



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADEMIR ZACARIAS JUNIOR

**DETECÇÃO DE *Leptospira* spp. E *Helicobacter* spp. EM CÃES
COM GLAUCOMA E NEOPLASIAS OCULARES
E
LEVANTAMENTO HISTOPATOLÓGICO DE
ENFERMIDADES OFTALMOLÓGICAS CANINAS**

Londrina
2015

ADEMIR ZACARIAS JUNIOR

**DETECÇÃO DE *Leptospira* spp. E *Helicobacter* spp. EM CÃES
COM GLAUCOMA E NEOPLASIAS OCULARES
E
LEVANTAMENTO HISTOPATOLÓGICO DE
ENFERMIDADES OFTALMOLÓGICAS CANINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Frederico
Rodrigues Loureiro Bracarense.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Z13d Zacarias Junior, Ademir.

Detecção de *Leptospira* spp. e *Helicobacter* spp. em cães com glaucoma e neoplasias oculares e levantamento histopatológico de enfermidades oftalmológicas caninas / Ademir Zacarias Junior. – Londrina, 2015.
75 f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Cão – Olhos – Doenças – Teses. 2. Olhos – Tumores – Teses. 3. Oftalmologia veterinária– Teses. 4. Leptospirose – Teses. 5. Helicobacteriose – Teses. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:617.7

ADEMIR ZACARIAS JUNIOR

**DETECÇÃO DE *Leptospira* spp. E *Helicobacter* spp. EM CÃES COM
GLAUCOMA E NEOPLASIAS OCULARES**

E

**LEVANTAMENTO HISTOPATOLÓGICO DE ENFERMIDADES
OFTALMOLÓGICAS CANINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro
Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Jane Megid
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patologia Animal, de Leptospirose e de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob orientação do Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 3. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**

DEDICO

Aos meus pais, Ademir e Cleunice, que iniciaram tudo com o estímulo para os estudos e ajuda para encontrar as respostas.

À minha esposa Francielle e aos meus filhos Clarice e Julio. A primeira por ser tão especial, me apoiar, incentivar e me presentear com dois “tesouros”. Às crianças por me mostrar o verdadeiro sentido da vida.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Profa. Ana Paula F. R. L. Bracarense que aceitou o desafio da orientação e auxiliou muito no crescimento do pensamento crítico. Um grande exemplo de pesquisadora! Seus conselhos ajudaram muito em todo o doutorado e seguirão comigo. Muito obrigado.

Ao Prof. Julio Cesar de Freitas que concedeu o primeiro estágio e orientação na graduação, pelos conselhos, por me ajudar a traçar um novo objetivo no momento de calmaria, pela orientação no mestrado e nas atividades do doutorado. Serei sempre muito grato.

À Profa. Mirian S. Batista de Souza que contribuiu com o surgimento do interesse pela oftalmologia e por participar das bancas de qualificação e defesa do doutorado.

Ao Prof. Selwyn Arlington Headley pelos questionamentos durante o desenvolvimento das atividades, o exemplo de espírito questionador e por aceitar participar das bancas de qualificação e defesa do doutorado.

À Profa. Roberta Lemos Freire pelos ensinamentos e por aceitar participar da banca de defesa.

À Profa. Jane Megid por prontamente aceitar participar da banca da defesa.

Ao Prof. Amauri A. Alfieri pela brilhante condução do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e por ter tornado a realização das atividades no seu laboratório viáveis para o desenvolvimento desta tese.

À Dra. Letícia Yamasaki Buck por aceitar participar da banca de qualificação e contribuir para a correção desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário-UEL Karina Basso, Rogério Marcasso e Thais Corrêa que ajudaram de forma indescritível durante todo o desenvolvimento das atividades laboratoriais.

À colega Juliana Fritzen na realização das atividades no Laboratório de Virologia do Hospital Veterinário-UEL.

A toda equipe não mencionada dos laboratórios de Anatomia Patológica, Leptospirose e Virologia do Hospital Veterinário-UEL que esteve sempre disponível para as atividades relacionadas a esse pesquisa.

Aos estimados amigos Thales R. R. Barreiros, Wanessa Blaschi, Thais H. C. Patelli, Francisco A. A. Souza e Mauro J. L. Cardoso, por toda a ajuda nessa jornada, seja com pesquisas, nas disciplinas, trocas de aulas, conselhos, torcida e principalmente pelo bom humor, cuidados com minha família e por promover uma convivência tão harmoniosa. Muito obrigado.

Aos Residentes do Hospital Veterinário–UENP Renata Zarpelão, Júlio Luchetta, Fernanda Palmieri, Denise Lika, Carol Geron e Flávia Maria que sempre auxiliaram na realização das atividades e pela torcida.

À toda equipe do Hospital Veterinário–UENP Nair Concentino, Antônia Eugênio, Gesiane Nascimento, Alcídia Ferrari, Rosivaldo Gequim, Weslane Pereira pela ajuda na condução dos atendimentos e rotina hospitalar.

À Helenice Kieski, como representante do Programa de Ciência Animal, sempre muito competente e prestativa nas questões da pós-graduação. Muito obrigado.

À Universidade Estadual do Norte do Paraná, por todo o apoio e suporte.

*“Outras coisas podem nos mudar, mas
nós começamos e terminamos em
família.”*

Anthony Brandy – compositor

ZACARIAS JUNIOR, Ademir. **Detecção de *Leptospira* spp. e *Helicobacter* spp. em cães com glaucoma e neoplasias oculares e Levantamento histopatológico de enfermidades oftalmológicas caninas.** 2015. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

As infecções oculares podem estar associadas a doenças sistêmicas, podendo causar principalmente uveíte e glaucoma. Nos cães, a uveíte é a causa principal dos glaucomas secundários e pode resultar de diversas etiologias bacterianas, como a infecção por *Leptospira interrogans*. Nos cães o método diagnóstico mais utilizado é a sorroaglutinação microscópica (SAM). Nos humanos as bactérias do trato digestório também podem ser desencadeadoras de oftalmopatias, e o gênero *Helicobacter*, potencialmente, pode acarretar uveíte, glaucoma e tumores. Não foram encontrados estudos avaliando esta condição em cães, tornando a elucidação dos mecanismos de atuação dos agentes infecciosos essenciais para a condução, tratamento e prevenção das doenças oculares. O objetivo deste estudo foi demonstrar a presença do DNA de bactérias dos gêneros *Helicobacter* e *Leptospira* nos fluidos oculares e tumores de caninos e determinar a significância estatística com glaucomas secundários e neoplasias oculares. Foram estudados 16 cães com glaucomas secundários e 18 cães com neoplasias oculares, que tiveram amostras colhidas para a realização de PCR para *Helicobacter* spp. e *Leptospira* spp., SAM e histopatologia. Na PCR dos pacientes glaucomatosos foram detectados dois positivos para *Helicobacter* e nove animais positivos para *Leptospira*. Nos tumores foram detectados três amostras positivas para *Leptospira*. A PCR para *Leptospira* apresentou diferença significativa para os glaucomas ($P=0,01940$). Foram observados nove animais sororreagentes na SAM e neste exame houve a significância entre o sexo masculino e a positividade ($P=0,02914$). Nos diagnósticos histopatológicos dos cães com glaucoma a pan-oftalmite foi o resultado mais frequente, enquanto nos cães com tumores a maior prevalência foi de adenomas/epiteliomas. Os agentes etiológicos estudados foram identificados nas afecções oculares e podem estar relacionados à patogênese destas enfermidades em cães. O objetivo da segunda pesquisa foi avaliar a prevalência de alterações oculares e os dados gerais dos cães com amostras oculares processadas no laboratório de um Hospital Veterinário Escola no período de janeiro de 1985 a dezembro de 2014. Foram realizados 30.957 exames, sendo 18.083 provenientes da espécie canina em diversos tecidos. Desses, 139 (0,77%) corresponderam a exames histopatológicos resultantes de biópsias de enfermidades oftalmológicas. Os diagnósticos mais frequentes foram os processos inflamatórios, adenomas/epiteliomas, carcinomas, tumores melanocíticos e processos hiperplásicos. A análise dos dados de registros de um centro de referência auxilia no entendimento da rotina das atividades, assim como favorece a compreensão do comportamento biológico de algumas neoplasias.

Palavras-chave: Leptospirose. Helicobactérias. PCR. SAM. Histopatologia. Tumores Oculares.

ABSTRACT

ZACARIAS JUNIOR, Ademir. **Detection of *Leptospira* spp. and *Helicobacter* spp. in dogs with glaucoma and ocular tumors and Histopathological survey of canine ophthalmological diseases.** 2015. 75 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Eye infections may be associated to systemic diseases, mainly causing uveitis and glaucoma. Uveitis is the leading cause of secondary glaucoma in dogs caused by several bacteria, and may result for several bacterial etiology such as *Leptospira interrogans*. The main diagnostic method in dogs is the microscopic agglutination test (MAT). In humans, the bacteria of the digestive tract may also be triggering of eye diseases, and the *Helicobacter pylori* acts potentially causing uveitis, glaucoma and tumors. However in dogs have been no studies evaluating this condition. The elucidation of the role of infectious agents may aid in the diagnosis, treatment and prevention of ocular diseases. The objective of this study was to demonstrate the presence of *Helicobacter* DNA and *Leptospira* DNA in ocular fluids and tissues to determine the association with secondary glaucoma and ocular tumors. The samples from 16 dogs with secondary glaucoma and 18 with ocular tumors were tested with PCR for *Helicobacter* spp. e *Leptospira* spp., SAM and histopathology. The PCR of glaucomatous patients detected two positive animals for *Helicobacter* and nine for *Leptospira*. In tumors were detected three positive samples for *Leptospira*. The *Leptospira* PCR was significantly associated to glaucoma ($P = 0,01940$). Nine animals were seropositive in SAM and there was association between male and positivity ($P = 0,02914$). Panophthalmitis was the most frequent diagnosis in glaucomatous dogs, while the most frequent tumors were adenomas/epiteliomas. The etiologic agents studied were detected in ocular diseases and could cause the pathogenesis of these diseases in dogs. The aim of the second study was to evaluate the prevalence of ocular diseases and the general data of dogs with ocular processed samples in laboratory of a Veterinary Teaching Hospital from january 1985 to december 2014. During this period, 30,957 clinical reports were reviewed, 18,083 from the tissues of canine species. 139 (0.77%) accounted for histopathological samples derived from biopsies of eye diseases. Inflammatory processes, adenomas/epiteliomas, carcinomas, melanocytic tumors and hyperplastic processes were the most common diagnoses. The analysis of the data records of a reference center supports the understanding of laboratory routine, and promotes comprehension of the biological behavior of some tumors.

Key words: Leptospirosis. Helicobacteria. PCR. MAT. Histopathology. Ocular Tumors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Infiltrado inflamatório estromal na córnea de cão glaucomatoso e com detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR no bulbo ocular (H.E., 10x)..... 38
- Figura 2** – A) Infiltrado inflamatório na íris de cão glaucomatoso e com detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR no bulbo ocular (H.E., 10x). B) Necrose no corpo ciliar de cão glaucomatoso e com detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR no bulbo ocular (H.E., 20x)..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Detecção do DNA bacteriano pela PCR em amostras de fluidos e tecidos oculares em pacientes caninos com glaucoma e tumores oculares. Londrina, 2015.....	36
Tabela 2 –	Distribuição da frequência dos sorovares de <i>Leptospira</i> spp. nos 9 cães sororreagentes na SAM com glaucoma (G) ou neoplasias oculares (T) de acordo com a titulação das aglutininas. Londrina, 2015.....	37

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Frequência dos diagnósticos nas amostras de alterações oftalmológicas caninas enviadas para o exame histopatológico no Laboratório de Patologia Animal- UEL, no período de 1985-2014..... 59
- Quadro 2** – Gráfico da localização das amostras de alterações oftalmológicas caninas enviadas para o exame histopatológico no Laboratório de Patologia Animal- UEL no período de 1985-2014 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HE	Hematoxilina e eosina
IgG	Imunoglobulina G
LPS	Lipopolissacarídeo
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
n-PCR	<i>Nested-Polymerase chain reaction</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIO	Pressão intraocular
SAM	Soroaglutinação microscópica
SRD	Sem raça definida

1	REVISÃO DE LITERATURA	16
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	28
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	29
	DETECÇÃO DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. E <i>HELICOBACTER</i> SPP. EM CÃES COM GLAUCOMA E NEOPLASIAS OCULARES	29
	RESUMO	29
	ABSTRACT	30
	INTRODUÇÃO	31
	MATERIAL E MÉTODOS	32
	RESULTADOS	35
	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÕES	42
	AGRADECIMENTOS	43
	REFERÊNCIAS	43
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	49
	LEVANTAMENTO HISTOPATOLÓGICO DE ENFERMIDADES OFTALMOLÓGICAS CANINAS EM UM HOSPITAL VETERINÁRIO ESCOLA (1985-2014)	49
	RESUMO	49
	ABSTRACT	49
	INTRODUÇÃO	50
	MATERIAL E MÉTODOS	51
	RESULTADOS	51
	DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÕES	56
	AGRADECIMENTOS	56
	REFERÊNCIAS	57

5	CONCLUSÕES	61
6	PERSPECTIVAS	62
	ANEXOS	63
	ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais	64
	ANEXO B – Normas para publicação de artigos científicos (Pesquisa Veterinária Brasileira – Brazilian Journal of Veterinary Research)	66
	ANEXO C – Protocolo de Extração de DNA.....	67
	ANEXO D – Protocolo de Técnicas	74

1 REVISÃO DE LITERATURA

DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n4p1973

Glaucoma canino e a infecção por *Helicobacter* spp.: uma possível correlação

Canine glaucoma and *Helicobacter* spp. infection: a possible relationship

Ademir Zacarias Junior^{1*}; Francielle Gibson da Silva-Zacarias²;
Mauro José Lahm Cardoso²; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense³

Resumo

O aparelho da visão nos animais domésticos é bastante complexo e delicado, formado pelo bulbo ocular e seus anexos. Distúrbios que comprometam o equilíbrio entre a produção e a drenagem do humor aquoso podem resultar em variações da pressão intra-ocular e glaucoma. A síndrome do paciente glaucomatoso apresenta aproximadamente 0,5% de incidência nos cães e é uma das principais causas de cegueira, dor ocular e indicação de cirurgias para enucleação. Os glaucomas secundários são frequentes e podem resultar de quadros de uveíte causadas pela infecção por bactérias dos gêneros *Brucella*, *Leptospira*, *Ehrlichia*, entre outros agentes etiológicos. Nos humanos, as bactérias do gênero *Helicobacter* tem atraído a atenção dos oftalmologistas, pois potencialmente atuam na patogênese de diversos problemas oculares, incluindo o glaucoma. Em cães, não foram realizados estudos que correlacionem a origem dos glaucomas ou uveítes secundárias com bactérias do gênero *Helicobacter*. Considerando que a uveíte com causas diversas nos cães é muito frequente e que, comprovadamente, há associação entre bactérias do gênero *Helicobacter* e esta condição em humanos, evidencia-se a importância de estudos que avaliem estes aspectos também em animais de companhia, facilitando a compreensão da etiopatogenia dos glaucomas e possivelmente acarretando na proposição de protocolos terapêuticos mais eficazes para os pacientes glaucomatosos.

Palavras-chave: Uveíte, patogenia, helicobactéria, *H. pylori*

Abstract

The ocular system in domestic animals is very complex and delicate, and composed for the eyeball and ocular adnexal. Disorders that affect the balance between production and outflow of aqueous humor can result in variations in intraocular pressure and glaucoma. Syndrome glaucomatous presents approximately 0.5% incidence in dogs and is a leading cause of blindness, eye pain and surgeries for enucleation. The secondary glaucoma are frequent and result of uveitis by bacteria of the genus *Brucella*, *Leptospira*, *Ehrlichia*, and other etiologic agents. In humans, the bacteria of the genus *Helicobacter* has attracted the attention of ophthalmologists because potentially operate in the pathogenesis of several eye problems, including glaucoma. In dogs, there are no studies that correlate the origin of glaucoma or secondary uveitis to bacteria of the genus *Helicobacter*. Whereas uveitis with unknown cause in dogs is very common and proven association between bacteria of the genus *Helicobacter* and this condition

¹ Prof. Assistente, Setor de Veterinária e Produção Animal, Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Bandeirantes, PR. E-mail: zacarias@uenp.edu.br

² Profs. Adjuntos, Setor de Veterinária e Produção Animal, UENP, Bandeirantes, PR. E-mail: franciellegs@uenp.edu.br, maurolahm@uenp.edu.br

³ Profª Associada, Deptª de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: anapaula@uel.br

* Autor para correspondência

Recebido para publicação 23/08/13 Aprovado em 10/02/14

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1973-1984, jul./ago. 2014

in humans, increases the importance of studies that evaluate these aspects also in pets, helping the understanding of pathogenesis and resulting in proposing therapeutic protocols most effective for glaucoma patients.

Key words: Uveitis, pathogenesis, helicobacteria, *H. pylori*

Revisão Bibliográfica

O aparelho da visão nos animais domésticos é bastante complexo e delicado, formado pelo bulbo ocular e seus anexos. O bulbo pode ser dividido em túnicas fibrosa (córnea e esclera), vascular (iris, corpo ciliar e coroide) e nervosa (retina). Os anexos oculares têm a função de proteção do bulbo e são compostos pela órbita ocular, fáscia orbital, músculos e gordura extraoculares, pálpebras e conjuntiva (SLATTER, 2005; LAUS, 2009). Internamente, o bulbo ocular é dividido em câmaras preenchidas por meios transparentes denominados humor aquoso e humor vítreo. Estes possuem a função de transmissão e refração do raio luminoso sobre a retina e também da manutenção da pressão interna do globo, mantendo-o distendido (LAUS, 2009).

O humor aquoso é produzido pelo corpo ciliar e liberado na câmara posterior, sendo responsável pelo suporte trófico e remoção de metabólitos da córnea e da lente. Tem aspecto incolor e baixa viscosidade, principalmente pela alta concentração de água e baixo teor proteico. Este humor atinge a câmara anterior através da pupila e é drenado pelo ângulo iridocorneal e pela via úveoescleral (via não convencional) para atingir a circulação sanguínea, mantendo a pressão intraocular (PIO) em níveis fisiologicamente aceitáveis (SLATTER, 2005; LAUS, 2009).

O humor vítreo é composto por 99% de água e 1% de colágeno e ácido hialurônico, conferindo consistência gelatinosa e aspecto límpido. Essa substância contém apenas pequena quantidade de células semelhantes a histiócitos, conhecidas como hialócitos, e alguns fibroblastos. O vítreo é responsável principalmente pela manutenção da forma do globo ocular e auxilia na manutenção da retina em sua posição normal (MCGAVIN;

ZACHARY, 2009). O mecanismo de produção e renovação do humor vítreo não está completamente elucidado, sendo formado pela secreção das células não neuronais da retina e do epitélio não pigmentado do corpo ciliar. Apesar do número reduzido de enfermidades que acometem diretamente o humor vítreo, esta estrutura pode promover a difusão de mediadores inflamatórios uveais ou retinianos, assim como participar da patogênese do glaucoma (WILCOCK, 2009).

Distúrbios que comprometam o equilíbrio entre a produção e a drenagem do humor aquoso podem resultar em variações da PIO. Em virtude da falta de evidências de condições patológicas que promovam o aumento da produção de humor aquoso, frequentemente o aumento da PIO é atribuído a distúrbios de drenagem que podem resultar em glaucoma nos cães (TINSLEY; BETTS, 1993; SLATTER, 2005).

O glaucoma apresenta aproximadamente 0,5% de incidência nos cães e é uma das principais causas de cegueira, dor ocular e indicação de cirurgias para enucleação (MARTINS; VICENTI; LAUS, 2006; STROM et al., 2011a; OLBERTZ; PERLMANN; MONTIANI-FERREIRA, 2012). Com base em estudos em humanos, a definição de glaucoma se tornou mais ampla, não levando somente em consideração o aumento da PIO, mas também as manifestações por vias vasculares, citotóxicas e neurais compreendendo a Síndrome Glaucomatosa. O processo resulta na perda progressiva da sensibilidade e função, seguido da morte das células ganglionares da retina, da perda de axônios do nervo óptico, escavação da cabeça do nervo óptico, redução progressiva dos campos visuais e perda da visão. O aumento da PIO frequentemente está associado, tomando-se um fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia óptica (MARTINS; VICENTI; LAUS, 2006).

Os glaucomas caninos são classificados de acordo com a causa (congenito, primário ou secundário), aspecto do ângulo de drenagem (aberto, estreito ou fechado) e estágio da doença (agudo ou crônico) (GELATT, 2007). Os glaucomas congênitos estão relacionados a anormalidades graves do ângulo iridocorneal e ocorrem muito precocemente (antes de um ano de vida). As formas primárias não estão associadas a alterações oculares prévias, no entanto algumas raças são predispostas ao desenvolvimento desta condição (STROM et al., 2011a).

Os glaucomas secundários são duas ou três vezes mais frequentes que os primários e resultam de outras doenças intraoculares pré-existentes ou concorrentes que causem obstrução física da drenagem do humor aquoso (MARTINS; VICENTI; LAUS, 2006; STROM et al., 2011b). Usualmente são condições unilaterais não-hereditárias, porém as doenças que iniciaram seu desenvolvimento podem apresentar predisposição genética em algumas raças, como catarata e luxação do cristalino (GELATT; BROOKS, 1999). Entre as principais causas estão a luxação do cristalino, traumas, cirurgias intraoculares, hifema, neoplasias intraoculares e uveítes com etiologias diversas (GELATT; MACKAY, 2004; STROM et al., 2011b; OLBERTZ; PERLMANN; MONTIANI-FERREIRA, 2012). Segundo estudo de Strom et al. (2011b), as principais raças caninas que apresentaram predisposição ao desenvolvimento do glaucoma secundário foram Cairn Terrier, Jack Russell Terrier e Cocker Spaniel.

Nos cães, a uveíte é a causa principal dos glaucomas secundários devido à obstrução do ângulo de drenagem com fibrina, restos celulares, células inflamatórias e sanguíneas (GIONFRIDDO, 1995). As uveítes com etiologias diversas apresentam prevalências que variam entre os estudos, sendo identificadas em 44,9%, 23% e 7,1% dos casos estudados (JOHNSEN; MAGGS; KASS, 2006; STROM et al., 2011b; GELATT; MACKAY, 2004). Os processos infecciosos destacam-se na etiologia da uveíte canina e podem ser causadas por

microrganismos dos gêneros *Borrelia*, *Brucella*, *Leptospira*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Paramyxovirus*, entre outros (LAUS, 2009).

Em humanos, as uveítes lideram as causas de grave perda visual na população mais jovem resultando em alta morbidade e prejuízo socioeconômico (SUTTORP-SCHULTEN; ROTHOVA, 1996). As infecções do trato digestório por bactérias dos gêneros *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Chlamydia* foram sugeridas como desencadeadoras de uveítes agudas, através da constante liberação de material antigênico na circulação por lesões intestinais e estimulação persistente de reação imune em órgãos como o olho (OTASEVIC et al., 2005). Além dessas bactérias, o gênero *Helicobacter* tem atraído a atenção dos oftalmologistas, pois potencialmente a *H. pylori* atua na patogênese de problemas oculares (KOUNTOURAS et al., 2001). Os olhos e anexos oculares podem ser acometidos por lesões que acarretam blefarite, conjuntivite crônica, calázio, ceratite, coriorretinopatia central, uveíte e glaucoma (IZZOTTI et al., 2009; SACCÀ et al., 2006). Recentemente, estudos em humanos demonstraram a possível associação deste agente a diversas manifestações externas ao trato digestório em doenças cardiovasculares, neurológicas, metabólicas, hepatobiliares e hematológicas, além das desordens oftalmológicas (FIGURA et al., 2010; SUZUKI et al., 2011; BANIC et al., 2012).

O gênero *Helicobacter* é composto por bactérias Gram negativas, espiraladas ou em forma de "S", flageladas, algumas com fibrilas periplasmáticas e produtoras de urease, descritas pela primeira vez em 1893 e taxonomicamente classificadas em 1989 (HERMANNNS et al., 1995; OWEN, 1998; NEIGER; SIMPSON, 2000). Essas bactérias são encontradas especialmente no estômago de humanos, cães, gatos, furões, suínos, macacos (HERMANNNS et al., 1995), entre outros. Em contraste com as outras Gram negativas que colonizam a mucosa intestinal, essas bactérias possuem predileção pela mucosa gástrica (OTASEVIC, et al. 2005). A espécie *H. pylori* é considerada a principal causa de úlceras

pépticas, gastrite, tumores gástricos e linfoma gástrico primário em humanos. Em cães e gatos são descritas outras espécies que colonizam o sistema digestório como *H. felis*, *H. canis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. pylori*, *H. bilis* e *H. pametensis* (NEIGER; SIMPSON, 2000).

O glaucoma é a segunda causa mundial de cegueira nos humanos, e a principal causa de lesões irreversíveis no bulbo ocular, porém diversos aspectos etiológicos e da patogenicidade são desconhecidos (IZZOTTI et al., 2009). A frequência elevada da infecção gástrica por *H. pylori* entre pacientes glaucomatosos na Grécia foi evidenciada através da identificação histológica do agente na mucosa gástrica dos avaliados. O estudo não indicou uma relação causal entre o agente etiológico e a afecção ocular, indicando a necessidade de novas pesquisas. Os autores sugerem que a infecção por *H. pylori* pode aumentar a incidência ou a gravidade dos glaucomas pela liberação de substâncias vasoativas e pró-inflamatórias (citocinas, eicosanóides, proteínas de fase aguda), assim como a ativação e agregação plaquetária, estimulação de células inflamatórias mononucleares e produção de radicais livres (KOUNTOURAS et al., 2001).

Estudos em seres humanos demonstraram elevada frequência de infecção gástrica por *H. pylori* em pacientes glaucomatosos (KOUNTOURAS et al., 2001, 2002; HONG et al., 2007). Adicionalmente, quando os pacientes foram tratados para erradicar a bactéria, ocorreu redução da PIO e melhora da visão (KOUNTOURAS et al., 2002). Entretanto, em um estudo com amostras de soro a frequência de soropositividade para *H. pylori* em pacientes com glaucoma não foi significativa em relação ao grupo controle (pacientes sem glaucoma) (GALLOWAY et al., 2003). É provável que as diferenças entre os resultados decorra do tamanho das amostras e dos métodos utilizados para detecção do agente (histopatologia de biópsias gástricas e método de ELISA).

Em outro estudo, quando anticorpos (IgG) específicos para *H. pylori* do humor aquoso foram analisados, constatou-se elevação significativa em pacientes com glaucoma. A concentração sérica também foi maior nesses indivíduos. Além disso, as alterações da cabeça do nervo óptico ao exame oftalmológico foram associadas à elevação significativa da concentração de anticorpos anti-*H. pylori* no humor aquoso (KOUNTOURAS et al., 2003). Em estudo posterior, também mensurando a IgG específica para a *H. pylori* no humor aquoso de pacientes glaucomatosos, não foi demonstrada a relação da infecção com o glaucoma de ângulo aberto primário. Porém, houve elevada concentração de anticorpos no humor aquoso de pacientes com o glaucoma pseudoexfoliativo (RAZEGHINEJAD et al., 2006).

Em pacientes glaucomatosos com PIO normal, a análise sorológica indicou maior prevalência de infectados entre os acometidos do que entre os indivíduos sem alterações oculares do grupo controle. Sugere-se que a infecção por *H. pylori* pode estar associada com o aumento dos riscos de desenvolvimento desta afecção ocular, assim como a bactéria pode participar no desenvolvimento ou progressão do glaucoma (KIM et al., 2011; SUZUKI et al., 2011).

Recentemente, em um estudo com o objetivo de avaliar a relação de *H. pylori* na patogenia dos glaucomas primários realizou-se biópsia durante o tratamento cirúrgico com a trabeculectomia, sendo identificada a bactéria no trabeculado e na íris dos pacientes. Esse achado indica que a bactéria está presente nos tecidos oculares e possivelmente está ligada de forma direta aos danos causados pelo glaucoma (ZAVOS et al., 2012).

Na tentativa de elucidação da patogenia do *H. pylori* no glaucoma, diversos autores propuseram teorias sobre os mecanismos que resultam na neuropatia associada ao glaucoma. No estômago, um dos fatores mais característicos da bactéria é a produção de urease, capaz de catalisar a ureia e

propiciar um meio alcalino (MARSHALL et al., 1987). O *H. pylori* pode se aderir à mucosa gástrica, favorecendo a penetração de produtos antigênicos nas células, dificultando sua eliminação e resultando em resposta imune persistente (STABILE; SMITH; WEEKS, 2005). Assim, o mais provável é que os mecanismos fundamentais da patogênese do *H. pylori* nas doenças extragástricas estejam diretamente relacionados ao efeito bacteriano direto, além dos sinais sistêmicos causados pela liberação dos mediadores pró-inflamatórios e pela reação cruzada entre a bactéria e os antígenos do hospedeiro (GASBARRINI et al., 2004; IZZOTTI et al., 2009).

O globo ocular possui diversos substratos com função antioxidante que protegem as células e evitam a morte pelo estresse oxidativo (IZZOTTI et al., 2009). No humor aquoso o ácido ascórbico está presente em altas concentrações (SACCÀ et al., 2007; HANASHIMA; NAMIKI, 1999; GUAQUIL; VERA; GOLDE, 2001), assim como a glutatona (RICHER; ROSE, 1998). Na malha trabecular é possível identificar as enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase, além de superóxido dismutase e catalase, responsáveis por proteger os tecidos oculares quando as concentrações de H_2O_2 estão elevadas (IZZOTTI et al., 2009). O trabeculado também é fundamental para a hidrodinâmica do humor aquoso, pois o aumento da PIO representa o principal fator de risco para a neuropatia glaucomatosa (SOMMER et al., 1991).

A elevação da pressão pode acarretar morte direta das células ganglionares retinianas pelo bloqueio do fluxo axoplasmático e remoção de fatores neurotróficos, como *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ou *nerve growth factor* (NGF). Ocorre hipóxia dos tecidos e lesão por reperfusão, assim como a produção exacerbada de radicais livres e óxido nítrico que podem acentuar a morte das células retinianas e interferir com a função da malha trabecular, agravando o aumento da PIO. Em condições normais a permeabilidade da malha

trabecular é influenciada pelo efeito vasoconstritor da endotelina-1 e balanceado pelo efeito dilatador do óxido nítrico (HAEFLIGER et al., 1999). Com a presença de radicais livres no paciente glaucomatoso, o óxido nítrico gera produtos tóxicos agravando a condição metabólica do trabeculado, alterando sua função e motilidade (TAMM; LUTJEN, 1998).

Um importante elemento para a morte celular e comprometimento das células do trabeculado é a toxicidade gerada pelo glutamato. Este elemento é um neurotransmissor responsável pela transmissão sináptica, no entanto com o glaucoma, os radicais livres aumentam as concentrações de glutamato extracelular, que ativa os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), influxo de ions cálcio, produção de óxido nítrico, ativação de caspases e fatores de transcrição resultando em apoptose e morte celular retiniana (IZZOTTI et al., 2009).

A patogenia do glaucoma pela infecção por *H. pylori* poderia resultar da agregação leucocitária e plaquetária. Além disso, a infecção favoreceria a liberação de substâncias vasoativas e elementos pró-inflamatórios como as citocinas (interleucinas 1, 6, 8, 10, 12, fator de necrose tumoral- α e interferon- γ), eicosanoides (leucotrienos e prostaglandinas) e proteínas de fase aguda (fibrinogênio e proteína C-reativa) (KOUNTOURAS; ZAVOS; CHATZOPOULOS, 2004). Adicionalmente, poderia haver a estimulação de células mononucleares para a indução de fatores teciduais de conversão do fibrinogênio, complementando o desenvolvimento de reação cruzada entre antígenos endoteliais e de *H. pylori* e a intensa indução de estresse oxidativo com a circulação de peróxidos lipídicos (IZZOTTI et al., 2009). O aumento de endotelina-1 pode causar intensa vasoconstrição dos vasos do nervo óptico, assim como o óxido nítrico induz à toxicidade. Adicionalmente, o óxido nítrico atuando como potente neurotoxina, promove a morte celular. Esses eventos influenciam no processo de apoptose, acarretando a indução ou progressão da neuropatia glaucomatosa associada a *H. pylori* (ITZHAKI et al., 2004; KOUNTOURAS; ZAVOS;

CHATZOPOULOS, 2004; FARSHAD; JAPONI; ALBORZI, 2009; ZAVOS et al., 2012).

Além disso, anticorpos séricos específicos para *H. pylori* são encontrados em grande quantidade, podendo atingir o tecido nervoso pela quebra da barreira hemato-encefálica e causar a morte celular de células retinianas contribuindo para as lesões glaucomatosas. Essa quebra tem sido associada aos mediadores inflamatórios e pelo estresse oxidativo induzidos pela infecção (KOUNTOURAS, 2009). Aparentemente, os mesmos mecanismos podem ser implicados na quebra da barreira hemato-aquosa (ZAVOS et al., 2012). Adicionalmente, a citotoxina VacA induzida pela bactéria apresenta atividade quimiotática para mastócitos provenientes da medula óssea. Estes, após a estimulação do hormônio estimulador da corticotropina, liberam histamina e outros elementos pró-inflamatórios e vasoativos que facilitam a ruptura das barreiras hemato-encefálica e aquosa (KOUNTOURAS, 2009). Há o influxo de monócitos possivelmente infectados com *H. pylori* e também de anticorpos pelas barreiras comprometidas, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento e progressão do glaucoma (KOUNTOURAS et al., 2003; WANG; WU; LEI, 2009).

Em cães, não foram realizados estudos que correlacionem a origem dos glaucomas ou uveítes secundárias com bactérias do gênero *Helicobacter*, assim como auxiliem na compreensão dos eventos patológicos nessas oftalmopatias. Considerando que a uveíte com causa desconhecida nos cães é muito frequente (GELATT; MACKAY, 2004) e que há associação entre bactérias do gênero *Helicobacter* e esta condição em humanos, evidencia-se a importância de estudos que avaliem estes aspectos em animais de companhia.

As espécies que reconhecidamente foram descritas na mucosa gástrica de cães são *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii* (HANNINEN et al., 1996; JALAVA et al., 1997; NEIGER; SIMPSON, 2000), e mais recentemente

H. cynogastricus (VAN DEN BULCK et al., 2006). Em camundongos, *H. felis* causa inflamação gástrica crônica que gradualmente progride para tumores gástricos, estabelecendo um modelo de estudo para as doenças gástricas induzidas pela *H. pylori* em humanos (CUI et al., 2004).

Inversamente a todo o conhecimento da patogenia da infecção por *H. pylori* em humanos, os estudos sobre esses mecanismos nas infecções por espécies não-*H. pylori* em cães são escassos, apesar das evidências de que 67 a 100% dos cães possuem ao menos uma espécie de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica (NEIGER; SIMPSON, 2000). A positividade para *Helicobacter* spp. no estômago de cães saudáveis estudados em diferentes países variou entre 83% a 96% com o exame de histopatologia (YAMASAKI; SUEMATSU; TAKAHASHI, 1998; VAN DEN BULCK et al., 2005; MOUTINHO et al., 2007).

As espécies *H. felis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis* foram encontradas colonizando o estômago de cães, gatos e com menor frequência os humanos (VAN DEN BULCK et al., 2005). As diferentes espécies de *Helicobacter* que infectam a mucosa gástrica dos cães podem ocorrer de forma isolada ou com infecções mistas (VAN DEN BULCK et al., 2005). Recentemente, um estudo com cães com histórico de vômitos e cães assintomáticos mostrou a presença de *H. bizzozeronii* (37%) e *H. salomonis* (37%) como agente infeccioso único ou em associação com *H. heilmannii* e/ou *H. felis*. Neste estudo, 28 amostras foram positivas para o gênero *Helicobacter*, mas negativas para as espécies testadas, indicando que outras espécies poderiam infectar a mucosa gástrica dos animais testados (TAKEMURA et al., 2012). Em outros estudos, *H. bizzozeronii* também havia sido identificada como a espécie mais prevalente em cães e a espécie *H. felis* havia sido mais frequente (CATTOLI et al., 1999; VAN DEN BULCK et al., 2005; CAMARGO et al., 2002). Após a inoculação experimental de *H. pylori* em cães observou-se inflamação na mucosa gástrica (RANDIN et al.,

1990), no entanto em cães naturalmente infectados essa espécie não foi encontrada (CAMARGO et al., 2002; CATTOLI et al., 1999; EATON et al., 1996; TAKEMURA et al., 2012). Considerando o contato próximo entre os cães e os humanos, os dados da literatura indicam que os animais de companhia não atuam como fonte de infecção de *H. pylori* (TAKEMURA et al., 2012).

No entanto, a relação entre a presença das helicobactérias em cães e as manifestações clínicas ainda não estão definidas, pois as mesmas são encontradas tanto em animais hígidos quanto naqueles com algum distúrbio gastrointestinal. O modo de transmissão dessa bactéria ainda é incerto, porém são indicadas as possibilidades fecal-oral e oral-oral (TAKEMURA, 2007). Um estudo demonstrou a prevalência de 71,1% de DNA da bactéria na cavidade oral de uma população canina na Itália (RECORDATI et al., 2007).

O potencial zoonótico e a importância dos animais como reservatórios naturais não estão bem esclarecidos (TAKEMURA, 2007), porém de acordo com os resultados de De Groote et al. (2005) e Van den Bulck et al. (2005) o contato com cães pode ser considerado um fator de risco para os humanos quanto à infecção por *Helicobacter* não-*pylori*.

Em animais, o diagnóstico histopatológico é uma ferramenta importante e frequentemente utilizada no diagnóstico e na prevenção do glaucoma. A avaliação de um globo ocular enucleado pode auxiliar na confirmação do diagnóstico para o controle da condição e determinar o prognóstico para o olho remanescente. As alterações usualmente observadas à microscopia são o adelgaçamento da córnea, esclera e coroide devido à buftalmia, perda da continuidade da membrana de Descemet, edema de córnea, atrofia de toda a úvea, morte de células ganglionares e atrofia da retina, além de escavação do nervo óptico (OLBERTZ; PERLMANN; MONTIANI-FERREIRA, 2012).

Muito embora avanços nas cirurgias venham

aumentando as perspectivas no manejo do glaucoma, a terapia médica mantém-se como componente importante no controle da síndrome glaucomatosa (RIBEIRO; MARTINS; LAUS, 2007). A maioria das substâncias preconizadas foi concebida para diminuir a PIO. São classificadas, segundo seu mecanismo de ação, em agentes capazes de reduzir a produção do humor aquoso (agonistas adrenérgicos e inibidores da anidrase carbônica), agentes que aumentam a drenagem do humor aquoso (agentes colinérgicos e análogos das prostaglandinas) e aqueles que atuam nas duas situações da dinâmica desse fluido ocular (antagonistas adrenérgicos) (RIBEIRO; MARTINS; LAUS, 2007; WILLIS, 2004).

Especificamente nos glaucomas secundários à uveíte, alguns fármacos são contraindicados devido aos potenciais efeitos colaterais nesta condição. A pilocarpina provoca quebra da barreira hemato-aquosa elevando os níveis de proteína do humor aquoso (WILLIS, 2004) e os análogos das prostaglandinas devido à elevada presença das prostaglandinas no humor aquoso nestes quadros (RIBEIRO; MARTINS; LAUS, 2007).

Atualmente, o tratamento do glaucoma canino abrange apenas o controle da PIO, reduzindo a dor do paciente e controlando a perda visual. Progressivamente a função visual tende a piorar, pois não há nenhuma substância capaz de impedir a apoptose retiniana (RIBEIRO; MARTINS; LAUS, 2007). Esta condição torna o glaucoma uma afecção com prognóstico reservado em longo prazo, acarretando desconforto e perda visual importante, reforçando a necessidade de conhecimento dos mecanismos e dos agentes etiológicos envolvidos nos quadros secundários à uveíte.

Considerações Finais

Este trabalho tem como objetivo propor a hipótese de que os cães possam sofrer com a patogênese da infecção crônica pelas diversas espécies de *Helicobacter*, e assim como os humanos,

apresentar síndromes oftalmológicas induzidas pela infecção por helicobactérias. Conclui-se assim, que o desenvolvimento de pesquisas será fundamental para o entendimento da patogenia das infecções por *Helicobacter* em animais, a determinação das espécies envolvidas e os sinais apresentados, bem como poderá contribuir para o estabelecimento de modelos experimentais para as doenças oftalmológicas em seres humanos. Comprovando-se essa hipótese, novas pesquisas poderão culminar na proposição de protocolos terapêuticos mais eficazes para os pacientes com glaucoma, principalmente atuando de forma direta nos potenciais agentes etiológicos envolvidos e estabelecendo medidas profiláticas adequadas, resultando em menor morbidade e custos para o proprietário.

Referências

- BANIC, M.; FRANCESCHI, F.; BABIC, Z.; GASBARRINI, A. Extragastic manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, New Jersey, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2012.
- CAMARGO, P. L.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ALFIERI, A. A.; HAGIWARA, M. K. H. *Helicobacter* spp. in dogs and cats from South Brazil. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 27., 2002, Tunis. *Proceedings...* Tunis: [s.n], 2002. p. 255.
- CATTOLI, G.; VAN VUGT, R.; ZANONI, R. G.; SANGUINETTI, V.; CHIOCCETTI, R.; GUALTIERI, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; GAASTRA, W.; KUSTERS, J. G. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. *Veterinary Microbiology*, Oxford, v. 70, n. 3-4, p. 239-250, 1999.
- CUI, G.; KOH, T. J.; CHEN, D.; ZHAO, C. M.; TAKAISHI, S.; DOCKRAY, G. J.; VARRO, A.; ROGERS, A. B.; FOX, J. G.; WANG, T. C. Over expression of glycine-extended gastrin inhibits parietal cell loss and atrophy in the mouse stomach. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 64, n. 22, p. 8160-8166, 2004.
- DE GROOTE, D.; VAN DOORN, L. J.; VAN DEN BULCK, K.; BANADME, P.; VIETH, M.; STOLTE, M.; DEBONGNIE, J. C.; BURETTE, A.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Detection of non-*pylori* *Helicobacter* species in "*Helicobacter heilmannii*"-infected humans. *Helicobacter*, New Jersey, v. 10, n. 5, p. 398-406, 2005.
- EATON, K. A.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B. E.; PAOLA, J.; SHERDING, R. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 12, p. 3165-3170, 1996.
- FARSHAD, S.; JAPONI, A.; ALBORZI, A. *Helicobacter pylori* and extradigestive disorders in the past 10 years. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, Dubai, v. 11, n. 2, p. 123-132, 2009.
- FIGURA, N.; FRANCESCHI, F.; SANTUCCI, A.; BERNARDINI, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. Extragastic manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, New Jersey, v. 15, n. 1, p. 60-68, 2010.
- GALLOWAY, P. H.; WARNER, S. J.; MORSHED, M. G.; MIKELBERG, F. S. *Helicobacter pylori* infection and the risk for open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, Rochester, v. 110, n. 5, p. 922-925, 2003.
- GASBARRINI, A.; CARLONI, E.; GASBARRINI, G.; CHISHOLM, S. A. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases – other *Helicobacters*. *Helicobacter*, New Jersey, v. 9, n. 1, p. 57-66, 2004.
- GELATT, K. *Veterinary ophthalmology*. 4. ed. Philadelphia: Lea&Febiger, 2007. 1696 p.
- GELATT, K. N.; BROOKS, D. E. The canine glaucomas. In: GELATT, K.N. *Veterinary ophthalmology*. 3. ed. Malvern: Lea&Febiger, 1999. p. 701-754.
- GELATT, K. N.; MACKAY, E. O. *Veterinary Microbiology*, Oxford, v. 75, n. 4, p. 245-259, 2004.
- GIONFRIDDO, J. R. Recognizing and managing acute and chronic cases of glaucoma. *Veterinary Medicine*, Ohio, v. 90, p. 265-275, 1995.
- GUAIQUIL, V. H.; VERA, J. C.; GOLDE, D. W. Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 276, n. 44, p. 40955-40961, 2001.
- HAEFLIGER, I. O.; DETTMANN, E.; LIU, R.; MEYER, P.; PRÜNTE, C.; MESSERLI, J.; FLAMMER, J. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, Plymouth, v. 43, n. 1, p. S51-S58, 1999.
- HANASHIMA, C.; NAMIKI, H. Reduced viability of vascular endothelial cells by high concentration of ascorbic acid in vitreous humor. *Cell Biology International*, Aberdeen, v. 23, n. 4, p. 287-298, 1999.

- HANNINEN, M. L.; HAPPONEN, I.; SAARI, S.; JALAVA, K. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, London, v. 46, n. 3, p. 160-166, 1996.
- HERMANN, W.; KREGEL, K.; BREUER, W.; LECHNER, J. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology*, Bristol, v. 112, n. 3, p. 307-318, 1995.
- HONG, Y.; ZHANG, C.; DUAN, L.; WANG, W. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and open angle glaucoma in China. *Asian Journal of Ophthalmology*, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 205-208, 2007.
- ITZHAKI, R. F.; WOZNIAK, M. A.; APPELT, D. M.; BALIN, B. J. Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, Rochester, v. 25, n. 5, p. 619-627, 2004.
- IZZOTTI, A.; SACCA, S. C.; BAGNIS, A.; RECUPERO, S. M. Glaucoma and *Helicobacter pylori* infection. Correlations and Controversies. *British Journal of Ophthalmology*, London, v. 93, n. 11, p. 1420-1427, 2009.
- JALAVA, K.; KAARTINEN, M.; UTRIAINEN, M.; HAPPONEN, I.; HANNINEN, M. L. *Helicobacter salomonis* sp. nov.; a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis*, and *Helicobacter bizzozeronii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, London, v. 47, n. 4, p. 975-982, 1997.
- JOHNSEN, D. A. J.; MAGGS, D. J.; KASS, P. H. Evaluation of risk factors for development of secondary glaucoma in dogs: 156 cases (1999-2004). *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 229, p. 1270-1274, 2006.
- KIM, J. M.; KIM, S. H.; PARK, K. H.; HAN, S. Y.; SHIM, H. S. Investigation of the association between *Helicobacter pylori* infection and normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 2, p. 665-668, 2011.
- KOUNTOURAS, J. *Helicobacter pylori*: an intruder involved in conspiring glaucomatous neuropathy. *British Journal of Ophthalmology*, London, v. 93, n. 11, p. 1413-1415, nov. 2009.
- KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; BOURA, P.; BESSAS, C.; CHATZOPOULOS, D.; VENIZELOS, J.; ZAVOS, C. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and glaucoma. *Ophthalmology*, Rochester, v. 108, n. 3, p. 599-604, 2001.
- KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C.; BOURA, P.; KONSTAS, A. G.; VENIZELOS, J. Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of chronic open-angle glaucoma. *Archives of Internal Medicine*, Chicago, v. 162, n. 11, p. 1237-1244, 2002.
- KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C.; BOURA, P.; KONSTAS, A. G.; VENIZELOS, J. Increased levels of *Helicobacter pylori* IgG antibodies in aqueous humor of patients with primary open-angle and exfoliation glaucoma. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, New York, v. 241, n. 11, p. 884-890, 2003.
- KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C.; CHATZOPOULOS, D. Primary open-angle glaucoma: pathophysiology and treatment. *Lancet*, London, v. 364, n. 9442, p. 1311-1312, 2004.
- LAUS, J. L. *Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009. 248 p.
- MARSHALL, B. J.; BARRET, L.; PRAKASH, C.; MCCALLUM, R. W.; GUER RANT, R. L. Survival of *Campylobacter pylori* associated gastritis and peptic ulcer disease at acid pH. *Gastroenterology*, Michigan, v. 92, p. 1517, 1987.
- MARTINS, B. C.; VICENTI, F. A. M.; LAUS, J. L. Síndrome glaucomatosa em cães – parte 1. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1952-1958, nov./dez. 2006.
- MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Olhos, pálpebras, conjuntiva e órbita. In: *Bases da patologia veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 1349-1413.
- MOUTINHO, F. Q.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M. J.; SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L. Prevalência de helicobactérias e alterações na mucosa gástrica de cães saudáveis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 1080-1083, 2007.
- NEIGER, R.; SIMPSON, K. W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Malden, v. 14, n. 2, p. 125-133, 2000.
- OLBERTZ, L.; PERLMANN, E.; MONTIANI-FERREIRA, F. Achados histopatológicos do glaucoma em cães e gatos. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v. 99, p. 66-76, 2012.
- OTASEVIC, L.; WALDUCK, A.; MEYER, T. F.; AEBISCHER, T.; HARTMANN, C.; ORLIC, N.; PLEYER, U. *Helicobacter pylori* infection in anterior uveitis. *Infection*, Heidelberg, v. 33, n. 2, p. 82-85, 2005.
- OWEN, R. J. *Helicobacter*-species classifications and identification. *British Medical Bulletin*, Oxford, v. 54, n. 1, p. 17-30, 1998.

- RANDIN, M. J.; EATON, K. A.; KRAKOWKA, S.; MORGAN, D. R.; LEE, A.; OTTO, G.; FOX, J. *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic Beagle dogs. *Infection and Immunity*, Washington, v. 58, n. 8, p. 2606-2612, 1990.
- RAZEGHINEJAD, M. R.; KAMALI-SARVESTANI, E.; FARVARDIN, M.; POURHABIBI, A. Aqueous levels of anti-*Helicobacter pylori* IgG antibody in patients with primary open-angle pseudoexfoliation glaucoma. *Iran Journal of Immunology*, Shiraz, v. 3, n. 2, p. 86-90, 2006.
- RECORDATI, C.; GUALDI, V.; TOSI, S.; FACCHINI, R. V.; PENGO, G.; LUINI, M.; SIMPSON, K. W.; SCANZIANI, E. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. *Veterinary Microbiology*, Oxford, v. 119, p. 346-351, 2007.
- RIBEIRO, A. P.; MARTINS, B. C.; LAUS, J. L. Síndrome glaucomatosa em cães – parte 2. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1828-1835, 2007.
- RICHER, S. P.; ROSE, R. C. Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humour interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision Research*, Manchester, v. 38, n. 19, p. 1849-1853, 1998.
- SACCÀ, S. C.; IZZOTTI, A.; ROSSI, P.; TRAVERSO, C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Experimental Eye Research*, Philadelphia, v. 84, p. 389-399, 2007.
- SACCÀ, S. C.; PASCOTTO, A.; VENTURINO, G. M.; PRIGIONE, G.; MASTROMARINO, A.; BALDI, F.; BILARDI, C.; SAVARINO, V.; BRUSATI, C.; REBORA, A. Prevalence and treatment of *Helicobacter pylori* in patients with blepharitis. *Ophthalmology Visual Science*, Rockville, v. 47, n. 2, p. 501-508, 2006.
- SLATTER, D. *Fundamentos de oftalmologia veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- SOMMER, A.; TIELSCH, J. M.; KATZ, J.; QUIGLEY, H. A.; GOTTSCH, J. D.; JAVITT, J.; SINGH, K. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore eye survey. *Archives of Ophthalmology*, Chicago, v. 109, n. 8, p. 1090-1095, 1991.
- STABILE, B. E.; SMITH, B. R.; WEEKS, D. L. *Helicobacter pylori* infection and surgical disease – part I. *Current Problems in Surgery*, Philadelphia, v. 42, n. 11, p. 756-789, 2005.
- STROM, A. R.; HÄSSIG, M.; IBURG, T. M.; SPIESS, B. M. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009. Part 1: congenital and primary glaucoma (4 and 123 cases). *Veterinary Ophthalmology*, Malden, v. 14, n. 2, p. 121-126, 2011a.
- _____. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009. Part 2: secondary glaucoma (217 cases). *Veterinary Ophthalmology*, Malden, v. 14, n. 2, p. 127-132, 2011b.
- SUTTROP-SCHULTEN, M. S.; ROTHOVA, A. The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. *British Journal of Ophthalmology*, London, v. 80, p. 844-848, 1996.
- SUZUKI, H.; FRANCESCHI, F.; NISHIZAWA, T.; GASBARRINI, A. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, New Jersey, v. 16, n. 1, p. 65-69, 2011.
- TAKEMURA, L. S. *Helicobacter* spp. gástrico em cães e gatos: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular. 2007. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- TAKEMURA, L. S.; LOT, R.; CAMARGO, P. L.; SILVA, E.; ALFIERI, A. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. *Helicobacter* spp. infection in dogs is not associated with changes in epithelial proliferation or E-cadherin expression in gastric mucosa. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, p. 3211-3222, 2012. Supplement 2.
- TAMM, E. R.; LUTJEN, D. E. Nitric oxide in the outflow pathways of the aqueous humour. In: *Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma*. New York: Lippincott-Raven, 1998. p. 158-167.
- TINSLEY, D. M.; BETTS, D. M. Glaucoma: past and present management techniques. *Iowa State University Veterinary Medicine*, v. 55, n. 1, p. 36-45, 1993.
- VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGNIE, J. C.; BURETTE, A.; STOLTE, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples of humans, dogs and cats. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, n. 5, p. 2256-2260, 2005.
- VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; VANDAMME, P.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, London, v. 56, n. 7, p. 1559-1564, 2006.
- WANG, Y. H.; WU, J. J.; LEI, H. Y. When *Helicobacter pylori* invades and replicates in the cells. *Autophagy*, Michigan, v. 5, n. 4, p. 540-542, 2009.
- WILCOCK, B. P. Olhos, pálpebras, conjuntiva e órbita. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. *Bases da patologia veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 1349-1413.

- WILLIS, D. A. Ocular hypotensive drugs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 34, n. 3, p. 755-776, 2004.
- YAMASAKI, K.; SUEMATSU, H.; TAKAHASHI, T. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *Journal of American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 212, n. 4, p. 529-533, 1998.
- ZAVOS, C.; KOUNTOURAS, J.; SAKKIAS, G.; VENIZELOS, I.; DERETZI, G.; ARAPOGLOU, S. Histological presence of *Helicobacter pylori* bacteria in the trabeculum and iris of patients with primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Research*, New York, v. 47, n. 3, p. 150-156, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar bactérias dos gêneros *Helicobacter* e *Leptospira* nos fluidos e tecidos oculares de caninos com glaucoma e neoplasias oculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a biologia molecular para identificar as bactérias dos gêneros *Helicobacter* e *Leptospira* nos olhos e nas neoplasias oculares;
- Caracterizar as lesões histopatológicas relacionadas a bactérias dos gêneros *Helicobacter* e *Leptospira*;
- Realizar o diagnóstico sorológico de *Leptospira* nos cães com glaucoma e neoplasias oculares;
- Verificar a relação estatística dos agentes etiológicos com os glaucomas e neoplasias oculares em cães;
- Realizar o levantamento dos diagnósticos do Laboratório de Patologia Veterinária da UEL referentes às enfermidades oftalmológicas em caninos no período de 30 anos;
- Avaliar a prevalência das enfermidades oculares e os registros dos cães que tiveram amostras enviadas ao Laboratório de Patologia Veterinária da UEL.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

DETECÇÃO DE *Leptospira* spp. E *Helicobacter* spp. EM CÃES COM GLAUCOMA E NEOPLASIAS OCULARES.

RESUMO

As infecções oculares podem estar associadas a doenças sistêmicas, podendo causar principalmente uveíte e glaucoma. Nos cães, a uveíte é a causa principal dos glaucomas secundários e pode resultar de diversas etiologias bacterianas, como a infecção por *Leptospira interrogans*. Nos cães o método diagnóstico mais utilizado é a sorotaglutinação microscópica (SAM). Nos humanos as bactérias do trato digestório também podem ser desencadeadoras de oftalmopatias, e o gênero *Helicobacter*, potencialmente, pode acarretar uveíte, glaucoma e tumores. Não foram encontrados estudos avaliando esta condição em cães, tornando a elucidação dos mecanismos de atuação dos agentes infecciosos essenciais para a condução, tratamento e prevenção das doenças oculares. O objetivo deste estudo foi demonstrar a presença do DNA de bactérias dos gêneros *Helicobacter* e *Leptospira* nos fluidos oculares e tumores de caninos e determinar a significância estatística com glaucomas secundários e neoplasias oculares. Foram estudados 16 cães com glaucomas secundários e 18 cães com neoplasias oculares, que tiveram amostras colhidas para a realização de PCR para *Helicobacter* spp. e *Leptospira* spp., SAM e histopatologia. Na PCR dos pacientes glaucomatosos foram detectados dois positivos para *Helicobacter* e nove animais positivos para *Leptospira*. Nos tumores foram detectados três amostras positivas para *Leptospira*. A PCR para *Leptospira* apresentou diferença significativa para os glaucomas ($P=0,01940$). Foram observados nove animais sororreagentes na SAM e neste exame houve a significância entre o sexo masculino e a positividade ($P=0,02914$). Nos diagnósticos histopatológicos dos cães com glaucoma a pan-oftalmite foi o resultado mais frequente, enquanto nos cães com tumores a maior prevalência foi de adenomas/epiteliomas. Os agentes etiológicos estudados foram identificados nas afecções oculares e podem estar relacionados à patogênese destas enfermidades em cães.

Palavras-chave: Leptospirose. Helicobactérias. PCR. SAM. Histopatologia. Olho.

DETECTION OF *Leptospira* spp. and *Helicobacter* spp. IN DOGS WITH GLAUCOMA AND OCULAR TUMORS.

ABSTRACT

Eye infections may be associated to systemic diseases, mainly causing uveitis and glaucoma. Uveitis is the leading cause of secondary glaucoma in dogs caused by several bacteria, and may result for several bacterial etiology such as *Leptospira interrogans*. The main diagnostic method in dogs is the microscopic agglutination test (MAT). In humans, the bacteria of the digestive tract may also be triggering of eye diseases, and the *Helicobacter pylori* acts potentially causing uveitis, glaucoma and tumors. However in dogs have been no studies evaluating this condition. The elucidation of the role of infectious agents may aid in the diagnosis, treatment and prevention of ocular diseases. The objective of this study was to demonstrate the presence of *Helicobacter* DNA and *Leptospira* DNA in ocular fluids and tissues to determine the association with secondary glaucoma and ocular tumors. The samples from 16 dogs with secondary glaucoma and 18 with ocular tumors were tested with PCR for *Helicobacter* spp. e *Leptospira* spp., SAM and histopathology. The PCR of glaucomatous patients detected two positive animals for *Helicobacter* and nine for *Leptospira*. In tumors were detected three positive samples for *Leptospira*. The *Leptospira* PCR was significantly associated to glaucoma ($P = 0,01940$). Nine animals were seropositive in SAM and there was association between male and positivity ($P = 0,02914$). Panophthalmitis was the most frequent diagnosis in glaucomatous dogs, while the most frequent tumors were adenomas/epiteliomas. The etiologic agents studied were detected in ocular diseases and could cause the pathogenesis of these diseases in dogs.

Key words: Leptospirosis. Helicobacteria. PCR. MAT. Histopathology. Eye.

INTRODUÇÃO

O sistema ocular nos animais domésticos é bastante complexo e delicado, sendo formado pelo bulbo ocular e seus anexos. Os diferentes tecidos e compartimentos do bulbo ocular atuam como barreiras protetoras separando as camadas mais internas do meio exterior, impedindo o acesso de microrganismos e fármacos (LAUS, 2009). No entanto, agentes etiológicos podem acessar o tecido uveal por via hematológica, lesões penetrantes, humor aquoso ou humor vítreo (WILCOCK, 2009). Nos cães, a uveíte é a causa principal dos glaucomas secundários devido à obstrução do ângulo de drenagem com fibrina, restos celulares, células inflamatórias e sanguíneas (GIONFRIDDO, 1995). Os processos infecciosos destacam-se na etiologia da uveíte e podem ser causadas por microrganismos dos gêneros *Leptospira*, *Borrelia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Paramyxovirus*, entre outros (LAUS, 2009).

A bactéria *Leptospira interrogans* acarreta a leptospirose, que nos cães apresenta a forma aguda com lesões hepáticas, renais e sepse (SESSIONS; GREENE, 2004). Os sinais oculares são caracterizados pela vasculite na fase aguda, ocasionando uveíte associada à intensa hiperemia conjuntival e congestão episcleral (DZIEZYK, 2000; McDONOUGH, 2001), resultando em lesões na retina e glaucoma secundário. O método diagnóstico mais utilizado é a prova de soroglutinação microscópica (SAM), porém esta metodologia pode apresentar falhas devido à títulos reduzidos a alguns sorovares ou induzidos pela vacinação (TOWNSEND; STILES; KROHNE, 2006).

Nos equinos, a leptospirose é amplamente estudada, pois a uveíte recorrente equina causada pela bactéria é a principal causa de cegueira e significantes perdas econômicas (GILGER; MICHAU, 2004). O diagnóstico nesta espécie, além da SAM, pode ocorrer com a identificação da bactéria em fluidos oculares pela cultura, PCR e histopatologia. (WOLLANKE, 2004).

Em humanos, as uveítes lideram as causas de grave perda visual na população mais jovem resultando em alta morbidade e prejuízo socioeconômico (SUTTROP-SCHULTEN; ROTHOVA, 1996). As infecções do trato digestório por bactérias dos gêneros *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Chlamydia* foram sugeridas como desencadeadoras de uveítes agudas, por meio da constante liberação de material antigênico na circulação e estimulação persistente de reação imune em órgãos como o olho (OTASEVIC et al., 2005). Além dessas bactérias, a *Helicobacter pylori*, potencialmente, atua na patogênese de enfermidade oculares acarretando blefarite, conjuntivite crônica, calázio, ceratite,

coriorretinopatia central, uveíte e principalmente glaucoma secundário (KOUNTOURAS et al., 2001, 2002, 2003; RAZEGHINEJAD et al., 2006; SACCÀ et al., 2006; HONG et al., 2007; IZZOTTI et al., 2009; KIM et al., 2011; SUZUKI et al., 2011). Em relação aos tumores oculares, a estimulação antigênica crônica pela infecção por *H. pylori* no estômago, pode ser a causa do desenvolvimento de processos proliferativos de linfócitos T em outros órgãos, como o linfoma de mucosas em tecidos perioculares (CHAN et al., 2006) e o desenvolvimento do linfoma conjuntival em humanos (LEE; YANG; KIM, 2008; VELÁZQUEZ; PEIX; GÓMEZ-ALONSO, 2011). No entanto a patogenia não foi completamente elucidada e há diversas teorias sobre o processo (ZACARIAS JUNIOR et al., 2014).

Contrariamente a toda investigação acerca da patogenicidade da infecção por *H. pylori* em humanos, não foram encontrados estudos sobre os mecanismos nas infecções oculares por *Helicobacter* não-*pylori* em cães, apesar de aproximadamente 100% dos cães saudáveis apresentarem ao menos uma espécie de helicobactéria no estômago (YAMASAKI; SUEMATSU; TAKAHASHI, 1998; NEIGER; SIMPSON, 2000; VAN DEN BULCK et al., 2005; MOUTINHO et al., 2007). Considerando que a uveíte com causa desconhecida nos cães é muito frequente (GELATT; MACKAY, 2004), assim como os tumores, a elucidação dos mecanismos de atuação dos agentes infecciosos na inflamação e oncogênese podem favorecer a condução, tratamento e prevenção de algumas doenças oculares. Com o estudo desses processos, o uso de antibióticos específicos e vacinas poderá ser incorporado à terapia das afecções oftalmológicas.

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença do DNA de bactérias do gênero *Helicobacter* e *Leptospira* nos fluidos e tecidos oculares de caninos com glaucomas secundários e neoplasias oculares, assim como avaliar a significância estatística com os glaucomas secundários e neoplasias oculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos Animais

No período de outubro de 2011 a abril de 2014, os cães apresentando alterações oftalmológicas foram atendidos no Ambulatório de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte do Paraná e no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram submetidos a prévio exame clínico e avaliação oftalmológica para a caracterização dos glaucomas, das neoplasias e descartar

outras doenças oculares. Foram selecionados para este estudo 16 cães com glaucomas secundários graves, unilaterais e irreversíveis, que posteriormente foram encaminhados para o tratamento cirúrgico de enucleação, assim como 18 cães com tumores oculares que foram encaminhados para excisão cirúrgica para diagnóstico e tratamento. Todos os animais tiveram amostras colhidas para a detecção de bactérias dos gêneros *Leptospira* e *Helicobacter*. Nos pacientes com a suspeita clínica de infecção por outros agentes etiológicos ou alterações sistêmicas, foram realizados os exames complementares pertinentes. Foram excluídos do estudo os animais com doenças infecciosas concomitantes ou indeterminadas por outros agentes etiológicos, os pacientes que não apresentavam condições clínicas para a realização da anestesia, os cães com glaucoma secundário após trauma ou com glaucomas primários ou congênitos.

Quanto à idade, os cães foram agrupados em três grandes grupos: filhotes (menos de um ano), adultos (de um a nove anos) e idosos (dez anos ou mais), de acordo com faixas etárias estabelecidas em outro estudo (FIGHERA et al. 2008).

A pesquisa foi aprovada pelas Comissões de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina e da Universidade Estadual do Norte do Paraná.

Amostras

Os olhos enucleados foram submetidos a colheitas de material e armazenamento para processamento posterior. Foi realizada a aquocentese na câmara anterior com seringa de 1 mL e agulha 26G, e a amostra foi alíquotada e congelada a -20°C para processamento posterior. A vitreocentese foi realizada com seringa de 1 mL e agulha 22G, e a amostra também foi alíquotada e congelada a -20°C para processamento posterior. As amostras dos fluidos oculares não foram coletadas nos animais que apresentavam condições que impediram o procedimento, como o conteúdo caseoso nas câmaras oculares, luxação do cristalino com comprometimento das câmaras ou mesmo perfurações traumáticas devido ao glaucoma.

PCR

A técnica de extração do DNA das amostras dos bulbos oculares e dos tumores foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Purelink Genomic DNA Mini-Kit, Invitrogen® Life Technologies, USA). Todas as amostras foram testadas pela

nested-PCR para detecção do gene 16S RNAr de *Leptospira* spp. de acordo com Mérien et al. (1992) utilizando como controle positivo alíquotas do sorovar de referência Canicola, assim como foram testadas pela PCR para detecção do gene 16S RNAr de *Helicobacter* spp. de acordo com Riley et al. (1996) utilizando como controle positivo uma amostra de *Helicobacter* spp. conhecida. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota de água ultrapura estéril. Os produtos obtidos na PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio a 0,3% e visualizados sob luz ultravioleta.

Sorologia

Para a SAM foi realizada a coleta de 5 mL de sangue de cada animal por venopunção da jugular, em tubos à vácuo, estéreis e sem anticoagulante. Após a formação do coágulo, o soro foi obtido por meio do processo de centrifugação à 4 G durante 5 minutos e armazenado à -20°C até o momento das análises. Os soros foram processados no Laboratório de Leptospirose e Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Universidade Estadual de Londrina-UEL. O diagnóstico foi realizado pela SAM com 22 sorovares de *Leptospira interrogans* (Australis, Bratislava, Autumnalis, Fortbragg, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi e Sentot). Foram consideradas sororreagentes as amostras que apresentaram pelo menos 50% das leptospiros aglutinadas e obtiveram titulação igual ou superior a 100 (FAINE et al., 1999).

Histopatologia

Os bulbos oculares e os tumores foram dissecados e os fragmentos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%. A dissecação do bulbo ocular ocorreu com a abertura e coleta de fragmento das porções uveais, córnea e esclera. As amostras foram então submetidas à desidratação em soluções crescentes de álcoois, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para a caracterização das lesões histológicas. Fragmentos do bulbo ocular e dos tumores foram congelados a -20°C para as análises moleculares.

Análise estatística

Os cães foram divididos em grupos dos animais glaucomatosos e com neoplasias oculares. Esses grupos foram comparados entre si e com o gênero, resultados do PCR e da SAM pelo Qui-quadrado e Teste Exato de Fischer, com 5% como nível de significância, pelo pacote estatístico OpenEpi 3.5.2. (DEAN; SULLIVAN, 2008).

RESULTADOS

Nos 16 pacientes glaucomatosos estudados foram realizados 35 exames de PCR, correspondendo a 10 amostras de humor aquoso, 9 de humor vítreo e 16 de tecido do bulbo ocular. Nesses animais foi detectado o DNA de *Helicobacter* spp. no humor aquoso e tecido ocular de um cão e no vítreo de outro. Neste último houve a combinação na detecção de agentes com a evidenciação de DNA de *Leptospira* no humor aquoso. Em relação à PCR para *Leptospira*, foi detectado o DNA bacteriano em um animal nos humores aquoso e vítreo concomitantemente, em cinco somente no humor aquoso e em três exclusivamente no tecido ocular.

Nos 18 cães com neoplasias oculares foram realizados 22 exames de PCR, com duas amostras de humor aquoso, duas de vítreo e 18 dos tecidos acometidos. As amostras dos fluidos oculares foram coletadas dos pacientes com tumores bulbares e que necessitaram do procedimento de enucleação terapêutica. Em três cães foi detectado DNA de *Leptospira* nos tecidos neoplásicos, sendo em um tumor palpebral (adenoma meibomiano) e em dois bulbares (melanoma e hemangioma) (TABELA 1).

Tabela 1 – Detecção do DNA bacteriano pela PCR em amostras de fluidos e tecidos oculares em pacientes caninos com glaucoma secundário (n=16) e tumores oculares (n=18). Londrina, 2015.

Grupos	Humor Aquoso		Humor Vítreo		Tecido Ocular		Total Animais Positivos
	Testados	Positivos	Testados	Positivos	Testados	Positivos	
Glaucomas	10		9		16		
DNA <i>Helicobacter</i> spp.	-	1	-	1	-	1	2
DNA <i>Leptospira</i> spp.	-	6	-	1	-	3	9
Tumores oculares	2		2		18		
DNA <i>Helicobacter</i> spp.	-	0	-	0	-	0	0
DNA <i>Leptospira</i> spp.	-	0	-	0	-	3	3
TOTAL	12	7	11	2	34	7	14

A proporção de positivos para *Leptospira* na PCR apresentou diferença significativa em cães com glaucoma ($P=0,01940$), no entanto o mesmo não ocorreu com a presença de tumores, sexo dos animais ou com os resultados da SAM. A PCR para *Helicobacter* spp. não apresentou significância estatística com qualquer variável estudada.

Dos 34 cães deste estudo, foram coletadas amostras de soro no momento do procedimento cirúrgico em 9 cães com glaucoma e em 14 cães com tumores para a realização da soroglutinação microscópica (SAM). Os animais sororreagentes totalizaram nove, sendo três pacientes com glaucoma e seis com neoplasias. Os resultados quanto aos sorovares observados estão apresentados na Tabela 2. Na análise estatística não foi observada significância entre a SAM e a presença dos glaucomas ou dos tumores. Dos animais sororreagentes, sete eram machos e apresentaram diferença estatística entre o sexo masculino e a positividade na SAM ($P=0,02914$).

Tabela 2 - Distribuição da frequência dos sorovares de *Leptospira* spp. em nove cães sororreagentes na SAM com glaucoma (G) ou neoplasias oculares (T) de acordo com a titulação das aglutininas. Londrina, 2015.

Sorovares	Identificação do animal									TOTAL
	G1	G2	G3	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Bratislava	-	-	-	-	-	-	100	-	-	1
Butembo	-	-	-	-	-	-	-	-	400	1
Canicola	-	-	-	100	100	-	800	1600	-	4
Grippotyphosa	-	100	100	-	-	-	-	-	-	2
Copenhageni	-	100	-	-	100	100	-	-	-	3
Panama	100	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Pomona	-	-	-	200	-	-	-	-	-	2
Pyrogenes	-	-	-	100	400	-	100	1600	-	4
TOTAL	1	2	1	3	3	1	3	2	1	

Observação: Todos os animais sororreagentes tiveram amostras testadas pela PCR de *Leptospira* spp., porém somente os cães G2 e T5 tiveram a detecção do DNA bacteriano nas amostras de fluidos e tecidos oculares.

Dos 16 cães glaucomatosos, todos apresentavam lesões unilaterais com a necessidade de enucleação de somente um bulbo ocular. Os pacientes apresentavam algumas variações quanto ao diagnóstico histopatológico, porém as alterações observadas foram compatíveis com glaucoma secundário e pan-oftalmite, sem a possibilidade de diferenciar entre os agentes etiológicos. Foi possível caracterizar o adelgaçamento da córnea, esclera e coroide, além da perda da continuidade da membrana de Descemet, indicando a presença de buftalmia. Todos os animais apresentaram graus variados de alterações corneanas com edema, infiltrado inflamatório, hiperplasia epitelial, pigmentação no epitélio e estroma, neovascularização, degeneração vacuolar e comprometimento das células do endotélio (epitélio interno) (FIGURA 1). As alterações uveais apresentaram-se como infiltrado inflamatório, hemorragia, hiperpigmentação, edema e necrose da íris e corpo ciliar (FIGURA 2).

Nos 18 cães com tumores, todas as amostras foram processadas e realizado o exame histopatológico e os diagnósticos foram adenomas/epiteliomas (6/18), seguidos por tumores endoteliais (5/18), tumores melanocíticos (2/18), outros tumores (3/18) e diagnósticos inconclusivos (2/18). Quanto ao local de acometimento tumoral, nove ocorreram nas pálpebras superior e inferior, cinco na terceira pálpebra, três eram bulbares e um orbital.

Nos animais com glaucoma houve o acometimento em sete (43,75%) machos e nove (56,25%) fêmeas, enquanto em relação à idade, ocorreram em 11 (68,75%) adultos e cinco (31,25%) idosos. Nos pacientes com tumores a apresentação quanto ao sexo

foi superior nos machos com 11 (61,11%) casos e sete (38,89%) fêmeas. A prevalência dos tumores foi de nove (50%) em cães adultos e nove (50%) nos idosos.

Figura 1 - Infiltrado inflamatório estromal na córnea de cão glaucomatoso e com detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR no bulbo ocular (H.E., objetiva de 10x).

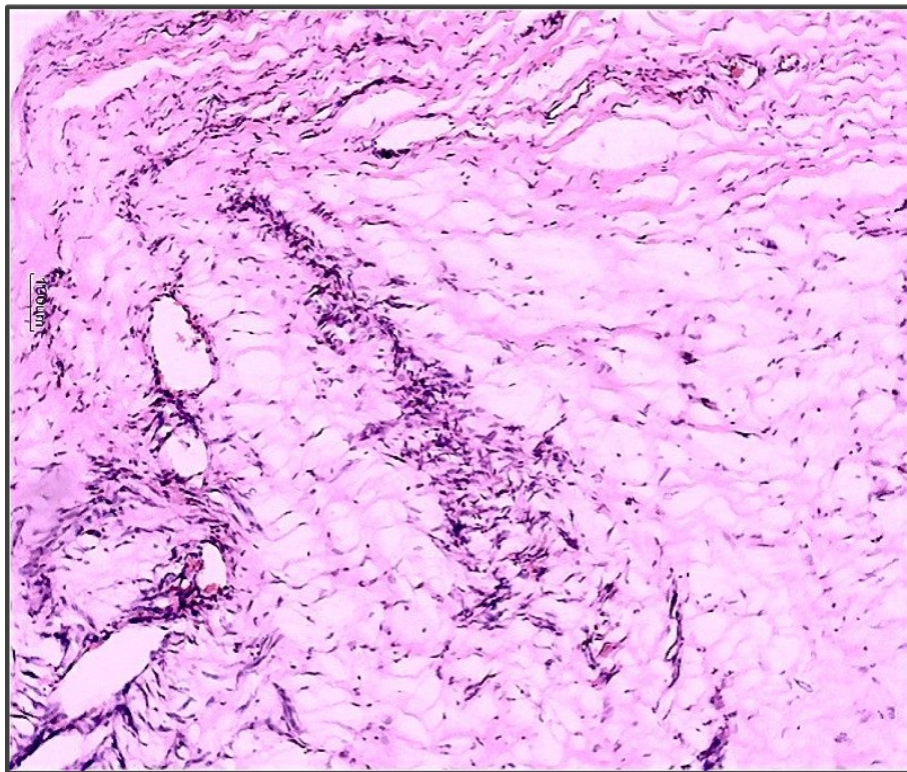
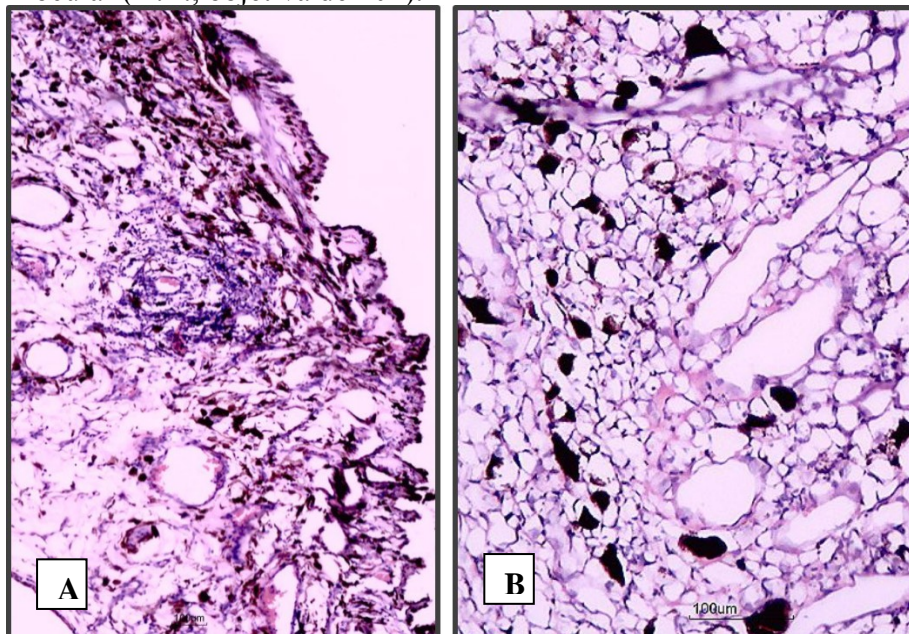


Figura 2 - A) Infiltrado inflamatório na íris de cão glaucomatoso e com detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR no bulbo ocular (H.E., 10x). B) Necrose no corpo ciliar de cão glaucomatoso e com detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR no bulbo ocular (H.E., objetiva de 20x).



DISCUSSÃO

Neste estudo dois animais com glaucoma apresentaram DNA de *Helicobacter* spp. nos fluidos e tecido ocular. Este gênero bacteriano tem atraído a atenção dos oftalmologistas humanos, pois potencialmente o *H. pylori* atua na patogênese de problemas oculares, além de manifestações externas ao trato digestório, em doenças cardiovasculares, neurológicas e hematológicas (KOUNTOURAS et al., 2001; FIGURA et al., 2010; SUZUKI et al., 2011; BANIC et al., 2012). O estudo realizado por Kim et al. (2011), sugere que o *H. pylori* esteja associado ao risco aumentado e ao desenvolvimento de glaucoma. Corroborando com essa teoria, um estudo identificou histologicamente a bactéria no trabeculado e na íris após a biópsia ocular em pacientes com glaucoma. Esse achado indica que a bactéria está presente nos tecidos oculares e possivelmente está ligada de forma direta aos danos causados pelo desenvolvimento do glaucoma (ZAVOS et al., 2012). De modo similar, neste estudo detectou-se o DNA da bactéria nos tecidos e fluidos oculares de cães. Apesar da infecção gástrica por helicobactérias ser frequente em cães (TAKEMURA, 2012), até o momento não foram encontrados dados na literatura sobre a presença da bactéria nos bulbos oculares caninos. Acredita-se que esse estudo seja o primeiro a detectar a *Helicobacter* spp. nos tecidos oculares de cães. Não houve significância estatística no resultado positivo da PCR para *Helicobacter* spp. com a ocorrência de glaucomas, tumores ou sexo dos animais. São necessários estudos com um número maior de pacientes, inclusive comparando os achados oculares com a microbiota da mucosa do trato digestório, local de tropismo deste gênero bacteriano.

Adicionalmente, em nove cães com glaucoma houve a detecção de DNA de *Leptospira* spp. pela biologia molecular, comprovando a presença do agente bacteriano no interior do bulbo ocular e sugerindo o envolvimento com os quadros oftalmológicos. Foi possível evidenciar que a SAM mostrou resultados divergentes no auxílio ao diagnóstico, provavelmente pelas limitações da técnica que são a subjetividade na realização e interpretação, além da variação da titulação devido ao momento da infecção e soroconversão. Deste modo, a biologia molecular mostrou-se um método sensível para a detecção do agente etiológico da leptospirose e na correlação com a doença oftalmológica neste estudo. No entanto, a PCR pode apresentar resultados insatisfatórios devido a não determinação do sorovar infectante, à impossibilidade de realização pelo pequeno volume de material colhido e a possibilidade do número reduzido de bactérias no momento da colheita. O limiar de

detecção pode variar de 10 a 100 leptospiras/mL para o resultado positivo (PICARDEAU, 2013).

O isolamento constitui o método definitivo para o diagnóstico de leptospirose, porém é comprometido pelo crescimento lento da bactéria (até 13 semanas) e as especificidades no estabelecimento do teste de rotina para os pacientes (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; GOLDSTEIN, 2010). No entanto, essa técnica não foi utilizada no presente estudo pelo reduzido volume dos fluidos coletados e a opção pela realização de outras provas diagnósticas.

O olho é considerado um órgão imunologicamente privilegiado, pois a busca por variados agentes etiológicos tem se mostrado insatisfatórias (FABER et al., 2000). Porém, após a infecção a *Leptospira* pode se replicar nos olhos e em outros órgãos como o fígado e os rins (GREENE; MILLER; BROWN, 1998). Sobre a patogênese da afecção, hipóteses foram propostas em estudos com a uveíte equina, espécie amplamente estudada, e que poderiam explicar o glaucoma secundário à uveíte canina. Uma teoria é que a bactéria tenha efeito direto sobre a úvea pela liberação de enzimas e toxinas, como LPS e hemolisina, causando ruptura das membranas celulares endoteliais (HINES, 2014 apud POLLE et al., 2014). Outra hipótese é que a presença da bactéria na úvea ative a resposta inflamatória e ocorra reação cruzada entre o agente etiológico e autoantígenos, resultando em doença autoimune (LUCCHESI; PARMA, 1999; VERMA et al., 2005).

No grupo dos cães com tumores foram obtidas três amostras positivas na PCR para *Leptospira* a partir do tecido neoplásico. Um dos pacientes apresentou um melanoma intraocular e SAM com titulação de 1600 para os sorovares Canicola e Pyrogenes. Neste paciente os resultados dos exames sugerem a leptospirose como infecção concomitante com a neoplasia. Este estudo comprovou que a bactéria pode ser encontrada nas câmaras e fluidos oculares durante a infecção, podendo ter infectado o tumor. Nos outros dois animais os tumores eram superficiais e com envolvimento conjuntival, podendo refletir a contaminação hematogênica na ocasião da leptospiremia. Neste estudo não foram encontrados dados que correlacionassem o agente infeccioso aos tumores oculares. A PCR para *Leptospira* não apresentou associação significativa à presença de tumores.

A SAM é o método para o diagnóstico da leptospirose mais utilizado e estima o título de anticorpos anti-leptospiras presentes no soro (VAN DE MAELE et al., 2008). Com a titulação elevada no teste acompanhada de alterações clínicas e laboratoriais, o diagnóstico de leptospirose é muito sugestivo, porém um exame com titulação baixa ou negativa é insuficiente para descartar a leptospirose nos estágios iniciais da doença (BURR;

LUNN; YAM, 2009). Da mesma forma, títulos baixos podem ser resultantes de infecção crônica, de exposição ao antígeno ou vacinação (VAN DE MAELE et al., 2008; SYKES et al., 2011). O número de animais sororreagentes foi maior no grupo dos tumores, porém não houve diferença estatística, corroborando com a falta de estudos que impliquem a bactéria como agente causal dessas afecções caninas. Provavelmente esta condição se justifique pela exposição prévia dos cães à *Leptospira* ou à vacinação, considerando que no momento do atendimento clínico os animais estavam em boas condições e o atendimento ocorreu pela busca do tratamento para as neoplasias oculares.

Não foram observadas estatisticamente a correlação do resultado positivo na SAM com os casos de glaucomas ou tumores oculares. No entanto, os machos apresentaram associação com a positividade no exame, assim como em outros estudos (AGUIAR et al., 2007; KIKUTI et al., 2012; LANGONI et al., 2013). De maneira geral os machos possuem acesso facilitado à rua e têm maiores chances de se infectarem, pois este hábito pode propiciar inúmeras possibilidades de infecção pelo contato direto ou indireto com animais acometidos ou pelo acesso à áreas alagadiças.

Embora o diagnóstico clínico dos glaucomas seja evidenciado pelo exame oftalmológico completo e com a mensuração da pressão intraocular (PIO), a origem do problema pode não ser elucidado na rotina clínica. Os exames histopatológicos podem definir se a doença é primária ou secundária (OLBERTZ; PERLMANN; MONTIANI-FERREIRA, 2012). No caso de glaucomas primários os quadros são bilaterais, tendendo à assimetria quanto aos sinais clínicos (WOERDT, 2001; WILKIE, 2008), enquanto os casos secundários são condições unilaterais não hereditárias por causas diversas (MARTINS; VICENTI; LAUS, 2006). No presente estudo, os animais estudados apresentavam glaucomas secundários unilaterais sem etiologia definida e com aparente preservação do bulbo ocular contralateral. É fundamental o estudo histopatológico do olho enucleado para o diagnóstico definitivo, inclusive de alterações sistêmicas causadas por doenças infecciosas ou tumores (GELATT; BROOKS, 1999).

Os resultados quanto à localização das neoplasias demonstram a maior prevalência dos tumores palpebrais em relação às demais localizações. Essa condição se justifica pela elevada frequência de tumores benignos na margem palpebral. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (WERNER et al., 1998; OLBERTZ, 2012; SILVA, 2013) e podem resultar da facilidade dos proprietários em reconhecer a alteração e procurar o serviço médico veterinário.

Nos tumores diagnosticados, os mais frequentes foram os adenomas e epitelomas que representam o acometimento das glândulas de Meibômio presentes na margem palpebral. Essas neoplasias são muito frequentes, representando de 44 a 70% dos tumores palpebrais caninos (ROBERTS; SEVERIN; LAVACH, 1986; PEIFFER, 2001; WILCOCK, 2007). Apesar das sutis diferenças, critérios objetivos para a diferenciação destes tumores não foram bem estabelecidos (LABELLE; LABELLE, 2013), levando alguns autores a sequer diferenciarem adenomas de epitelomas de Meibômio (WILCOCK, 2007). Outro grupo de neoplasias muito prevalentes foram as endoteliais representadas pelos hemangiomas e hemangiossarcomas. Ocorrem em epitélio não pigmentado na terceira pálpebra e conjuntiva bulbar, e podem ser tratados com a excisão cirúrgica. Podem estar associados à exposição à radiação ultravioleta e são mais frequentes em cães de raças que permanecem maior tempo ao sol por suas atividades (CONCEIÇÃO et al., 2010; DUBIELZIG, 2012b).

Nos cães estudados, não houve diferença estatística entre as idades dos animais acometidos pelo glaucoma secundário. Outros estudos indicam a maior ocorrência entre os adultos próximo aos sete anos de idade (GELATT; MACKAY, 2004; STROM et al., 2011). Todos os tumores oculares ocorreram em animais adultos ou idosos, corroborando com outra pesquisa. Segundo Dubielzig (2011a), os tumores apresentam uma distribuição etária típica, acometendo animais adultos e idosos, com média de 9,2 anos. Essa condição decorre provavelmente da maior prevalência da maioria dos tumores em animais nestas faixas etárias, com fatores predisponentes ou alterações concomitantes.

CONCLUSÕES

Foi demonstrada a presença do DNA de *Helicobacter* spp. em fluidos e tecidos oculares de pacientes glaucomatosos, além do DNA de *Leptospira* spp. em fluidos e tecidos oculares de cães com glaucoma e tumores. Esta foi a primeira detecção molecular do gênero *Helicobacter* em alterações oftalmológicas caninas, evento que pode favorecer novos estudos, inclusive nas enfermidades em humanos. A biologia molecular mostrou-se um método eficaz para a detecção de *Leptospira* spp. nos olhos e evidenciou a significância estatística entre o resultado positivo e os glaucomas. São necessários estudos adicionais para a completa compreensão da patogênese das infecções bacterianas oculares pelos agentes estudados.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa contou com recursos disponibilizados pela Fundação Araucária – Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. v.140, p.287-296, 2010.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia ocidental brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n.1, p.70-76, 2007.

BANIC, M.; FRANCESCHI, F.; BABIC, Z.; GASBARRINI, A. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v.17, n.1, p.49-55, 2012.

BURR, P.; LUNN, K.; YAM, P. Current perspectives on canine leptospirosis. **In Practice**. v.31, p.98-102, mar.2009.

CHAN, C.C.; SHEN, D.; MOCHIZUKI, M.; GONZALES, J.A.; HUNTER, K.L.; YUEN, H.K.; GUEX-CROSIER, Y.; LEHOANG, P. Detection of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* genes in primary orbital lymphoma. **Transactions of the American Ophthalmological Society**. v.104, p.62-70, 2006.

CONCEIÇÃO, L.F.; RIBEIRO, A.P.; PISO, D.Y.T.; LAUS, J. L. Considerations about ocular neoplasia of dogs and cats. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2235-2242, out.2010.

DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M. OpenEpi 3.5.2. Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, 2008. Disponível em: <<http://www.openepi.com/TwoByTwo/TwoByTwo.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

DUBIELZIG R.R. Tumors of the canine globe. Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, oct, 2011. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/193.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

DUBIELZIG R.R. 2011. Tumors of the canine conjunctiva, eyelids, and orbit. Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, oct, 2011.

Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/194.pdf>> Acesso em: 31 jul. 2014.

DZIEZYK, J. Canine systemic bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America**. v.30, p.1117-2000, 2000.

FABER, N.A.; CRAWFORD, M.; LEFEBVRE, R.; BUYUKMIHCI, N.C.; MADIGAN, J.E.; WILLITS, N.H. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.2731-2733, 2000.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2^a ed. Melbourne: Medisci, 1999. 272p.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, n.4, p.223-230, 2008.

FIGURA, N.; FRANCESCHI, F.; SANTUCCI, A.; BERNARDINI, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v.15, n.1, p.60-68, 2010.

GELATT, K.N.; BROOKS, D.E. The canine glaucomas. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Maryland:Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.701-754.

GELATT, K.N.; MACKAY, E.O. Secondary glaucomas in the dog in North America. **Veterinary Microbiology**, v.75, n.4, p.245-259, 2004.

GILGER, B.C.; MICHAU, T.M. Equine recurrent uveitis: new methods of management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v.20, p.417-427, 2004.

GIONFRIDDO, J. R. Recognizing and managing acute and chronic cases of glaucoma. **Veterinary Medicine**, v.90, p.265-275, 1995.

GOLDSTEIN, R.E.; Canine Leptospirosis. **Veterinary Clinical Small Animal**. v.40, p.1091-1101, 2010.

GREENE, C.E.; MILLER, M.A.; BROWN, C.A. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 2nd ed. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1998. p.273-281.

HINES, M. Leptospirosis. In: SELTON, D.C.; LONG, M.T. **Equine infectious diseases**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2014. p.305-311.

HONG, Y.; ZHANG, C.; DUAN, L.; WANG, W. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and open angle glaucoma in China. **Asian Journal of Ophthalmology**, v.9, n.5, p.205-208, 2007.

IZZOTTI, A.; SACCA, S.C.; BAGNIS, A. RECUPERO, S.M. Glaucoma and *Helicobacter pylori* infection: correlations and controversies. **British Journal of Ophthalmology**. v.93, n.11, p.1420-1427, nov. 2009.

KIM, J.M.; KIM, S.H.; PARK, K.H.; HAN, S.Y.; SHIM, H.S. Investigation of the association between *Helicobacter pylori* infection and normal tension glaucoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.52, n.2, p.665-668, 2011.

KIKUTI, M.; LANGONI, H.; NOBREGA, D.N.; CORRÊA, A.P.F.L.; ULLMANN, L.S. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.18, n.1, p.124-127, 2012.

KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; BOURA, P.; BESSAS, C.; CHATZOPOULOS, D.; VENIZELOS, J.; ZAVOS, C. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and glaucoma. **Ophthalmology**. v.108, p.599-604, 2001.

KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C.; BOURA, P.; KONSTAS, A.G.; VENIZELOS, J. Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of chronic open-angle glaucoma. **Archives of Internal Medicine**, v.162, n.11, p.1237-1244, 2002.

KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C.; BOURA, P.; KONSTAS, A.G.; VENIZELOS, J. Increased levels of *Helicobacter pylori* IgG antibodies in aqueous humor of patients with primary open-angle and exfoliation glaucoma. **Graefe Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.241, n.11, p.884-890, 2003.

LABELLE, A.L.; LABELLE, P. Canine ocular neoplasia: a review. **Veterinary Ophthalmology**. v.16, p.3-14, 2013.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; SEGISMUNDO, R.; LUCHEIS, S.B.; PAES, A.C. Variáveis epidemiológicas e alterações clínicas, hematológicas e urinárias em cães sororreagentes para *Leptospira* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.765-776, 2013.

LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2009. 248p.

LEE S.B; YANG, J.W., KIM, C.S. The association between conjunctival MALT linfoma and *Helicobacter pylori*. **British Journal of Ophthalmology**. v.92, p.534-536, 2008.

LUCCHESI, P.M.; PARMA, A.E. A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.173-179, 1999.

MCDONOUGH, P.L. Leptospirosis in dogs-current status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. International Veterinary Information Service (www. ivis. org), Ithaca, document, n. A0112, p. 0701, 2001.

MARTINS, B. C.; VICENTI, F. A. M.; LAUS, J. L. Síndrome glaucomatosa em cães – parte 1. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1952-1958, nov./dez. 2006.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.9, p. 2219-2224, 1992.

MILLER, P.E. Uvea. In: MAGGS, D.J.; MILLER, P.E.; OFRI, R. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2008. p.203-229.

MOUTINHO, F.Q.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M.J.; SUZANO, S.M.C.; SEQUEIRA, J.L. Prevalência de helicobactérias e alterações na mucosa gástrica de cães saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.1080-1083, 2007.

NEIGER, R.; SIMPSON, K.W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n.2, p.125-133, 2000.

OLBERTZ, L. Levantamento clínico-epidemiológico com análise morfológica das principais neoplasias oculares em cães. 136f. **Dissertação de Mestrado**. Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012

OLBERTZ, L.; PERLMANN, E.; MONTIANI-FERREIRA, F. Achados histopatológicos do glaucoma em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v.99, p.66-76, 2012.

OTASEVIC, L.; WALDUCK, A.; MEYER, T.F.; AEBISCHER, T.; HARTMANN, C.; ORLIC, N.; PLEYER, U. *Helicobacter pylori* infection in anterior uveitis. **Infection**, v.33, n.2, p.82-85, 2005.

PEIFFER JR R.L. Adnexal and ocular neoplasms. In: MOHR, U.; CARLTON, W.W.; DUNGWORTH, D.L.; BENJAMIN, S.A.; CAPEN, C.C.; HAHN, F.F. **Pathobiology of the Aging Dog**. Ames:Iowa State University Press, 2001. p.83-90.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v.43, p. 1-9, 2013.

POLLE, F.; STOREY, E.; EADES, S.; ALT, D.; HORNSBY, R.; ZUERNER, R.; CARTER, R. Role of intraocular leptospira infections in the pathogenesis of equine recurrent uveitis in the Southern United States. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p. 1300–1306, 2014.

RAZEGHINEJAD, M.R.; KAMALI-SARVESTANI, E.; FARVARDIN, M.; POURHABIBI, A. Aqueous levels of anti-*Helicobacter pylori* IgG antibody in patients with primary open-angle pseudoexfoliation glaucoma. **Iran Journal of Immunology**, v.3, n.2, p.86-90, 2006.

RILEY, L.K.; FRANKLIN, C.L.; HOOK JR., R.R.; BESCH-WILLIFORD, C. Identification of Murine Helicobacters by PCR and Restriction Enzyme Analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p. 942–946, 1996.

ROBERTS, S.M.; SEVERIN, G.A.; LAVACH, J.D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.189, p.1355-1359, 1986.

SACCÀ, S.C.; PASCOTTO, A.; VENTURINO, G.M.; PRIGIONE, G.; MASTROMARINO, A.; BALDI, F.; BILARDI, C.; SAVARINO, V.; BRUSATI, C.; REBORA, A. Prevalence and treatment of *Helicobacter pylori* in patients with blepharitis. **Ophthalmology Visual Science**. v.47, p.501-508, 2006.

SESSIONS, J.K.; GREENE, C.E. Canine leptospirosis: epidemiology, pathogenesis and diagnosis. **Compendium**. v.26, n.8, p.606-623, aug. 2004.

SILVA B.R.F.D. Neoplasias oculares em cães e gatos – Estudo retrospectivo 2001-2012. 93f. **Dissertação de Mestrado**. Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2013.

STROM, A.R.; HÄSSIG, M.; IBURG, T.M.; SPIESS, B.M. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009. Part 2: secondary glaucoma (217 cases). **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.2, p.127-132, 2011.

SUTTROP-SCHULTEN, M.S.; ROTHOVA, A. The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. **British Journal of Ophthalmology**, v.80, p.844-848, 1996.

SUZUKI, H.; FRANCESCHI, F.; NISHIZAWA, T.; GASBARRINI, A. Extragastic manifestations of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v.16, n.1, p.65-69, 2011.

SYKES, J.E.; HARTMANN, K.; LUNN, K.F.; MOORE, G.E.; STODDARD, R.A.; GOLDSTEIN, R.E. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.25, p.1-13, 2011.

TAKEMURA, L.S. Caracterização molecular de *Helicobacter* spp. em sistema hepatobiliar de cães e gatos com lesões hepáticas. 108f. **Tese de Doutorado**. Ciência Animal. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

TOWNSEND, W.M.; STILES, J.; KROHNE, S.G. Leptospirosis and panuveitis in a dog. **Veterinary Ophthalmology**. v.9, n.3, p.169-173, 2006.

TURNER, S.M. **Oftalmologia em Pequenos Animais. Série Clínica Veterinária na Prática**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 384p.

VAN DE MAELE, I.; CLAUS, A.; HAESBROUCK, F.; DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **The Veterinary Record**. v.163, p.409-413, oct. 2008.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGNIE, J. C.; BURETTE, A.; STOLTE, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples of humans, dogs and cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2256-2260, 2005.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; VANDAMME, P.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.7, p.1559-1564, 2006.

VELÁZQUEZ, E.; PEIX, A.; GOMÉZ-ALONSO, A. Microorganismos y câncer: evidencias científicas y nuevas hipótesis. **Cirurgía Española**. v.89, n.3, p.136-144, 2011.

VERMA, A.; ARTIUSHIN, S.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D.A.; TIMONEY, J.F. LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. **Infection and Immunity**, v.73, p.7259–7266, 2005.

VERMA, A.; MATSUNAGA, J.; ARTIUSHIN, S.; PINNE, M.; HOUWERS, D.J.; HAAKE, D.A.; STEVENSON, B.; TIMONEY, J.F. Antibodies to a novel leptospiral protein, LruC, in the eye fluids and sera of horses with leptospira-associated uveitis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.3, p.452-456, 2012.

WERNER, P.R.; CHIQUITO, M.; PACHALY, J.R.; FERREIRA, F.M. Neoplasias oculares diagnosticadas em animais do sul do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecia**, UNIPAR, v.1, p.13-21, 1998.

WILCOCK B.P. Eye and ear. In: MAXIE, M.G. **Pathology of Domestic Animal**. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2007. p.459-552.

WILCOCK, B.P. Olhos, pálpebras, conjuntiva e órbita. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.1349-1413.

WILKIE, D.A. Glaucoma. In: BICHARD, S.J; SHERDING, R.G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2008. p.1400-1406.

WOERDT, A.V.D. The treatment of acute glaucoma in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v.11, n.3, p.199-204, 2001.

WOLLANKE, B.; GERHARDS, H.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H. Etiology of equine recurrent uveitis (ERU): autoimmune disease or intraocular leptospiral infection? **Pferdeheilkunde**. v.20, p.327-340, 2004.

YAMASAKI, K.; SUEMATSU, H.; TAKAHASHI, T. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, n.4, p.529-533, 1998.

ZACARIAS JUNIOR, A.; SILVA-ZACARIAS, F.G.; CARDOSO, M.J.L.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Canine glaucoma and *Helicobacter* spp. infection: a possible relationship. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.4, p.1973-1983, 2014.

ZAVOS, C.; KOUNTOURAS, J.; SAKKIAS, G.; VENIZELOS, I.; DERETZI, G.; ARAPOGLOU, S. Histological presence of *Helicobacter pylori* bacteria in the trabeculum and iris of patients with primary open-angle glaucoma. **Ophthalmic Research**, v.47, n.3, p.150-156, 2012.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

LEVANTAMENTO HISTOPATOLÓGICO DE ENFERMIDADES OFTALMOLÓGICAS CANINAS EM UM HOSPITAL VETERINÁRIO ESCOLA (1985-2014)

HISTOPATHOLOGICAL SURVEY OF CANINE OPHTHALMOLOGICAL DISEASES IN A VETERINARY TEACHING HOSPITAL (1985-2014)

RESUMO

O aparelho da visão nos animais domésticos é formado pelo bulbo ocular e seus anexos. Todos os tecidos oculares estão sujeitos à ocorrência enfermidades ou neoplasias causando perda ou redução da função visual, desconforto, destruição dos tecidos ou metástases. Embora os tumores oculares apresentem baixa prevalência em cães, podem acarretar sérias complicações na ausência do diagnóstico preciso e terapêutica adequada. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência das alterações oculares e os dados gerais dos cães com amostras oculares processadas de um Hospital Veterinário Escola no período de janeiro de 1985 a dezembro de 2014. Foram realizados 30.957 exames, sendo 18.083 provenientes da espécie canina em diversos tecidos. Desses, 139 (0,77%) corresponderam a exames histopatológicos resultantes de biópsias de enfermidades oftalmológicas. Os diagnósticos mais frequentes foram os processos inflamatórios, adenomas/epiteliomas, carcinomas, tumores melanocíticos e processos hiperplásicos. A análise dos dados de registros de um centro de referência auxilia no entendimento da rotina das atividades, assim como favorece a compreensão do comportamento biológico de algumas neoplasias.

Palavras-chave: Oftalmopatias, histopatologia, cães, olho

ABSTRACT

The ocular system in domestic animals is composed of the eyeball and ocular adnexal. All ocular tissues can develop diseases or tumors causing loss or reduction of visual function, discomfort, tissue destruction or metastasis. Although ocular tumors have low prevalence in dogs, can cause serious complications in the absence of accurate diagnosis and appropriate therapy. The aim of this study was to evaluate the prevalence of ocular diseases and the general data of dogs with ocular processed samples in a Veterinary Teaching Hospital

from January 1985 to December 2014. During this period, 30,957 clinical reports were reviewed, 18,083 from the tissues of canine species. 139 (0.77%) accounted for histopathological samples derived from biopsies of eye diseases. Inflammatory processes, adenomas/epiteliomas, carcinomas, melanocytic tumors and hyperplastic processes were the most common diagnoses. The analysis of the data records of a reference center supports the understanding of laboratory routine, and promotes comprehension of the biological behavior of some tumors.

Key-words: Ophthalmopathies, histopathology, dogs, eye

INTRODUÇÃO

O aparelho da visão nos animais domésticos é bastante complexo e delicado, formado pelo bulbo ocular e seus anexos. O bulbo pode ser dividido em túnicas fibrosa (córnea e esclera), vascular (íris, corpo ciliar e coroide) e nervosa (retina). Os anexos oculares têm a função de proteção do bulbo e são compostos pela órbita ocular, fásia orbital, músculos e gordura extraoculares, pálpebras e conjuntiva (MAGGS; MILLER; OFRI, 2008). Todos os tecidos oculares estão sujeitos à ocorrência de neoplasias (WILLIS; WILKIE, 2001) e estas podem causar perda ou redução da função visual, desconforto, destruição dos tecidos ou metástases. O dano nas estruturas e função do bulbo ocular, assim como as opções terapêuticas e prognóstico variam com a localização anatômica da neoplasia (LABELLE; LABELLE, 2013).

Embora os tumores oculares sejam raros, com prevalência de apenas 0,87% em cães, acredita-se que a real frequência seja maior, pois os tumores presumidamente benignos não são histologicamente avaliados (MILLER; DUBIELZIG, 2007). No entanto, mesmo as neoformações benignas são localmente invasivas, acarretando sérias complicações como cegueira ou perda do olho. Estas podem mimetizar doenças inflamatórias, reforçando a importância do diagnóstico preciso (WILLIS; WILKIE, 2001; MILLER; DUBIELZIG, 2007; GOULD, 2010). A correta conduta diagnóstica e terapêutica pode variar com a localização anatômica, tipo de tumor, espécie acometida, idade do paciente e forma primária ou metastática (WILLIS; WILKIE, 2001; LASCELLES; DAVIDSON, 2012).

Segundo um estudo de Dubielzig (2011), das neoplasias oculares caninas primárias, 47% afetam o bulbo ocular, 25,3% comprometem a conjuntiva, 23,1% ocorrem nas pálpebras e 4,6% na órbita. Não foi observada correlação com o sexo do paciente em nenhuma neoplasia estudada. A maioria dos tumores apresentou distribuição etária típica, acometendo cães de meia-idade e idosos, com média de 9,2 anos (DUBIELZIG, 2011). Em

outra pesquisa realizada no estado do Paraná, as neoplasias oculares caninas representaram 1,86% (18/970) dos exames histopatológicos realizados no período de 22 anos. Na avaliação dessas neofomações, 55,56% (10/18) foram consideradas malignas e 44,44% (8/18) benignas. Nas amostras de tumores malignos, o sítio mais acometido foi o bulbo ocular (60%), seguido pelas neoplasias palpebrais (30%) e conjuntivais (10%) (WERNER et al., 1998).

Dados no Brasil sobre a ocorrência de neoplasias oculares abrangendo longos períodos de avaliação são escassos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de alterações oculares e os dados gerais dos cães com amostras oculares processadas no laboratório de um hospital veterinário escola em um período de 30 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo retrospectivo descritivo com a análise dos arquivos de resultados de exames em cães encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) referentes ao período de janeiro de 1985 a dezembro de 2014. Fizeram parte do estudo apenas as amostras relacionadas às alterações oftalmológicas. Não foram consideradas as procedências das amostras, uma vez que o laboratório recebe pedidos de exames provenientes da própria rotina hospitalar e também de clínicas veterinárias do município e da região. Em todos os casos, foram considerados os diagnósticos morfológicos que constavam nos resultados e estes não foram revisados. As frequências de processos neoplásicos e não neoplásicos também foram determinadas. Para fins comparativos, também foi avaliado o total de exames realizados em todas as espécies animais no laboratório dentro do período.

As informações quanto à localização das alterações oculares e o sexo dos animais foram extraídas dos registros dos arquivos. Conforme a localização, as alterações oftalmológicas foram divididas em anexos oculares (pálpebras e terceira pálpebra), bulbares, orbitais (periocular e adjacências) e indeterminados (não constavam nos registros).

RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 1985 a dezembro de 2014 foram realizados 30.957 exames citopatológicos e histopatológicos em diversas espécies animais. Desses, 18.083 (58,41%) exames foram provenientes da espécie canina em diversos tecidos, sendo

139 (0,77%) exames histopatológicos resultantes de biópsias de enfermidades oftalmológicas na espécie canina. Em virtude do amplo período estudado e das particularidades quanto à localização das enfermidades e dos diagnósticos obtidos, as coletas de dados e análises foram divididas em Período 1 (1985-1994), Período 2 (1995-2004) e Período 3 (2005-2014).

Das 139 amostras enviadas para o exame histopatológico em todo o período do levantamento, 120 apresentaram diferentes diagnósticos, com 77 (55,40%) classificados como processos neoplásicos e 43 (30,94%) como não neoplásicos, além de 19 (13,66%) amostras que tiveram os resultados considerados inconclusivos ou não estavam registrados nos arquivos. Nas amostras caracterizadas como neoplasias, 40 (51,95%) eram malignas e 37 (48,05%) benignas. Apesar da elevada prevalência de tumores, os diagnósticos mais frequentes foram os processos inflamatórios (22,30%), seguido por adenomas/epiteliomas (15,83%), carcinomas (12,95%), tumores melanocíticos (9,35%) e processos hiperplásicos (8,63%) (Quadro 1).

Quanto à descrição do local de acometimento oftalmológico para o envio das amostras, 90 (64,75%) ocorreram nos anexos oculares, sendo 55 (39,57%) nas pálpebras e 35 (25,18%) na terceira pálpebra, enquanto 42 (30,22%) eram bulbares, 6 (4,32%) orbitais e em 1 (0,72%) amostra não havia a descrição da região (Quadro 2). Nos registros analisados, 43,17% (60/139) dos cães eram machos, 51,80% (72/139) fêmeas e em 5,03% (7/139) dos registros o sexo não foi informado.

DISCUSSÃO

Ao considerar-se o número total de exames realizados pelo Laboratório de Patologia Animal-Uel no período do levantamento, a frequência de exames realizados provenientes da espécie canina foi de 58,41% (18.083/30.957), representando a maioria da rotina deste serviço veterinário. Isso se deve, provavelmente, ao acentuado número de cães atendidos na rotina deste Hospital, à prestação de serviço às clínicas particulares da região, além da conduta dos médicos veterinários voltada ao diagnóstico das neofomações e enfermidades dos animais da espécie canina.

Do total de exames na espécie canina, 139 (0,77%) foram exames histopatológicos de amostras provenientes de enfermidades oftalmológicas, sendo que destas, 77 (0,43%) tratavam-se comprovadamente de neoplasias envolvendo o aparelho visual. As outras 62 amostras indicaram processos inflamatórios, hiperplásicos, resultados inconclusivos ou não estavam registrados nos arquivos (Quadro 1). Segundo Miller e Dubielzig (2007), os

tumores oculares representam 0,87% das neoplasias caninas, resultado superior ao observado neste levantamento. Outro levantamento obteve a proporção de 0,75% das amostras enviadas provenientes de neoplasias oculares em cães (SILVA, 2013). No entanto, para o presente estudo foram desconsiderados os resultados dos exames citopatológicos para o diagnóstico de enfermidades oftalmológicas nos registros do Laboratório. Apesar da citopatologia ser um exame rápido (GUEDES; NOGUEIRA; TUDURY, 1997), simples, com baixo custo, pouco invasivo (BRACARENSE; REIS, 1997; CARVALHO et al., 2012) e podendo ser realizado sem sedação (LAVALLE et al., 2003; ROCHA, 2008), mostra-se limitado em demonstrar a arquitetura do tecido ou órgão alterado, impedindo o estudo da forma, estrutura e relação das lesões (STIRTZINGER, 1988; WELLMAN, 1990). Para o resultado inferior da prevalência neste estudo, também deve ser considerado o número reduzido de amostras encaminhadas para o diagnóstico durante o Período 1 (1985-1994) e Período 2 (1995-2004). Este número provavelmente reflete a falha no envio das amostras oculares para a realização do diagnóstico definitivo, além da falta de médicos veterinários treinados para reconhecer os animais suspeitos ou portadores de neoplasias oculares. Isso se torna evidente no Período 3 (2005-2014), com o aumento marcante de exames realizados. Esses resultados sugerem que o treinamento em oftalmologia veterinária e a capacitação para a realização de técnicas operatórias mais precisas facilitaram a identificação das alterações oftalmológicas e colheita das amostras pelas biópsias oculares.

Durante o período do levantamento, 77 (55,40%) amostras foram classificadas como provenientes de processos neoplásicos, sendo 40 (51,95%) classificadas como malignas e 37 (48,05%) como benignas. As neoplasias oculares podem ser primárias ou secundárias à metástases ou processos multicêntricos. A forma primária é a mais frequente e o impacto na estrutura e função do globo, assim como as opções terapêuticas e prognóstico variam com o diagnóstico e localização anatômica (WERNER et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2010; LABELLE; LABELLE, 2013). Mesmo as neofomações benignas apresentam potencial de invasão local, promovendo cegueira, perda do olho ou mimetizando doenças inflamatórias (WILLIS; WILKIE, 2001; MILLER; DUBIELZIG, 2007; GOULD, 2010).

Segundo estudo de Silva (2013), foi verificado que nas neoplasias oculares caninas 72,4% comprometem os anexos (conjuntiva e pálpebras), 21,9% afetam o bulbo ocular e 5,7% a órbita. No presente estudo, que não avaliou somente os processos oculares neoplásicos, os resultados mostram o acometimento dos anexos oculares (pálpebras e terceira pálpebra) com 64,75% das amostras, 30,22% de alterações no bulbo ocular e 4,32% na órbita.

O crescimento observado no envio de amostras provenientes de material palpebral entre o Período 2 (1995-2004) e Período 3 (2005-2014) pode denotar uma mudança dos tipos tumorais, dos padrões raciais predominantes nos períodos, na capacidade de reconhecimento das alterações oculares pelos médicos veterinários e principalmente pela evolução das técnicas operatórias e reconhecimento que a ressecção da glândula da terceira pálpebra pode resultar em quadros correlacionados ao déficit lacrimal (SLATTER, 2005). Foi possível evidenciar o aumento no envio de amostras provenientes de afecções bulbares ao longo dos períodos estudados, provavelmente resultando do expressivo envio de globos oculares para o diagnóstico dos glaucomas secundários à uveíte com necessidade de exérese do bulbo, principalmente durante o Período 3 (2005-2014). Este fenômeno resultou no aumento dos diagnósticos de processos inflamatórios sem diagnóstico definitivo.

Em todo o período estudado, diferentes diagnósticos foram apresentados, sendo a maior prevalência de processos inflamatórios (31/22,30%), seguidos por adenomas/epiteliomas (22/15,83%), carcinomas (18/12,95%) e tumores melanocíticos (13/9,35%). Como em outros órgãos, as neoplasias podem ser primárias, surgindo a partir do tecido afetado ou metastáticas (LABELLE; LABELLE, 2013). Não foi considerada a classificação entre neoplasias primárias e secundárias neste estudo, no entanto, as neoplasias primárias são mais frequentes, exceto as intraoculares que usualmente são secundárias (DUBIELZIG, 1990).

Os adenomas e epiteliomas observados neste estudo representaram o acometimento das glândulas de Meibômio presentes na margem palpebral. Essas neoplasias são muito frequentes, representando de 44 a 70% dos tumores palpebrais caninos (ROBERTS; SEVERIN; LAVACH, 1986, PEIFFER, 2001; WILCOCK, 2007). Apesar das sutis diferenças, critérios objetivos para a diferenciação destes tumores não foram bem estabelecidos (LABELLE; LABELLE, 2013), levando alguns autores a sequer diferenciarem adenomas de epiteliomas da glândula de Meibômio (WILCOCK; 2007). Ambas as neoplasias podem causar irritação corneana pelo contato ou representar apenas o acometimento estético (MAGGS, 2008), principalmente nas pálpebras superiores (OLBERTZ, 2012). A maioria das neoplasias palpebrais (75 a 90%) tem comportamento benigno (MILLER; DUBIELZIG, 2007; WILCOCK, 2007) e os prognósticos para a saúde geral e para o globo são excelentes após a remoção cirúrgica completa (LABELLE; LABELLE, 2013).

O considerável número de diagnósticos de carcinoma pode ter ocorrido devido à possibilidade deste tipo de neoplasia acometer diversos tecidos. Na margem palpebral, apesar de raro, pode surgir à partir da glândula de Meibômio e, ocasionalmente,

pode infiltrar na conjuntiva palpebral (CONCEIÇÃO et al., 2010; DUBIELZIG, 2011a; LABELLE; LABELLE, 2013). Na glândula da terceira pálpebra (adenocarcinoma) pode ocasionar proptose, exoftalmia, enoftalmia ou estrabismo, que clinicamente pode ser confundido com os adenomas, no entanto, a remoção cirúrgica é o tratamento de eleição (WILCOCK; PEIFFER, 1988; CONCEIÇÃO et al., 2010; DUBIELZIG, 2011b). O carcinoma de células escamosas na córnea pode ocorrer em animais com ceratites crônicas ou após a administração de imunomoduladores tópicos (WARD; LATIMER; ASKREN, 1992; BERNAYS; FLEMMING; PEIFFER, 1999; TAKIYAMA; TERASAKI; UECHI, 2010; DREYFUS; SCHOBERT; DUBIELZIG, 2011; DUBIELZIG, 2011a). Este mesmo tumor também pode acometer a conjuntiva, esclera e limbo devido à outros fatores como ceratoconjuntivite seca, radiação solar e lesões traumáticas (MILLER; DUBIELZIG, 2007; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008). O prognóstico para o bulbo ocular pode variar, dependendo da infiltração, detecção precoce e intervenção cirúrgica, no entanto para o paciente o prognóstico é bom (LABELLE; LABELLE, 2013). O adenocarcinoma do corpo ciliar origina-se do epitélio e pode atingir a íris e esclera. O prognóstico para o paciente usualmente é favorável, embora a enucleação seja o tratamento de escolha (LABELLE; LABELLE, 2013).

Assim como o carcinoma, o melanoma pode acometer diversos tecidos oculares. O melanoma frequentemente acomete a terceira pálpebra e a conjuntiva palpebral superior, além de acometer, também, a região do limbo (COLLINS et al., 1993, BERNAYS; FLEMMING; PEIFFER, 1999; MILLER; DUBIELZIG, 2007; CONCEIÇÃO et al., 2010). O melanoma conjuntival é pobremente circunscrito e pode apresentar invasão estromal, apresentando pigmentação variada, inclusive na forma amelanocítica (DUBIELZIG, 2011a). O prognóstico para essa neoplasia é reservado, pois as metástases podem ocorrer em 33,3% dos casos (COLLINS et al., 1993), assim como a recorrência local, mesmo com intervenções cirúrgicas agressivas (DUBIELZIG 2011b; LABELLE; LABELLE, 2013). Nos registros analisados foram descritos em três animais ocorrendo nas pálpebras sem o acometimento conjuntival e envolvendo a pálpebra inferior. Foram relatados 3 casos de melanomas intraoculares, sendo que em dois pacientes o glaucoma e deslocamento de retina estavam presentes. A forma intraocular desta neoplasia é mais comum na úvea anterior que na coroide (3% das neofomações) (ESSON et al., 2007, DUBIELZIG 2011a, LABELLE; LABELLE, 2013). Os sinais clínicos evidenciados são hemorragias intraoculares e glaucoma, além de descolamento de retina quando o tumor atinge a coroide. O prognóstico é reservado e a

enucleação é frequentemente indicada, principalmente nos pacientes com glaucoma (DUBIELZIG, 2011a; LABELLE; LABELLE, 2013).

Os melanocitomas podem acometer a conjuntiva, porém são benignos e bem circunscritos. Quando ocorrem na região límbica tem o prognóstico excelente, inclusive com a preservação do bulbo ocular (DUBIELZIG, 2011b; LABELLE; LABELLE, 2013). Quando acometem a porção intraocular, usualmente envolvem a íris e o corpo ciliar de forma conjunta (LABELLE; LABELLE, 2013). Os melanocitomas são aproximadamente quatro vezes mais comuns que os melanomas uveais (DUBIELZIG, 2011a). Esta condição prontamente obstrui o ângulo iridocorneal podendo acarretar alterações secundárias. O prognóstico é considerado bom, embora a enucleação deva ser realizada nos pacientes que desenvolvem glaucoma secundário (DUBIELZIG, 2011a; LABELLE; LABELLE, 2013). No presente estudo o predomínio dos diagnósticos de melanocitomas ocorreu em seis casos da forma palpebral e sem envolvimento do globo, resultando em melhor prognóstico para a visão. No entanto, um paciente apresentou a forma intraocular, necessitando de enucleação para a terapêutica e diagnóstico definitivo.

Durante o período estudado a frequência de alterações oculares foi discretamente superior nas fêmeas (51,80%) em relação aos machos (43,17%), enquanto em 5,03% dos prontuários não havia a indicação do sexo. Em relação às neoplasias, quando são estudadas considerando o sexo, não há padrão estabelecido nos caninos (DUBIELZIG, 2011a).

CONCLUSÕES

No período estudado foram realizados 30.957 exames citopatológicos e histopatológicos no Laboratório de Patologia Animal da UEL, com o predomínio na espécie canina. Os diagnósticos oftalmológicos foram realizados em 139 exames histopatológicos, envolvendo principalmente os anexos oculares e com a maior frequência de processos inflamatórios e tumores como adenomas/epiteliomas, carcinomas e outros. A análise dos dados de registros de um centro de referência auxilia no entendimento da rotina das atividades, assim como favorece a compreensão do comportamento biológico de algumas neoplasias e acarreta o diagnóstico correto e precoce.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa contou com recursos disponibilizados pela Fundação Araucária – Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

REFERÊNCIAS

BERNAYS, M.E.; FLEMMING, D.; PEIFFER, R.L.JR. Primary corneal papilloma and squamous cell carcinoma associated with pigmentary keratitis in four dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.214, p.215-217, 1999.

BRACARENSE, A.P.F.R.L.; REIS, A.C.F. Citologia aspirativa em animais domésticos: Estudo retrospectivo. **Semina: Ciências Agrárias**. v.18, p.27-32, 1997.

CARVALHO, T.F.; BITTAR, J.F.F.; COELHO, H.E.; CRUZ, R.L. Estudo retrospectivo dos diagnósticos citológicos do Hospital Veterinário de Uberaba. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v.55, p.27-34, 2012.

CONCEIÇÃO, L.F.; RIBEIRO, A.P.; PISO, D.Y.T.; LAUS, J.L. Considerations about ocular neoplasia of dogs and cats. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2235-2242, 2010.

COLLINS, B.K.; COLLIER, L.L.; MILLER, M.A.; LINTON, L.L. Biologic behavior and histologic characteristics of canine conjunctival melanoma. **Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology**. v.3, p.135-140, 1993.

DREYFUS, J.; SCHOBERT, C.S.; DUBIELZIG, R.R. Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. **Veterinary Ophthalmology**. v.14, p.161-168, 2011.

DUBIELZIG, R.R. Ocular neoplasia in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.20, p.837-848, 1990.

DUBIELZIG, R.R. Tumors of the canine globe. Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, p.781-784. 2011. (resumo expandido)

- DUBIELZIG, R.R.. Tumors of the canine conjunctiva, eyelids, and orbit. Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea, p.785-787. 2011. (resumo expandido)
- ESSON, D. Suspected uveal metastasis of a nail bed melanoma in a dog. **Veterinary Ophthalmology**. v.10, n.4, p.262-266, 2007.
- GUEDES, R.M.C.; NOGUEIRA, R.H.G.; TUDURY, E.A. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. **Hora Veterinária**. v.16, n.96, p.15-21, 1997.
- GOULD, D. Ocular tumors. In: **Manual of Canine and Feline Oncology**. Dobson, J.M.; Lascelles, B.D.X. (Eds), 3rd ed. BSAVA, Ohio. p.341-353. 2010.
- LABELLE, A.L.; LABELLE, P. Canine ocular neoplasia: a review. **Veterinary Ophthalmology**. v.16, p.3-14, 2013.
- LASCELLES, B.D.X.; DAVIDSON, M. Eyelids, eye and orbit. In: **Veterinary Surgical Oncology**. Kudnig, S.T.; Séguin, B. (Eds), 3rd ed. Wiley-Blackwell, Iowa. p.383-404. 2012.
- LAVALLE, G.E.; ARAUJO, R.B.; CARNEIRO, R.A.; PEREIRA, L.C. Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.4, p.500-550, 2003.
- MAGGS, D.J. Eyelids. In: **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. Maggs, D.J.; Miller, P.E.; Ofri, R. (Eds), Saunders, Missouri. p.107-134. 2008.
- MAGGS, D.J.; MILLER, P.E.; OFRI, R. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4TH ed. St. Louis: Saunders, 2008. 482p.
- MILLER, P.E.; DUBIELZIG, R.R. Ocular tumors. In: **Small Animal Clinical Oncology**. Withrow, S.J.; Vail, D.M. (Eds), 4th ed. Saunders Elsevier, Missouri. p.686-698. 2007.
- MONTIANI-FERREIRA, F.; KIUPEL, M.; MUZOLON, P.; TRUPPEL, J. Corneal squamous cell carcinoma in a dog: a case report. **Veterinary Ophthalmology**. v.11, n.4, p.269-272, 2008.
- OLBERTZ, L. Levantamento clínico-epidemiológico com análise morfológica das principais neoplasias oculares em cães. 136f. **Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- PEIFFER, R.L.J. Adnexal and ocular neoplasms. In: **Pathobiology of the Aging Dog**. Mohr, U.; Carlton, W.W.; Dungworth, D.L.; Benjamin, S.A.; Capen, C.C.; Hahn, F.F. (Eds), 1st ed. Iowa State University Press, Ames. p.601, 2001.
- ROBERTS, S.M.; SEVERIN, G.A.; LAVACH, J.D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.189, p.1355-1359, 1986.
- ROCHA, N.S. Exame citológico no diagnóstico de lesões de pele e subcutâneo. **Clínica**

Veterinária. v.76, p.76-80, 2008.

SILVA, B.R.F.D. Neoplasias oculares em cães e gatos – Estudo retrospectivo 2001-2012. 93f. **Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.** Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2013.

SLATTER, D. Sistema lacrimal. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária.** Slatter, D. (Ed), 3rd ed. Roca, São Paulo. p.259-282. 2005.

STIRTZINGER, T. The citologic diagnosis of mesenchymal tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal.** v.3, p.157-166, 1988.

TAKIYAMA, N.; TERASAKI, E.; UECHI, M. Corneal squamous cell carcinoma in two dogs. **Veterinary Ophthalmology.** v.13, p.266-269, 2010.

WARD, D.A.; LATIMER, K.S.; ASKREN, R.M. Squamous cell carcinoma of the corneoscleral limbus in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association.** v.200, p.1503-1506, 1992.

WELLMAN, M.L. The citologic diagnosis of neoplasia. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice.** v.20, n.4, p.919-938, 1990.

WERNER, P.R.; CHIQUITO, M.; PACHALY, J.R.; FERREIRA, F.M. Neoplasias oculares diagnosticadas em animais do sul do Paraná, Brasil. **Arquivo de Ciências, Veterinária e Zooloia.** UNIPAR, v.1, p.13-21, 1998.

WILCOCK, B.P. Eye and ear. In: **Pathology of Domestic Animal.** Maxie, M.G. (Ed), Elsevier-Saunders, Philadelphia. p.459-552. 2007.

WILCOCK, B.; PEIFFER, J.JR. Adenocarcinoma of the gland of the third eyelid in seven dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association.** v.193, p.1549-1550, 1988.

WILLIS, A.M.; WILKIE, D.A. Ocular Oncology. **Clinical Techniques in Small Animal Practice.** v.16, p.77-85, 2001.

#

Quadro 1 - Frequência dos diagnósticos nas amostras de alterações oftalmológicas caninas enviadas para o exame histopatológico no Laboratório de Patologia Animal-UEL, no período de 1985-2014.

Classificação histopatológica	Período 1		Período 2		Período 3		Período Completo	
	(1984-1994)		(1995-2004)		(2005-2014)		(1985-2014)	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
Adenoma/ Epitelioma	0	0	1	0,72	21	15,11	22	15,83
Carcinoma	1	0,72	7	5,04	10	7,19	18	12,95
Hemangioma	0	0	1	0,72	3	2,16	4	2,88
Hemangiossarcoma	0	0	0	0	9	6,47	9	6,47
Melanocitoma	0	0	0	0	7	5,04	7	5,04

- A biologia molecular mostrou-se um método sensível para a detecção do agente etiológico da leptospirose nos pacientes com glaucoma e na correlação com a doença oftalmológica;

- As alterações histopatológicas dos animais com glaucoma foram compatíveis com o diagnóstico de pan-oftalmite, enquanto os tumores mais frequentes foram os adenomas/epiteliomas;

- No período de 30 anos foram realizados mais de 30.000 exames no Laboratório de Patologia Animal-UEL, com o predomínio da espécie canina. Os diagnósticos oftalmológicos envolveram principalmente os anexos oculares, com a maior frequência de processos inflamatórios e tumores como adenomas e epiteliomas.

6 PERSPECTIVAS

- Contribuir para o estudo das doenças oculares causadas por *Helicobacter* spp. e *Leptospira* spp. através da comprovação do acometimento ocular;

- Identificar as espécies de *Helicobacter* detectadas nos cães deste estudo;

➤ Favorecer a compreensão da patogênese das uveítes e glaucomas secundários à partir da identificação dos agentes etiológicos em cães;

➤ Ampliar e aprofundar os estudos de doenças oculares que resultem em glaucoma causadas por diversos agentes etiológicos.

ANEXO A – Aprovação no comitê de ética no uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº207/12

Londrina, 19 de setembro de 2012.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 03 de Julho de 2012, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Pesquisa de bactérias dos gêneros *Chlamydia*, *Helicobacter* e *Leptospira* em doenças oculares de cães e felinos", processo CEJA nº 13/18/2012.01, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está aprovado para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 24 gatos da raça e peso não especificados e 24 cães de raça e peso não especificados, com procedência do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. O projeto tem o objetivo de pesquisar bactérias dos gêneros *Chlamydia*, *Helicobacter* e *Leptospira* em doenças oculares de cães e felinos. Para isto todos os animais atendidos no ambulatório do HV entre o período de Julho de 2012 a Março de 2014 com problemas oculares serão incluídos na pesquisa, o grupo controle será composto pelo mesmo número de animais avaliados no estudo clínico (entre 24 e 30 animais). Os animais do grupo controle serão recolhidos dos diversos setores do HV participantes logo após o diagnóstico ou realização da autopsia. Esses animais não podem apresentar alterações oftalmológicas ou condições pré-existentis que comprometam a coleta de material biológico dos cadáveres, nos animais com intraoculares será realizada a aquocentese na câmara anterior e o humor será alíquotado e utilizado para cultura de leptospira e congelado a -20° C, para a PCR. Todos receberão medicação pré-anestésica com propofol por via intravenosa, além de colírio anestésico com tetracaina, a coleta será realizada com agulhas e seringas e após a coleta todos receberão a aplicação do colírio com antibiótico e corticoide. Os olhos enucleados serão submetidos a coleta de material e armazenamento, o tumor ocular ou do anexo serão disseccionados e amostras destinadas a realização das técnicas de imunohistoquímica e histopatológica com acondicionamento em solução de formol e congelada a -20° C para PCR. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 23 meses.

Cumprir orientar que caso pretenda-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Ap. Vera Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Vera Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilms. Sras

Profa. Dra. Ana Paula Frederico R.L. Bracarense

Coordenadora do Projeto

Departamento de Medicina Veterinária

Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Sra. Egil Maria da Sousa (Chefe do DCA/TROPIC) e Diretor do Centro de Ciências Agrárias para cadastro do projeto.

ANEXO A – Aprovação no comitê de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ - UENP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto SECAPEE nº 1874 intitulado PESQUISA DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS CHLAMYDOPHILA, HELICOBACTER E LEPTOSPIRA NO BULBO OCULAR E EM NEOPLASIAS DOS ANEXOS OCULARES sob a responsabilidade do Prof. ADEMIR ZACARIAS JUNIOR está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL vigentes na legislação Brasileira e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da universidade Estadual do Norte do Paraná em reunião de 10 06 2011.

(We certify that the research 10/06/2011 agrees with Brazilian ethical principles in animal research and was approved by the ETHICAL COMMISSION OF UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANA during 10 06 2011 meeting.)

Bandeirantes, 10 06 2011

Coordenação CEUA - UENP

ANEXO B – Normas para publicação de artigos científicos

Pesquisa Veterinária Brasileira – Brazilian Journal of Veterinary Research

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impresa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (pago a cargo) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto PV.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assumia importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margem (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (Inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Insert" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados e feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Hayes 1974, Lemos et al. 2004, Krameter-Froetche et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada leída do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recamegando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO C – Protocolo de extração do dna

USER GUIDE

life

invitrogen
by *life technologies*

PureLink® Genomic DNA Kits
For purification of genomic DNA

Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-04

Document Part Number 25-1012
Publication Number MAN0000601
Revision 2.0

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

life
technologies™

Experienced Users' Mini Kit Procedure

Introduction

This quick reference sheet is included for experienced users of the PureLink® Genomic DNA Mini Kit. For more details, refer to this manual.

Step	Procedure																							
Preparing lysates	Prepare the lysate using an appropriate sample preparation protocol as follows:																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Sample</th> <th>Amount</th> <th>Page no.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mammalian cells, tissues and mouse tail</td> <td>5×10^6 cells, ≤ 25 mg tissue (≤ 10 mg spleen), 0.5–1 cm tail</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>Blood</td> <td>≤ 1 mL non-nucleated blood (need additional reagents, see page 17) 5–10 μL nucleated blood</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>Bacteria</td> <td>$\leq 2 \times 10^9$ cells</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>Yeast cells</td> <td>$\leq 5 \times 10^7$ cells</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>Buccal swab</td> <td>Human buccal swab</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>FFPE tissue</td> <td>1–8 sections of 5–15 μm thick of about 20–50 mm² area</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Oragene™ preserved saliva</td> <td>≤ 1 mL</td> <td>21</td> </tr> </tbody> </table>	Sample	Amount	Page no.	Mammalian cells, tissues and mouse tail	5×10^6 cells, ≤ 25 mg tissue (≤ 10 mg spleen), 0.5–1 cm tail	16	Blood	≤ 1 mL non-nucleated blood (need additional reagents, see page 17) 5–10 μ L nucleated blood	17	Bacteria	$\leq 2 \times 10^9$ cells	18	Yeast cells	$\leq 5 \times 10^7$ cells	19	Buccal swab	Human buccal swab	19	FFPE tissue	1–8 sections of 5–15 μ m thick of about 20–50 mm ² area	20	Oragene™ preserved saliva	≤ 1 mL
Sample	Amount	Page no.																						
Mammalian cells, tissues and mouse tail	5×10^6 cells, ≤ 25 mg tissue (≤ 10 mg spleen), 0.5–1 cm tail	16																						
Blood	≤ 1 mL non-nucleated blood (need additional reagents, see page 17) 5–10 μ L nucleated blood	17																						
Bacteria	$\leq 2 \times 10^9$ cells	18																						
Yeast cells	$\leq 5 \times 10^7$ cells	19																						
Buccal swab	Human buccal swab	19																						
FFPE tissue	1–8 sections of 5–15 μ m thick of about 20–50 mm ² area	20																						
Oragene™ preserved saliva	≤ 1 mL	21																						
Binding DNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Remove a PureLink® Spin Column in a Collection Tube from the package. 2. Load the lysate (~640 μL) with Lysis/Binding Buffer and ethanol prepared as described on pages 16–21 to the PureLink® Spin Column. 3. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute at room temperature. 4. Discard the collection tube and place the spin column into a new collection tube. 5. Proceed to Washing DNA. 																							
Washing DNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Wash the column with 500 μL Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23). 2. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute at room temperature. Discard the collection tube and place column into a new collection tube. 3. Wash the column with 500 μL Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23). 4. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard the collection tube. 5. Proceed to Eluting DNA. 																							
Eluting DNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube. 2. Elute the DNA with 25–200 μL of PureLink® Genomic Elution Buffer. See Elution Parameters (page 13) to choose a suitable elution volume for your needs. 3. Incubate the column at room temperature for 1 minute. 4. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. <i>The tube contains purified DNA.</i> 5. If desired, perform a second elution to increase recovery which lowers the overall concentration. <i>The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.</i> 6. Use the purified gDNA for the desired downstream application. Store the purified gDNA at 4°C for short-term or –20°C for long-term storage. 																							

Preparing Lysates—Mini Kit

Introduction

Instructions for preparing lysates from mammalian cells and tissues, mouse tail, buccal swabs, blood, bacteria, yeast, FFPE tissues, and Oragene™ preserved saliva are described in the following sections.

To obtain high-quality genomic DNA, follow the guidelines recommended on page 11.

Important

Make sure there is no precipitate visible in PureLink® Genomic Digestion Buffer or PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer. If any precipitate is visible in the buffers, warm the buffers at 37°C for 3–5 minutes and mix well to dissolve the precipitate before use.

Materials Needed

Components supplied by the user

- 96–100% ethanol
- Sample for DNA isolation (see page 12 for recommended starting amount)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) for mammalian cell lysate (page 43)
- Lysozyme and Lysozyme Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100) for bacterial cell lysate
- Zymolase Buffer (1 M sorbitol, 10 mM sodium EDTA, 14 mM β-mercaptoethanol) and Zymolase (lyticase) enzyme for yeast lysate
- CitriSolv™ Clearing Agent (Fisher cat. no. 22-143-975) or xylene for FFPE tissue
- 3 M sodium acetate (pH 5–5.5) and 2.8 mL isopropanol for Oragene™ samples
- Sterile, DNase-free microcentrifuge tubes
- Water baths or heat blocks

Components supplied with the Kit

- PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer
- PureLink® Genomic Digestion Buffer
- Proteinase K (20 mg/mL)
- RNase A (20 mg/mL)

Preparing Lysates—Mini Kit, Continued

Mammalian Cells Lysate

Use the following protocol to prepare lysate from mammalian cells.

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. For adherent cells ($\leq 5 \times 10^6$ cells), remove the growth medium from the culture plate and harvest cells by trypsinization or a method of choice. For suspension cells ($\leq 5 \times 10^6$ cells), harvest cells and centrifuge the cells at $250 \times g$ for 5 minutes to pellet cells. Remove the growth medium.
3. Resuspend the cells from Step 2 in 200 μ L PBS.
4. Add 20 μ L Proteinase K (supplied with the kit) to the sample.
5. Add 20 μ L RNase A (supplied with the kit) to the sample, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
6. Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
7. Incubate at 55°C for 10 minutes to promote protein digestion.
8. Add 200 μ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
9. Proceed immediately to **Binding DNA** (page 23).

Mammalian Tissue and Mouse/Rat Tail Lysate

Use the following protocol to prepare lysate from mammalian tissues and mouse/rat tails.

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Place the following amount of mammalian tissue or tail into a sterile microcentrifuge tube:
 - ≤ 25 mg of minced mammalian tissue
 - ≤ 10 mg minced spleen tissue
 - 1 cm mouse or 0.5 cm rat tail clip
3. Add 180 μ L PureLink® Genomic Digestion Buffer and 20 μ L Proteinase K (supplied with the kit) to the tube. Ensure the tissue is completely immersed in the buffer mix.

Note: When processing multiple samples, prepare a master Digestion Buffer Mix by mixing 180 μ L Digestion Buffer and 20 μ L Proteinase K for each sample.
4. Incubate at 55°C with occasional vortexing until lysis is complete (1–4 hours). For mouse tails or larger tissue pieces, you may perform overnight digestion.
5. To remove any particulate materials, centrifuge the lysate at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Transfer supernatant to a new, sterile microcentrifuge tube.
6. Add 20 μ L RNase A (supplied in the kit) to the lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
7. Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing.
8. Add 200 μ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds.

Note: When processing multiple samples, prepare a master Buffer/ethanol Mix by mixing 200 μ L Lysis/Binding Buffer and 200 μ L 96–100% ethanol per sample.
9. Proceed immediately to **Binding DNA** (page 23).

Preparing Lysates—Mini Kit, Continued

Blood Lysate

Use the following protocol to prepare lysate from blood samples (nucleated or nonnucleated).

Note: If you are processing >200 μ L blood sample, you need to purchase additional PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and Proteinase K (page 43).

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. To a sterile microcentrifuge tube, add \leq 200 μ L fresh or frozen blood sample (if using <200 μ L blood sample, adjust the sample volume to 200 μ L using PBS). For processing blood samples >200 μ L and \leq 1 mL, scale up all reagent volumes accordingly.
3. Add 20 μ L Proteinase K (supplied with the kit) to the sample.
4. Add 20 μ L RNase A (supplied with the kit) to the sample, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
5. Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
6. Incubate at 55°C for 10 minutes to promote protein digestion.
7. Add 200 μ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
8. Proceed immediately to **Binding DNA** (page 23).

Blood Spots

Use the following protocol to prepare lysate from dried blood spots.

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Place 2–5 punches of dried blood spot (2–3 mm in size) in a sterile microcentrifuge tube.
3. Add 180 μ L PureLink® Genomic Digestion Buffer and 20 μ L Proteinase K (supplied with the kit) to the tube. Mix well by vortexing. Ensure the pieces are completely immersed in buffer.
4. Incubate at 55°C with occasional vortexing for 30 minutes.
5. Centrifuge the sample at maximum speed for 2–3 minutes at room temperature to pellet paper fibers. Transfer the sample to a clean, sterile microcentrifuge tube.
6. Add 20 μ L RNase A (supplied in the kit) to the lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
7. Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
8. Add 200 μ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.

Note: When processing multiple samples, you may prepare a master Buffer/ethanol Mix by mixing 200 μ L Lysis/Binding Buffer and 200 μ L 96–100% ethanol for each sample.

9. Proceed immediately to **Binding DNA** (page 23).

Purification Procedure Using Spin Columns

Introduction

The purification procedure is designed for purifying genomic DNA using a spin column-based centrifugation procedure in a total time of **10–15 minutes**.

Materials Needed

Components supplied by the user

- Lysates prepared as described on pages 16–21
- Sterile, DNase-free 1.5-mL microcentrifuge tubes for elution
- Microcentrifuge capable of centrifuging $>10,000 \times g$
- Optional: sterile water, pH 7.0–8.5, if you are using water for elution

Components supplied with the Kit

- PureLink® Genomic Wash Buffers 1 and 2
- PureLink® Genomic Elution Buffer
- PureLink® Spin Columns in Collection Tubes
- PureLink® Collection Tubes



Follow the recommendations below to obtain the best results:

- Perform all centrifugation steps at room temperature
- Review **Elution Parameters** on page 13 to determine the suitable elution volume for your requirements
- Perform a 1 minute incubation step with PureLink® Genomic Elution Buffer
- Be sure to perform the recommended wash steps to obtain the best results
- If you are using water for elution, always use sterile water, pH 7.0–8.5

Before Starting

Add 96–100% ethanol to PureLink® Genomic Wash Buffer 1 and PureLink® Genomic Wash Buffer 2 according to instructions on each label. Mix well. Mark on the labels that ethanol is added. Store both wash buffers with ethanol at room temperature.

Binding DNA

1. Remove a PureLink® Spin Column in a Collection Tube from the package.
2. Add the lysate (~640 μ L) prepared with PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and ethanol to the PureLink® Spin Column.
3. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute at room temperature.
Note: If you are processing $>200 \mu$ L starting material such as blood, buccal swabs, or Oragene™ preserved saliva, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same PureLink® Spin Column (above) and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
4. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® Collection Tube supplied with the kit.
5. Proceed to **Washing DNA**, page 24.

Purification Procedure Using Spin Columns, Continued

Washing DNA

1. Add 500 μ L Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23) to the column.
 2. Centrifuge column at room temperature at 10,000 \times g for 1 minute.
 3. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink[®] collection tube supplied with the kit.
 4. Add 500 μ L Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23) to the column.
 5. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.
 6. Proceed to **Eluting DNA**.
-

Eluting DNA

1. Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube.
 2. Add 25–200 μ L of PureLink[®] Genomic Elution Buffer to the column. See **Elution Parameters** (page 13) to choose the suitable elution volume for your needs.
 3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. *The tube contains purified genomic DNA.*
 4. To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution in another sterile, 1.5-mL microcentrifuge tube.
 5. Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature.
The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.
-

Storing DNA

- Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application.
 - For long-term storage, store the purified DNA in PureLink[®] Genomic Elution Buffer at -20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.
 - To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at -20°C for long-term storage.
-

ANEXO D – Protocolo de técnicas

- **Primers**

Helicobacter spp. (forward): 5' AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA 3'

Helicobacter spp. (reverse): 5' GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T 3'

Fragmentos: Gênero *Helicobacter* 399 pb

- **PCR-MIX (para uma reação)**

Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 2,5 µL

MgCl₂ (50 mM): 1,5 µL

dNTP (0,1 mM): 4,0 µL

primer forward (20 pmol): 0,5 µL

primer reverse (20 pmol): 0,5 µL

Platinum® *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL): 0,25 µL

Água estéril q.s.p. 24 µL

Amostra: 1 µL

- **PCR**

- Gênero *Helicobacter*: ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 65°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 10 min, repouso a 4°C.

- **Eletroforese (Gel de agarose a 2%)**

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB buffer (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4

- 30 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

Amostra: 7,0 µL do *amplicom* e 3,0 µL tampão de amostra

Corrida por aproximadamente 45 minutos a 100 V e 80 A

Visualização em transiluminador de luz ultravioleta

- **Primers**

Leptospira 16S RNAr (forward): 5' GGCGGCGCGTCTITAAACATG 3'
Leptospira 16S RNAr (reverse): 5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3'
 Fragmentos: 330 pb entre as posições 38 e 368

Leptospira 16S RNAr (forward2): 5' CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA 3'
Leptospira 16S RNAr (reverse1): 5' CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA 3'
 Fragmentos: 289 pb da primeira amplificação

- **PCR-MIX (para uma reação)**

Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 2,5 µL

MgCl₂: 2,5 mmol/L

dNTP: 0,2 mmol/L

primer forward: 150 ng

primer reverse: 150 ng

Platinum® *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL): 0,20 µL

Água estéril q.s.p. 25 µL

Amostra: 10 µL (PCR)

Amostra: 1 µL (n-PCR)

- **PCR e n-PCR**

- *Leptospira* spp.: ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 min, 32 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 55°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 7 min, repouso a 4°C.

- **Eletroforese (Gel de agarose a 2%)**

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB buffer (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4

- 30 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

Amostra: 7,0 µL do *amplicom* e 3,0 µL tampão de amostra

Corrida por aproximadamente 45 minutos a 100 V e 80 A

Visualização em transiluminador de luz ultravioleta