuntivitis alérgica. *MedUNAB*, 11(2), 168-175.
- Mortemousque, B., Fauquert, J.L., Chiambaretta, F., Demoly, P., Helleboid, L., Creuzot-Garcher, C. & Brémond-Gignac, D. (2006). Le test de provocation conjonctival: recommandations pratiques pour le diagnostic des conjonctivites allergiques. *Journal francais d'ophtalmologie*, 29(7), 837-846.
- Mosser, D.M. & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews*, 226, 205-218.

- Murphy, C.J., Samuelson, D.A. & Pollock, R.V. (2013). The eye. In H.E. Evans & A. de Lahunta (Eds.), *Miller's Anatomy of the Dog*, (4th ed.). (pp. 746-785). Missouri: Elsevier Saunders.
- Nagakura, T., Ogino, S., Okubo, K., Sato, N., Takahashi, M. & Ishikawa, T. (2008). Omalizumab is more effective than suplatast tosilate in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 38, 329-337.
- Nguyen, D.Q., Srinivasan, S., Hiscott, P. & Kaye S.B. (2007). Thimerosal-induced limbal stem cell failure: report of a case and review of the literature. *Eye Contact Lens*, 33(4), 196-198.
- Novak, N., Bieber, T. & Leung, D.Y. (2003). Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(6), 128-139.
- O'Brien, T.P. (2013). Allergic conjunctivitis: an update on diagnosis and management. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 13(5), 543-549.
- Olivry, T. (2010). New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 123-126.
- Olivry, T., DeBoer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nutall, T., Prélaud, P. & International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2010). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(3), 233-248.
- Olivry, T., Dunston, S.M., Murphy, K.M. & Moore, P.F. (2001). Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, 12(1), 49-58.
- Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Griffin, C.E., Hill, P.B. & International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA) (2014). Validation of the canine atopic dermatitis extent and severity index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 25(2), 77-85.
- Oppenheimer, J. & Nelson, H.S. (2006a). Skin testing. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 96(2 Suppl 1), S6-12.
- Oppenheimer, J. & Nelson, H.S. (2006b). Skin testing: a survey of allergists. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 96(1), 19-23.
- Oppenheimer, J., Durham, S.R. & Nelson, H.S. (2007). *World Allergy Organization: allergy diagnostic testing*. Acedido em Jul. 09, 2015 em: http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/allergy_diagnostic/
- Owen, C.G., Shah, A., Henshaw, K., Smeeth, L. & Sheikh, A. (2004). Topical treatments for seasonal allergic conjunctivitis: systematic review and meta-analysis of efficacy and effectiveness. *The British Journal of General Practice*, 54(503), 451-456.
- Ozdemir, C., Akadis, M.A. & Akadis, C.A. (2009). Role of T cells. In T. Bieber & D.Y. Leung (Eds.), *Atopic Dermatitis*, (2nd ed.). (pp. 121-139). New York: Informa Healthcare.

- Pallasaho, P., Rönmark, E., Haahtela, T., Sovijärvi, A.R. & Lundbäck, B. (2006). Degree and clinical relevance of sensitization to common allergens among adults: a population study in Helsinki, Finland. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(4), 503-509.
- Palmares, J., Delgado, L., Cidade, M., Quadrado, M.J. & Filipe, H.P. (2010). Allergic conjunctivitis: a national cross-sectional study of clinical characteristics and quality of life. *European Journal of Ophthalmology*, 20(2), 257-264.
- Paolieri, F., Battifora, M., Riccio, A.M., Pesce, G., Canonica, G.W. & Bagnasco, M. (1997). Intercellular adhesion molecule-1 on cultured human cultured cell lines: influence of proinflammatory cytokines. *Allergy*, 52(5), 521-531.
- Peterson-Jones, S. & Stanley, R. (2009). Ocular discharge. In R.L. Peiffer Jr & S.M. Petersen-Jones (Eds.), *Small animal ophthalmology: a problem-oriented approach*. (4th ed.). (pp. 253-293). London: Elsevier Limited.
- Pucci, N., Novembre, E., Lombardi, E., Cianferoni, A., Bernardini, R., Massai, C., Caputo, R., Campa, L. & Vierucci, A. (2003). Atopy and serum eosinophil cationic protein in 110 white children with vernal keratoconjunctivitis: differences between tarsal and limbal forms. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(3), 325-330.
- Radcliffe, M.J., Lewith, G.T., Prescott, P., Church, M.K. & Holgate, S.T. (2006). Do skin prick and conjunctival provocation tests predict symptom severity in seasonal allergic rhinoconjunctivitis?. *Clinical and Experimental Allergy*, 36, 1488-1493.
- Ramsey, I. (Ed.). (2011). *BSAVA Small Animal Formulary*. (7th ed.). Gloucester: BSAVA.
- Reedy, L., Miller, W. & Willemse, T. (1997). *Allergic skin diseases of dogs and cats*. (2nd ed.). London: Saunders company Ltd.
- Rico, A.S. (2014). *Os testes de provocação conjuntival na avaliação da eficácia da imunoterapia alérgico-específica rush na dermatite atópica canina*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Riedi, C.A. & Rosario, N.A. (2010). Prevalence of allergic conjunctivitis: a missed opportunity?. *Allergy*, 65(1), 131-132.
- Roat, M., Romanowski, E., Araullo-Cruz, T. & Gordon, J. (1987). The antiviral effects of rose bengal and fluorescein. *Archives of Ophthalmology*, 105(10), 1415-1417.
- Rocha, M.I.L. (2012). *Skin prick tests – Preliminary evaluation of this technique for the diagnosis of canine atopic dermatitis sensitization*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.H., Kastelein, R., Moore, K.W. & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1890-1893.
- Sabat, R. (2010). IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(5), 315-324.
- Sánchez-Hernández, M.C., Fernández-Parra, B., Matheu, V., Navarro, A., Ibáñez, M.D., Dávila, I., Dordal, M.T., Lluch-Bernal, M., Rondón, C., Montoro, J., Antón, E., Colás, C. & Valero, A. (SEAIC Rhinoconjunctivitis Committee 2010) (2011). Allergic

conjunctivitis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21(2), 1-19.

- Sánchez-Hernández, M.C., Montero, J., Rondon, C., Benitez del Castillo, J.M., Velázquez, E., Herreras, J.M., Fernández-Parra, B., Merayo-Llomez, J., Del Cuviello, A., Vega, F., Valero, A., Panizo, C., Montoro, J., Matheu, V., Lluch-Bernal, M., González, M.L., González, R., Dordal M.T., Dávila, I., Colás, C., Campo, P., Antón, E., Navarro, A., SEAIC 2010 Rhinoconjunctivitis Committee & Spanish Group Ocular Surface-GESOC (2015). Consensus document on allergic conjunctivitis (DECA). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 25(2), 94-106.
- Sano, Y., Osawa, H., Sotozono, C. & Kinoshita, S. (1998). Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(10), 1953-1957.
- Samuelson, D.A. (2013). Ophthalmic anatomy. In K.N. Gelatt, B.C. Gilger & T.J. Kern (Eds.), *Veterinary Ophthalmology*, (5th ed.). (pp. 39-170). Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Scott, D.W. (1981). Observations on canine atopy. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 17, 91-100.
- Scott, D.W., Miller, W. & Griffin, C.E. (2001). Diagnostic methods. In D.W. Scott, W. Miller & C.E. Griffin (Eds.), *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, (6th ed.). (pp. 71-206). Philadelphia: W. B. Saunders.
- Singh, K., Axelrod, S. & Bielory, L. (2010). The epidemiology of ocular and nasal allergy in the United States, 1988-1994. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), 778-783.
- Sousa, C.A. & Marsella, R. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 153-157.
- Speiran, K., Bailey, D.P., Fernando, J., Macey, M., Barnstein, B., Kolawole, M., Curley, D., Watowich, S.S., Murray, P.J., Oskeritzian, C. & Ryan, J.J. (2009). Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(5), 826-836.
- Stumpf, T.H., Case, R., Shimeld, C., Easty, D.L. & Hill, D.J. (2002). Primary herpes simplex virus type 1 infection of the eye triggers similar immune responses in the cornea and the skin of the eyelids. *Journal of General Virology*, 83(Pt 7), 1579-1590.
- Suzuki, S., Goto, E., Dogru, M., Asano-Kato, N., Matsumoto, Y., Hara, Y., Fujishima, H. & Tsubota, K. (2006). Tear film lipid layer alterations in allergic conjunctivitis. *Cornea*, 25(3), 277-280.
- Swamy, B.N., Chilov, M., McClellan, K. & Petsoglou, C. (2007). Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in allergic conjunctivitis: meta-analysis of randomized trial data. *Ophthalmic Epidemiology*, 14, 311-319.
- Takamura, E., Uchio, E., Ebihara, N., Ohno, S., Ohashi, Y., Okamoto, S., Kumagai, N., Satake, Y., Shoji, J., Nakagawa, Y., Namba, K., Fukagawa, K., Fukushima, A. & Fujishima, H. (2011). Japanese guideline for allergic conjunctival diseases. *Allergology International*, 60(2), 191-203.
- Tosti, A. & Tosti, G. (1988). Thimerosal: a hidden allergen in ophthalmology. *Contact Dermatitis*, 18(5), 268-273.

- Tse, K. & Horner, A.A. (2008). Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis and prevention of allergic diseases. *Seminars in Immunology*, 30(1), 53-62.
- Uchio, E., Ono, S.Y., Ikezawa, Z. & Ohno, S. (2000). Tear levels of interferon-gamma, interleukin (IL) -2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(1), 103-109.
- Urban, M., Wyman, M., Rheins, M. & Marraro, R.V. (1972). Conjunctival flora of clinically normal dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 161(2), 201-206.
- Verin, P., Easty, D.L., Seechi, A., Ciprandi, G., Partouche, P., Nemeth-Wasmer, G., Brancato, R., Harrisberg, C.J., Estivin-Ebrardt, C., Coster, D.J., Apel, A.J., Coroneo, M.T., Knorr, M., Carmichael, T.R., Kent-Smith, B.T., Abrantes, P., Leonardi, A., Cerqueti, P.M., Modorati, G. & Martinez, M. (2001). Clinical evaluation of twice-daily emedastine 0,05% eye drops (Emadine eye drops) versus levocabastine 0,05% eye drops in patients with allergic conjunctivitis. *American Journal of Ophthalmology*, 131, 691-698.
- Willemse, A. (1984). Canine atopic disease: investigations of eosinophils and the nasal mucosa. *American Journal of Veterinary Research*, 45(9), 1867-1869.
- Willemse, A. & van den Brom, W.E. (1983). Investigations of the symptomatology and the significance of immediate skin test reactivity in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*, 34(3), 261-265.
- Wittich, F.W. (1941). Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal. *Journal of Allergy*, 12, 247-251.
- Zemann, B., Griot-Wenkz, M., Marti, E., Mayer, P., Eder, C., Nefzger, M., Schneider, H., Weck, A. & Liehl, E. (2002). Allergic pulmonary and ocular tissue responses in the absence of serum IgE antibodies (IgE) in an allergic dog model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87(3-4), 373-378.
- Zhao, S. & Fernald, R.D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, 12(8), 1047-1064.

ANEXO I – Autorização dos proprietários quanto à participação do seu animal de estimação no estudo “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina” (original).

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, cartão de cidadão nº _____, proprietário do animal de nome _____, raça _____, idade _____ e sexo _____, declaro que autorizo a colheita de uma amostra de conjuntiva de 2x2 mm após aplicação de anestesia tópica para realização do ensaio experimental “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina”, que tem como responsável a Prof. Doutora Esmeralda Delgado.

Lisboa, ____ de _____ de 2015.

ANEXO II – Ficha “Colheita de biópsia de conjuntiva canina” (original).



COLHEITA DE BIÓPSIA DE CONJUNTIVA CANINA

Colheita nº ____

Data: ____ / ____ / ____

Nome: _____	Raça: _____	
Idade: _____	Sexo: F FC M MC	Peso: ____kg
Sinais particulares: _____	Fotos: _____	
Proprietário: _____	Contacto: _____	

EXAME DERMATOLÓGICO

História dermatológica

Início dos sintomas: _____

Sinais clínicos: _____

Tratamento efetuado e/ou atual: _____

Data de início do tratamento: _____

EXAME OFTALMOLÓGICO

Sinais oculares: _____

Início: _____ Agudo/ Subagudo/ Crónico

Evolução: Estática / Progressão / Regressão / Intermitente / Episódica

Tratamento efetuado e/ou atual: _____

	O.E.	O.D.
<i>Resposta de ameaça</i>		
<i>Reflexo palpebral</i>		
<i>Reflexo corneano</i>		
<i>RFD</i>		
<i>RFC</i>		
<i>Teste de Schirmer</i>		
<i>PIO</i>		

Biomicroscopia: _____

Fundoscopia: _____

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS SINAIS CLÍNICOS DE CONJUNTIVITE ALÉRGICA

	O.E.	O.D.
<i>Corrimento ocular (0 a 3)</i>		
<i>Epífora (0 a 3)</i>		
<i>Hiperémia conjuntival (0 a 3)</i>		
<i>Prurido (0 a 3)</i>		
<i>Quemose (0 a 3)</i>		
<i>Queratite concomitante (0-3)</i>		
Score TOTAL		

Resultados e observações: _____

COLHEITA DA AMOSTRA E IDENTIFICAÇÃO

Colheita da amostra de conjuntiva palpebral após uma gota de Anestocil O.D. O.E.

Dificuldades: _____

Sangrou: SIM NÃO

Envio para laboratório - identificação nº _____

Resultados e observações: _____

ANEXO III – Tabela de classificação CADESI-4 (adaptado de Olivry et al., 2014).

Tabela de classificação CADESI – 4

CADESI-04 (ICADA)		Eritema	Liquenificação	Escoriações e/ou Alopecia	TOTAL
Região perilabial (esquerda e direita combinadas)		1			
Pavilhão Auricular	Esq.	2			
	Dto.	3			
Axilas	Esq.	4			
	Dta.	5			
Patas dianteiras (faces dorsal e palmar combinadas)	Esq.	6			
	Dta.	7			
Patas traseiras (faces dorsal e plantar combinadas)	Esq.	8			
	Dta.	9			
Flexor ulnar do carpo (dobras do cotovelo)	Esq.	10			
	Dto.	11			
	Dta.	13			
Flancos	Esq.	14			
	Dto.	15			
Região inguinal (virilhas)	Esq.	16			
	Dta.	17			
Abdómen		18			
Períneo (desde a vulva/escroto até ao ânus)		19			
Face ventral da cauda (proximal)		20			
Classificar cada região e lesão com: ausente - 0; pouco – 1; moderado – 2; grave – 3.			Score TOTAL (20 x 3 x 3 = 180)		

Legenda: Dta. – Direita; Dto. – Direito; Esq. – Esquerda(o).

ANEXO IV - Dados dos animais incluídos no estudo “Expressão do gene da interleucina-10 na conjuntivite alérgica canina”.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL/COLHEITA	GRUPO	GÉNERO	IDADE	RAÇA
1C	Controlo	F	10,3a	Pequinês
2C	Controlo	F	2a	Indefinida
3C	Controlo	M	13a	Cruzado de Boxer
4C	Controlo	F	10a	Indefinida
5C	Controlo	F	11a	Indefinida
6C	Controlo	M	9a	Labrador retriever
7C	Controlo	F	1a	Barbado da Terceira
8C	Controlo	M	5a	Indefinida
9C	Controlo	F	8a	Indefinida
10C	Controlo	M	12,7a	Labrador retriever
1A	Atópico	M	3a	Bulldog inglês
2A	Atópico	M	10a	Shih tzu
3A	Atópico	M	2a	Labrador retriever
4A	Atópico	M	1,5a	Weimaraner
5A	Atópico	F	11m	Weimaraner
6A	Atópico	F	4a	Labrador retriever
7A	Atópico	F	6a	Weimaraner
8A	Atópico	F	10a	Fox Terrier
9A	Atópico	F	1,1a	Boxer
10A	Atópico	F	5a	Indefinida

Legenda: a – anos; A – Atópico; C – Controlo; F – Feminino; m – meses; M – Masculino.

ANEXO V – Resultados do exame oftalmológico realizado a todos os animais do grupo controlo e atópico.

IDENTIFICAÇÃO do ANIMAL/COLHEITA	Resposta de ameaça		Reflexo palpebral		Reflexo corneano		RFD		RCF		Teste de Schirmer (mm/min.)		PIO (mmHg)		Biomicroscopia		Fundoscopia	
	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.
1C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	18	18	19	N	N	N	N
2C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	10	19	20	N	N	*	*
3C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	21	20	14	15	N	N	N	N
4C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	15	12	11	N	N	N	N
5C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	18	18	19	N	N	N	N
6C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	18	17	17	19	N	N	N	N
7C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	17	13	15	N	N	N	N
8C	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	18	21	22	N	N	**	**
9C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15	16	12	13	N	N	***	***
10C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	16	9	10	N	N	***	***
1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	17	15	17	•	•	N	N
2A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15	15	17	18	•	•	N	N
3A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15	16	12	12	•	•	N	N
4A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	18	24	15	14	•	•	N	N
5A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	18	20	17	15	•	•	N	N
6A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	18	17	19	•	•	N	N
7A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	19	9	10	•	•	N	N
8A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	21	15	15	•	•	*	*
9A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16	17	18	20	•	•	N	N
10A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	21	20	15	16	•	•	N	N

Legenda: • - Ver score de conjuntivite alérgica (Anexo VI); ✓ - Presente; X – Ausente; * - Catarata; ** - Descolamento da retina; *** - Esclerose senil do cristalino; N – Normal; O.D. – Olho direito; O.E. – Olho Esquerdo.

ANEXO VI - Avaliação quantitativa dos sinais clínicos de conjuntivite alérgica.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL/COLHEITA	Corrimento ocular		Epífora		Hiperémia conjuntival		Prurido		Quemose		Queratite concomitante		Score TOTAL	
	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.	O.E.	O.D.
1A	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	0	2	11	13
2A	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	0	0	13	13
3A	0	0	1	1	3	3	2	2	2	2	0	0	8	8
4A	1	1	0	1	3	3	3	3	3	3	0	0	10	11
5A	1	1	0	0	3	3	2	2	2	2	0	0	8	8
6A	0	0	1	1	3	3	2	2	2	2	1	1	9	9
7A	1	1	1	1	3	3	1	1	2	1	1	1	9	8
8A	1	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	6	6
9A	0	0	1	1	3	3	2	2	3	3	0	0	9	9
10A	1	1	1	1	2	2	2	2	0	0	0	0	6	6

Legenda: 0 – Ausente; 1 – Ligeiro(a); 2 – Moderado(a); 3 – Grave; O.D. – Olho direito; O.E. – Olho esquerdo.

ANEXO VII – Valores obtidos através do CADESI-4.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL/COLHEITA	SCORE TOTAL
1A	36
2A	41
3A	35
4A	4
5A	15
6A	8
7A	0
8A	37
9A	12
10A	33

ANEXO VIII – Resultados dos níveis de expressão de mRNA do gene da interleucina-10.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL/COLHEITA	NÍVEL DE EXPRESSÃO DE mRNA DO GENE DA IL-10
1C	0,001922163
2C	0,007312811
3C	0,004681975
4C	0,004682767
5C	0,004031455
6C	0,005858765
7C	0,003685278
8C	0,002094755
9C	0,001423336
10C	0,00909161
1A	0,003731741
2A	0,004788485
3A	0,004294825
4A	0,003214756
5A	0,006534372
6A	0,0048311
7A	0,003017684
8A	0,013205046
9A	0,006087414
10A	0,00380187

