



FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Ultraestrutura da córnea dos gatos por Microscopia Eletrônica de
Varredura (MEV)**

Isabela Maciel Cunha

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Paula Diniz Galera

Brasília – DF

Maio/ 2021



Isabela Maciel Cunha

Ultraestrutura da córnea dos gatos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentação junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Paula Diniz Galera

Brasília – DF

Maio/ 2021

Cunha, Isabela Maciel

Ultraestrutura da córnea dos gatos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); orientação de Paula Diniz Galera. – Brasília, 2021.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021.

Cessão de direitos

Nome do autor: Isabela Maciel Cunha

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Ultraestrutura da córnea dos gatos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Isabela Maciel Cunha

Folha de Aprovação

Nome do autor: Cunha, Isabela Maciel

Título: Ultraestrutura da córnea dos gatos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentação junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a Paula Diniz Galera

Instituição: FAV/Universidade de Brasília

Julgamento: _____ Assinatura: _____

M.V., MSc. Rosélia de Lima Sousa Araújo

Instituição: FAV/Universidade de Brasília

Julgamento: _____ Assinatura: _____

M.V., Dra. Ana Carolina V. Rodarte-Almeida

Instituição: ACR Oftalmologia Veterinária

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, à Santíssima Virgem Maria, à minha família que sempre estiveram comigo e aos meus fiéis animais companheiros (Lilica, Zeus, Tequila, Ritalina, Grifo e Nero).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço de todo o meu coração à Deus, por sempre me proteger e por sustentar na realização dessa jornada. *Ad maiorem Dei gloriam*.

À Santíssima Virgem Maria, por passar a frente de todas as coisas e pelas graças por ela distribuídas.

Ao Glorioso São José.

Aos meus pais, José Maria e Ceila, pelo cuidado, apoio e por terem acreditado em mim em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Vinicius, Amanda, Andressa e toda a minha família, por se alegrarem comigo e por todo apoio que tive deles.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera, pelas oportunidades e ensinamentos nas atividades acadêmicas que sempre me motivam a buscar ser melhor.

À Médica Veterinária Rosélia de Lima Sousa Araújo, por toda ajuda e por compartilhar seus conhecimentos durante o período da pesquisa.

Às minhas amigas Rafaela Gomes, Jéssica Reis, Pâmela, Aline, Ana Luíza, Ana Carolina, Milena, Ghabriela, Alinne, Nathalya, Mayara, Gabriela, Brenda, Eliene e Cleane pelo apoio, conversas e por estarem comigo durante todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus amigos de Lisboa, por terem me acolhido com muito carinho durante a experiência acadêmica que tive em Portugal.

À Professora Sílvia Maria Caldeira Franco de Andrade (UNOESTE-SP), pela disponibilização das córneas felinas.

À equipe do Laboratório de Microscopia e Microanálise IB/UnB, por cederem suas dependências e equipamentos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Animais	19
2.2 Coleta e processamento das amostras	20
3. RESULTADOS.....	21
4 DISCUSSÃO	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A: Amostras de córneas de felinos, em imagem macroscópica. B: Uma amostra da córnea de um gato fixada em *Stub* com fitas de carbono de dupla face. C: Imagem de Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo Jeol JSM-7001F (Jeol). D: Amostras da córnea de felino metalizadas com camada de ouro.....21

FIGURA 2. MEV de uma córnea de um gato. A, Superfície epitelial da córnea de um gato (seta azul), região estromal da córnea com presença de fibrilas de colágeno (círculo azul), epitélio (ponta de seta). B, Fibrilas de colágeno na região do estroma da córnea do gato.....22

FIGURA 3 MEV de uma córnea de um felídeo doméstico. A, Superfície epitelial da córnea de um gato (seta azul) e estroma da córnea com presença fibrilas de colágeno orientadas em diferentes direções (círculo azul). B, Superfície epitelial da córnea de um gato (seta azul), estroma da córnea numa visão ampla exibindo o padrão de arranjo do colágeno (círculo azul), endotélio (ponta de seta)22

FIGURA 4 MEV de uma córnea de um felino. A, Células do epitélio corneano do gato, observando-se a sobreposição celular deste tecido (seta), núcleos evidentes (ponta de seta). B, Monocamada de células endoteliais, nota-se seu formato poligonal destacado em azul. Núcleos centralizados (ponta de seta)23

LISTA DE ABREVIATURAS

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

FLPC - Filme lacrimal pré-corneano

mm - Milímetros

M - Mega

h - Hora

v/v - Volume de soluto

°C – Grau Celsius

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CO₂ - Dióxido de carbono ou gás carbônico

nm - Nanômetro

µm - Micrometros

TACs - Células amplificadoras transitórias

PGs - Proteoglicanos

LISTA DE SIGLAS

UNOESTE-SP - Universidade do Oeste Paulista

UnB - Universidade de Brasília

IB – Instituto de Biologia

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

ProIC - Programa de Iniciação Científica

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PIBIC – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

FAV- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

LMM - Laboratório de Microscopia e Microanálises

CEUA - Comitê de Ética de Uso Animal

ARVO - Association for Research in Vision and Ophthalmology

RESUMO

CUNHA, I. M. Ultraestrutura da córnea dos gatos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Ultrastructure of the cornea of cats by Scanning Electron Microscopy (SEM). 2021. Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O trabalho descreve a morfologia ultraestrutural da córnea de gatos por microscopia eletrônica de varredura. Os animais estudados foram dois felídeos domésticos, fêmeas e adultas, sem raça definida e sem alterações oculares. Foram coletadas duas córneas de dois gatos, uma de cada animal, as quais foram rotineiramente processadas para a microscopia eletrônicas de varredura (MEV). Através da MEV foi observada a ultraestrutura de três camadas da córnea de gatos: epitélio, estroma e o endotélio. Foi possível visualizar as fibrilas de colágeno, em estroma, assim como o padrão celular do epitélio e endotélio corneano felino. Este estudo avaliou e descreveu a morfologia estrutural da córnea felina, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chave: córnea, gatos, endotélio, estroma, colágeno.

ABSTRACT

CUNHA, I. M. Ultrastructure of the cornea of cats by Scanning Electron Microscopy (SEM). 2021. Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

This study describes the ultrastructural morphology of the cat's cornea by scanning electron microscopy. Two cats, female and adults, mixed breed, and no ocular alteration were evaluated. Two corneas were collected, one from each animal, and routinely processed for scanning electron microscopy (SEM). Through SEM, the ultrastructure of three layers of the cornea of cats was observed: epithelium, stroma and the endothelium. It was possible to visualize how collagen fibrils in the stromal region, as well as the cellular pattern of the corneal epithelium and endothelium. This study evaluated and fulfilled the structural morphology of the feline cornea, using a scanning electron microscopy technique.

Key-words: cornea, cats, endothelium, stroma, corneal sequestration, collagen

1 INTRODUÇÃO

O gato doméstico possui hábitos noturnos e, conseqüentemente, a visão nessa espécie é excelente para enxergar sem muita luminosidade. Isso se dá pelas características da fisiologia ocular ad espécie, como o maior tamanho da córnea e da lente; pupila em fenda vertical; a presença da camada *tapetum lucidum* na coróide e a alta quantidade de células bastonetes – componente da camada de fotorreceptores da retina. A retina é responsável pela recepção da luz (CRISPIN, 2009) e a camada dos fotorreceptores pela fototransdução, sendo que os bastonetes são responsáveis pela visão escotópica e o *tapetum lucidum* auxilia na reflexão da luz (MARTIN, 2005). Por serem predadores, o ângulo de visão é maior em comparação aos humanos, o que provavelmente justifique a curvatura central da córnea ser mais plana nesta espécie (MOODIE et al., 2001).

A camada fibrosa externa é constituída pela córnea e a esclera (MAGGS et al., 2013). A córnea possui formato elíptico com pequena diferença entre o diâmetro horizontal e vertical (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021), sendo um tecido conjuntivo transparente e único (STADES et al., 2010), cuja espessura central é menor de 1mm, na maioria dos animais domésticos (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). Um estudo usando paquimetria ultrassônica não encontrou diferença significativa na espessura da córnea central e periférica em felinos, porém concluíram que ela é influenciada pela idade (aumentando com o tempo) e o clima do dia (GILGER et al., 1993).

A córnea é um limite estrutural e fisiológico para o ambiente externo, mantendo uma barreira física e impermeável entre o olho e o meio ambiente. Nos gatos, ela atinge a maturidade nos primeiros anos de vida, no máximo aos dois anos de vida. Nesse período, quando o animal atinge a fase adulta, ocorre a mudança da curvatura e da espessura. (MOODIE et al., 2001). Portanto, as funcionalidades mais importantes da córnea incluem a proteção do meio intraocular, e além disso, é considerada o principal meio de refração do olho, representando 70-80% do poder dióptrico do bulbo ocular (MOODIE et al., 2001).

Ela é composta histologicamente por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio, sendo o epitélio a estrutura mais externa que

está em contato direto com o FLPC. O estroma, também conhecido como substância própria, é a camada mais espessa e é composta por ceratócitos e fibrilas de colágeno. A membrana de Descemet é a camada mais fina e altamente elástica. E por último, o endotélio, composta por única camada de células escamosas e com capacidade regenerativa limitada (MAGGS et al., 2013).

A transparência da córnea permite a refração, a entrada de quantidade e qualidade suficientes de luz no olho para a formação da imagem no córtex visual, juntamente com inervações, particularmente os receptores de dor, há proteção da córnea e auxílio na transparência (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). Os fatores anatômicos que mais contribuem para a transparência da córnea são sua avascularidade, a baixa densidade celular, a ausência de pigmentação e de queratinização, a manutenção de um estado relativamente desidratado (deturgescência), sua superfície lisa e a organização das fibras de colágenos do estroma (MAGGS et al., 2013).

O filme lacrimal pré-corneano (FLPC) desempenha um papel fundamental na manutenção da superfície lisa da córnea e, juntamente com o humor aquoso, supre as necessidades metabólicas dessa estrutura, como a obtenção de oxigênio e nutrientes (MAGGS et al., 2013). O limbo consiste numa zona de transição entre a córnea e a esclera (STADES et al., 2010). A maioria das respostas patológicas da córnea estão associadas com perda de transparência, opacificação ou até mesmo com a perda da visão (CRISPIN, 2009).

Epitélio da córnea felina

O epitélio é constituído por células epiteliais escamosas, não queratinizado (MAGGS et al., 2013). Nos felinos, ele tem aproximadamente entre 25 a 40 μm de espessura (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Além disso, o epitélio nos gatos consiste numa única camada de células basais de formato colunar alto (CRISPIN, 2009), em contato íntimo com o estroma onde os hemidesmossomos ajudam em sua fixação (MAGGS et al., 2013). Integrando a essas camadas, o epitélio consiste na organização de duas ou três camadas de células poliédricas (CRISPIN, 2009) e de células superficiais

escamosas não queratinizadas. Há organização entre elas para substituição das células superficiais durante a descamação (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). As células epiteliais sofrem divisão contínua, amadurecendo, progredindo e levando à cicatrização deste tecido em um período médio de sete dias (STADES et al., 2010), o que favorece a reparação celular desta estrutura, através de mitose (CRISPIN, 2009).

A mitose também multiplica as células basais ou as células superficiais (estrato germinativo) (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021), que constantemente são substituídas por células-tronco no limbo (MAGGS et al., 2013). O filme lacrimal está firmemente aderido a essas células, e pode mover as células fagocíticas para a área lesionada (CRISPIN, 2009).

Em comparação aos animais de grande porte, os equinos, o epitélio dos felinos são de duas a três vezes menor (NAUTSCHER et al., 2016), talvez seja pela exposição e condições ambientais mais adversas, precisando assim, de uma córnea mais espessa. E ainda quanto ao tamanho, o epitélio da córnea dos gatos é a mais fino em relação às outras espécies de animais domésticos (NAUTSCHER et al., 2016).

Estroma da córnea felina

A camada estromal é a mais espessa, representando cerca de 90% da espessura da córnea. Ela consiste principalmente de fibrilas de colágeno dos tipos I, III, V, VI e XII, proteoglicanos selecionados, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina e dermatanosulfato). O colágeno de tipo I é o mais prevalente e o tipo VI associa as fibrilas e ceratócitos, que se conectam através de glicosaminoglicanos. O tipo V também é combinado com o tipo I, sendo responsável pela formação das fibrilas estriadas uniformes (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

As fibrilas de colágeno possuem propriedades mecânicas e ópticas responsáveis pela focalização ocular e amplamente determinados pelo estroma (LEE et al., 2020). A resistência mecânica dessas fibrilas depende da formação de ligações cruzadas covalentes (OXLUND; SIMONSEN, 1985).

Os fibroblastos são responsáveis por produzir as fibrilas, possuem uma taxa de rotatividade lenta (CRISPIN, 2009), localizam-se entre as lamelas de colágeno, as suas extensões contribuem para a formação e manutenção das lamelas do estroma (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). A transparência da córnea também decorre da organização da matriz extracelular. Para que isso ocorra, o diâmetro uniforme, o arranjo das fibras de colágeno e o espaçamento regular de entrelaçados ortogonais são essenciais (LEE et al., 2020).

Mediante uma lesão estromal, as células epiteliais preenchem o local, ocorre a migração de células do limbo e os fibroblastos derivados de ceratócitos produzem colágeno (CRISPIN, 2009). A regeneração da córnea ocorre pela presença de um reservatório de células-tronco presentes na área de transição entre córnea e esclera (limbo) (PATRUNO et al., 2017), substituído lentamente, pelo crescimento adjacente (cicatrização vascular), pela ativação dos ceratócitos ativos (cicatrização avascular) ou uma combinação dos dois mecanismos (MAGGS et al., 2013).

Após os danos e reparações, o tipo de colágeno instituído no estroma dos felinos é diferente do colágeno original e, outra consequência, é a neovascularização na região lesionada (CRISPIN, 2009). Em suma, a transparência pode ser comprometida quando tiver lesão profunda, por causa da formação de tecido cicatricial e formação de vasos (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). Contudo, a taxa de reposição e reparo do colágeno estromal varia conforme a espécie (MAGGS et al., 2013).

Há outras funções importantes do colágeno estromal, como fornecer resistência à tração, regular a aderência celular, suporte de quimiotaxia e de migração (ROZARIO; DESIMONE, 2010). Posterior ao estroma, encontra-se a membrana elástica de Descemet (membrana limitante posterior).

Membrana Descemet

Situada entre o estroma e o endotélio, ela não é apenas considerada membrana da córnea, mas também é a membrana basal para as células endoteliais (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021), já que é continuamente secretada pelas células endoteliais ao longo da vida (MAGGS et al., 2013).

A penúltima camada da córnea dos felinos consiste numa fina camada altamente elástica. Devido à sua elasticidade, a membrana de Descemet retrai quando danificada (CRISPIN, 2009), sendo facilmente rompida. Ela é produzida ao longo da vida, tornando-se mais espessa conforme os gatos envelhecem (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). Em lesões extensas, o endotélio pode não cobrir a área lesionada, podendo persistir o edema (MAGGS et al., 2013).

Ultraestruturalmente, a membrana Descemet é claramente distinta das demais camadas pela sua fina estrutura. Além disso, é composta por vários tipos de colágenos (I, III, IV, V, VI e VIII), por glicoproteínas e glicosaminoglicanos (sulfato de heparana, laminina e fibronectina tenascina) (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Endotélio da córnea felina

A camada mais interna da córnea contribui para o mecanismo de transporte de fluidos e manutenção do seu estado de deturgescência, mantida ativamente por bombas de sódio e potássio (STADES et al., 2010), sendo uma camada metabolicamente ativa da córnea (COLLIN, 1998).

As células endoteliais da córnea dos vertebrados possuem formato hexagonal (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021), com denotado pleomorfismo em filhotes felinos (MACCALLUM et al., 1983).

O endotélio da córnea do gato, assim como do homem, possui capacidade regenerativa limitada (RODRIGUES et al., 2006). Durante o crescimento do gato, o endotélio de córnea madura apresenta níveis muito baixos de atividade mitótica (ARNDT; REESE; KOSTLIN, 2001). Por essa razão, a hipertrofia e a migração são os mecanismos responsáveis pela manutenção da camada de células endoteliais (MACCALLUM et al., 1983), sendo chamado de pleomorfismo (modificação de sua forma e dos limites celulares) e polimegatismo (aumento de tamanho da célula endotelial). Por isso, os danos endoteliais são mal reparados na maioria das espécies animais adultas, pois as células endoteliais reagem se espalhando fazendo com que o endotélio se torne mais fino (CRISPIN, 2009). Com o avançar da idade do animal, a diminuição da densidade das células endoteliais

resulta em pouca mudança na espessura geral da córnea, porém se persistirem, elas tendem a ficar atenuadas e, conseqüentemente, haverá descompensação da córnea, resultando no edema de córnea (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). A mitose nessas espécies contribui relativamente pouco para o crescimento dessa camada (MACCALLUM et al., 1983). Os poderes de replicação são limitados, exceto em filhotes, pois elas são substituídas por células vizinhas a preencher a lacuna (CRISPIN, 2009).

Danos e perdas precoces desta camada corneana podem ocorrer devido a fatores de afecções hereditárias, traumas, procedimento cirúrgicos, inflamação intraocular, ou glaucoma que levem a distrofia endotelial. Essas afecções podem levar a danos permanentes das células endoteliais, predispondo ao edema e perda da transparência da córnea (MAGGS et al., 2013). Por ser responsável pela manutenção da deturgescência da córnea, quando há alterações da absorção de água, há distorção na regularidade das fibrilas (STADES et al., 2010).

Inervação da córnea

A córnea é ricamente innervada, sendo que as camadas mais superficiais são providas com maiores receptores da dor – por serem amielínicas podem auxiliar na transparência da córnea (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). Nos felinos, a córnea possui nociceptores polimodais e mecanocetores, constituídos por fibras, sensibilidades químicas e mecânicas por transdução (BELMONTE et al., 1991). Os nervos, nos gatos, atingem a córnea através do limbo num padrão radial, dividindo em ramos sensoriais do nervo ciliar longo, que é um ramo da divisão oftálmica do nervo trigêmeo e passa para o epitélio e para o estroma anterior a partir da esclera (STADES et al., 2010). A densidade dos nervos epiteliais é significativamente maior no centro do que na periferia da córnea (HE; PHAM; BAZAN, 2019) e, nos felinos, a córnea é mais sensível do que a de caninos devido à maior densidade de fibras nervosas (KAFARNIK; FRITSCHÉ; REESE, 2008).

O conjunto funcional de nervos é necessário para a manutenção da estrutura e proteção, sendo que a desinervação diminui a permeabilidade e mitose celular, além de predispor afecções (KAFARNIK; FRITSCHÉ; REESE, 2008).

Microscopia eletrônica por varredura

A microscopia eletrônica por varredura (MEV), permite a visualização de estruturas por aumentos de 300.000 vezes ou mais, de detalhes da morfologia e identificação de diferentes estruturas. A sua alta resolução possibilita a visualização tridimensional da córnea felina (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Na literatura há registros de trabalhos com a microscopia eletrônica na córnea canina (ABRAMS et al., 2002), em camelos (ALMUBRAD; AKHTAR, 2012) e, através da microscopia ótica, forneceram relatos de diferentes estruturas da córnea entre as espécies dos mais comuns animais domésticos (PATRUNO et al., 2017). A córnea felina, bem como alterações decorrentes do sequestro da córnea (CULLEN et al., 2005), a arquitetura nervosa (HE; PHAM; BAZAN, 2019) e evidências das células endoteliais dos gatos (MACCALLUM et al., 1983) foram descritas previamente. Este estudo objetivou corroborar com trabalhos anteriores.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram avaliadas duas amostras (dois olhos) oriundas de dois gatos saudáveis, fêmeas, pelo curto brasileiro, com 9 e 11 anos de idade.

Previamente, os animais foram submetidos ao teste lacrimal de Schirmer, tempo de ruptura do filme lacrimal, teste de corante fluoresceína, tonometria de aplanção (Tono-pen[®] XL, Reichert Technologies), e biomicroscopia com lâmpada em fenda (Slit Lamp Kowa[®] SL-15). Seguidos por exame físico completo e laboratoriais (hemograma completo e bioquímico) para excluir alterações sistêmicas. As amostras das córneas foram obtidas mediante o consentimento de seus tutores. Os animais incluídos neste estudo foram a óbito por motivos não relacionados com esta pesquisa.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA-UnB), com número de protocolo 22/2017, atendendo às normas para experimentação animal da Association for Research in Vision and Ophthalmology

(ARVO). As amostras da córnea dos felinos domésticos foram obtidas de animais eutanasiados por motivos não relacionados a esta pesquisa.

2.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras de córnea foram processadas de acordo com protocolos de microscopia eletrônica. Inicialmente as amostras foram fixadas em solução para a preservação dos tecidos oculares composta de glutaraldeído para a estabilização das estruturas celulares e intercelulares pois a fixação com esta substância possui a vantagem da ausência de vacuolização do epitélio e endotélio da córnea (WEIR; COLLINS, A.B., COLLINS, M., 2013) (Fig.1A). Foram fixadas em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, durante 24 h, à temperatura ambiente (28°). Após lavagem com 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio pH 7,2, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 2%, ferricianeto de potássio 1,6% (1: 1 v/v), e 5 mM CaCl₂ em tampão de cacodilato de sódio, pH 7,2, durante 1 h à temperatura ambiente, seguido de lavagem com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,2.

As amostras foram desidratadas numa série ascendente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, e 100%). Subsequentemente, a secagem em ponto crítico (CPD 030, Balzers) foi realizada em CO₂ líquido; após a secagem, as amostras foram fixadas em *stubs* metálicos com fitas de carbono de dupla face. Após a fixação, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm utilizando um metalizador de alto vácuo (Leica EM SCD500), prontas para serem visualizadas por MEV (Fig. 1D). Elas foram repartidas conforme as camadas da córnea, a qual, finalidade é a organização das estruturas. Seguiu-se observação em microscópio eletrônico de varredura por emissão de emissão de campo Jeol JSM-7000F (Jeol)(Fig. 1C).

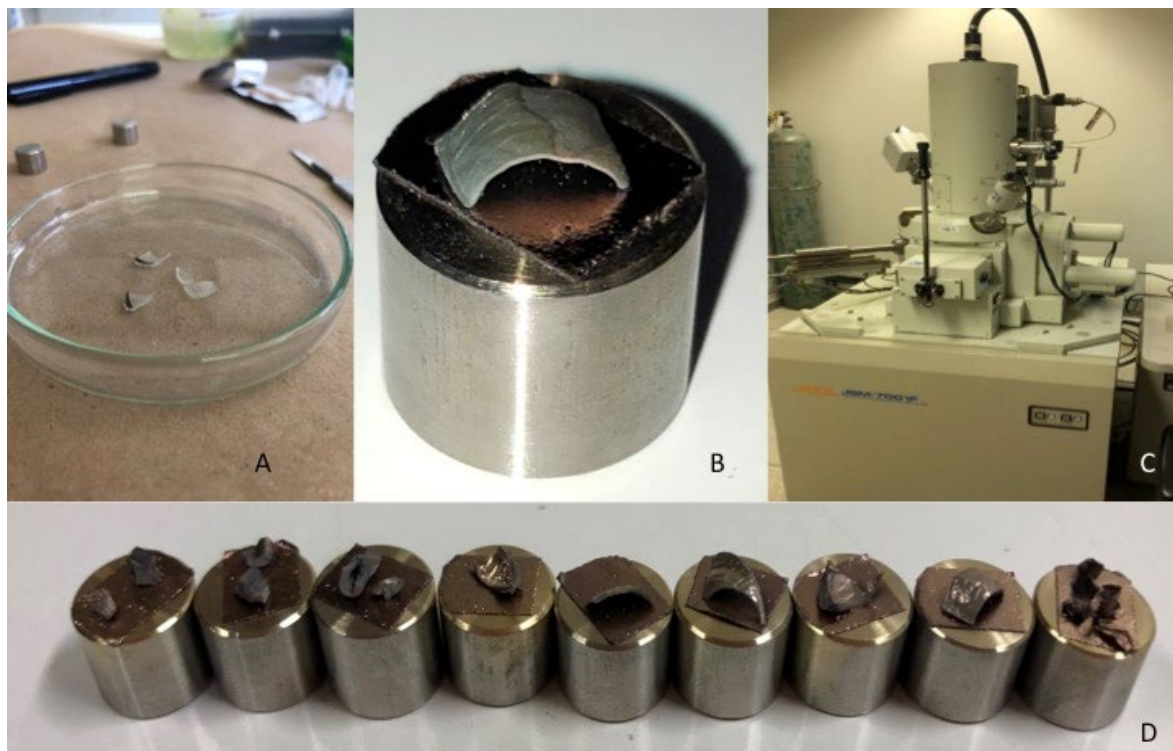


FIGURA 1. A: Amostras de córneas de felinos, em imagem macroscópica. B: Uma amostra da córnea de um gato fixada em *Stub* com fitas de carbono de dupla face. C: Imagem de Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo Jeol JSM-7001F (Jeol). D: Amostras da córnea de felino metalizadas com camada de ouro.

3. RESULTADOS

As imagens da córnea foram obtidas e processadas para a visualização pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A observação por MEV das córneas desses felinos, em aumentos de 120x a 800x, revelaram em aspecto geral a ultraestrutura de três camadas: epitélio, estroma e o endotélio (Fig. 2A). A membrana de Descemet não foi visibilizada em função da sua retração durante o processamento da amostra.

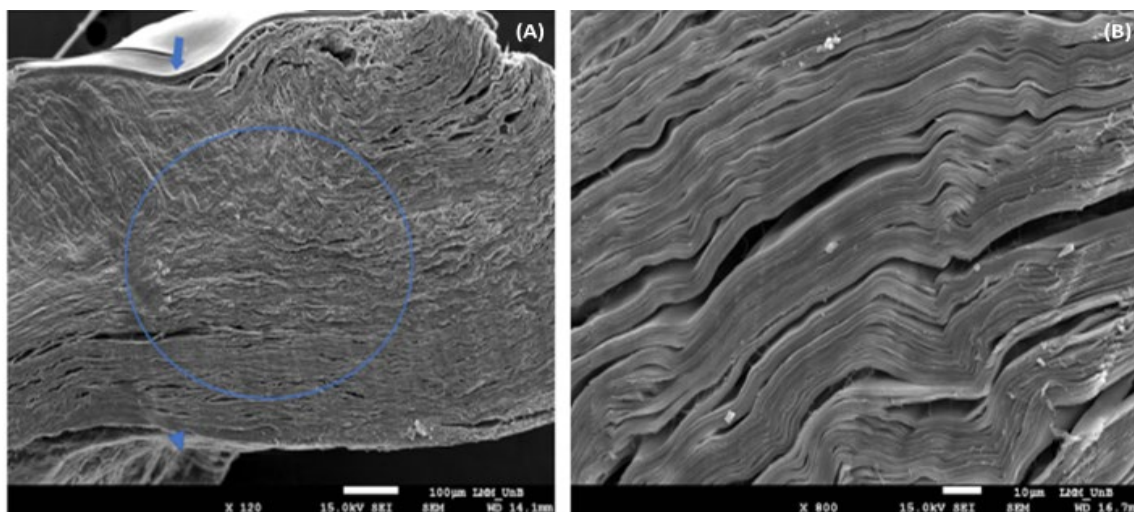


FIGURA 2. MEV de uma córnea de um gato. A, Superfície epitelial da córnea de um gato (seta azul), região estromal da córnea com presença de fibrilas de colágeno (círculo azul), epitélio (ponta de seta). B, Fibrilas de colágeno na região do estroma da córnea do gato.

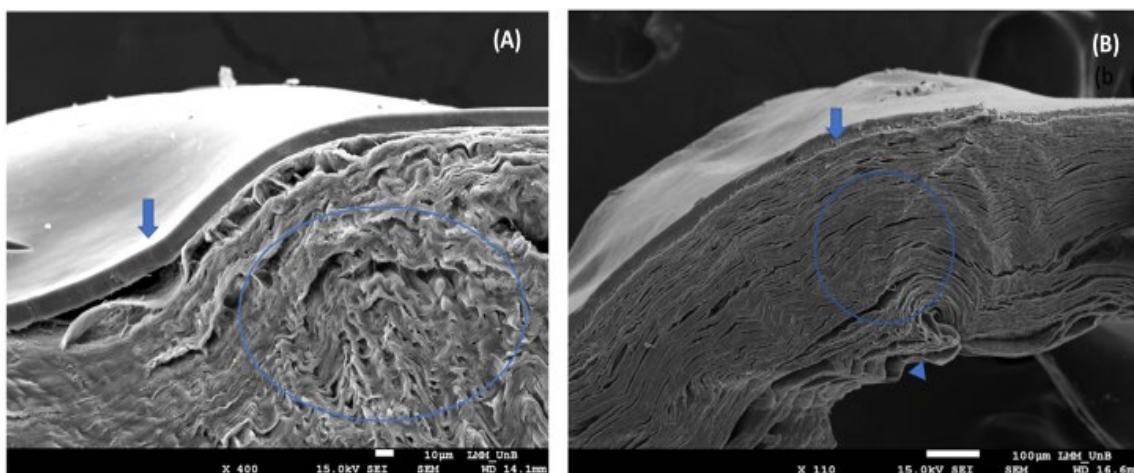


FIGURA 3. MEV de uma córnea de um felídeo doméstico. A, Superfície epitelial da córnea de um gato (seta azul) e estroma da córnea com presença fibrilas de colágeno orientadas em diferentes direções (círculo azul). B, Superfície epitelial da córnea de um gato (seta azul), estroma da córnea numa visão ampla exibindo o padrão de arranjo do colágeno (círculo azul), endotélio (ponta de seta).

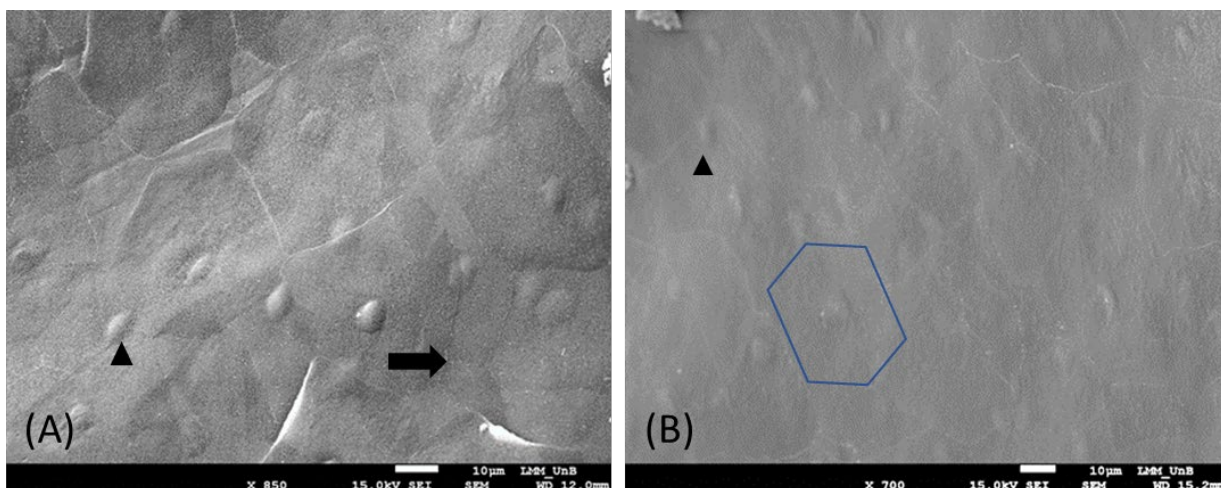


FIGURA 4. MEV de uma córnea de um felino. A, Células do epitélio corneano do gato, observando-se a sobreposição celular deste tecido (seta), núcleos evidentes (ponta de seta). B, Monocamada de células endoteliais, nota-se seu formato poligonal destacado em azul. Núcleos centralizados (ponta de seta).

Na região estromal as fibrilas de colágeno foram orientadas em várias direções e entrelaçadas, formando redes fibrilares soltas, com larguras e espessuras variadas (Fig. 3). Há presença de artefatos em ambas as imagens, resultado do preparo das amostras.

Em uma perspectiva diferente das outras imagens, foi possível observar com maior clareza o padrão de distribuição das células epiteliais (Fig. 4A). e endoteliais nas imagens avaliadas (Fig. 4B). Entre elas, observaram-se células epiteliais poligonais levemente pleomórficas distribuídas em diferentes camadas, com sobreposição das mesmas e com núcleos evidentes (Fig. 4 A). O endotélio da córnea caracterizou-se por uma monocamada de células poligonais uniformes (Fig. 4 B).

4 DISCUSSÃO

A córnea tem origem da superfície ectoderma da divisão embrionária. Constitui-se de epitélio escamoso modificado, subjacente a uma superfície relativamente acelular, chamada de membrana basal, o estroma formado por colágeno, membrana de Descemet, e internamente pelo endotélio (GRAHN; PEIFFER; WILCOCK, 2018). Em nosso estudo, A perfeita distribuição linear das fibras de colágeno do estroma pode ser observada na figs. 2 e 3. Porém, na amostra

da Fig. 2 foi observado um arranjo regular das fibras de colágeno, que não se deu da mesma forma na Fig. 3, pois as amostras foram derivadas de animais diferentes. Essa diferença entre as amostras, pode ter ocorrido durante preparo da amostra, uma vez que os animais não apresentavam alteração clínica da superfície ocular. O padrão de fibrila de colágeno está relacionado à transparência da córnea, onde as redes de colágeno na camada mais internas do estroma contribuem para uma ligação forte entre o estroma e a membrana de Descemet (KOMAI; USHIKI, 1991).

Nesse estudo, é possível visualizar nos cortes de MEV, a presença de fibrilas de colágeno de diferentes tamanhos, separadas em planos e em organização paralela (Fig. 2B, 3B) em uma matriz hidratada de glicoproteína e PGs, essencial para transparência (BIRK et al., 1988). Sabe-se que as fibrilas de colágeno e proteoglicanos (PGs) fornecem a resistência mecânica e sua distribuição uniforme contribui para a transparência da córnea, atuando de maneira importante sobre as deformações e tensões externas (ALMUBRAD; AKHTAR, 2002). Os proteoglicanos ricos em leucina que regulam o diâmetro e espaçamento da fibrila, estão relacionados à transparência óptica (MAJUMDAR et al., 2018).

As lamelas de colágeno na córnea de mamíferos são bandas medindo 10–230 μm de largura e 0,2–2,5 μm em espessura (KOMAI; USHIKI, 1991), mas sua espessura não foi mensurada neste trabalho.

Com uma maior aproximação da imagem (Fig. 2B) do estroma da córnea de um felino é possível notar em sua maioria, as fibrilas de colágeno longas e cilíndricas, com diâmetro uniforme, assim como, a distância de separação regular e paralelas entre si, dentro de camadas (lamelas), corroborando com a literatura (MAGGS et al., 2013). Embora haja ocasional presença de linfócitos, macrófagos e neutrófilos (MAGGS et al., 2013), contudo essas células, não foram observados nas amostras avaliadas neste trabalho.

Observa-se a superfície epitelial com presença de artefatos e de pequenos poros representando caminhos dos nervos inervando o epitélio da córnea, indicada pela seta azul (Fig. 2A,3).

Na literatura há relatos que elas possuem entre duas a três camadas na espécie felina, formando uma zona de transição entre as células basais colunares e as mais superficiais escamosas (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). O

epitélio da córnea tem uma renovação constante graças à presença de células amplificadoras transitórias (TACs) originadas de células-tronco epiteliais (SCHERMER; GALVIN; SUN, 1986), presente ao nível do área de transição entre córnea e esclera (limbo) (PATRUNO et al., 2017). Esta primeira camada da córnea é aderida ao estroma através filamentos de queratina, placa hemidesmossomal e fibrilas de colágeno, se entrelaçam (MIYAGAWA et al., 2001) e ancoram a membrana basal (CRISPIN, 2009). Além disso, nesse trabalho foi observado que o epitélio delgado, corroborando com a descrição anterior em gatos domésticos (PATRUNO et al., 2017). Eles exibem uma configuração especial de aquaporinas (AQPs) que contribui para as propriedades especiais de intumescimento da córnea nesta espécie (NAUTSCHER et al., 2016). Neste trabalho, foi notado células epiteliais poligonais levemente pleomórficas distribuídas em diferentes camadas, com sobreposição das mesmas, planas e com linhas demarcando claramente as interdigitações entre as células (Fig 4). A superfície das células escamosas foi descrita projeções microvilosas ancoradas a camada profunda de mucina do filme lacrimal (MAGGS et al., 2013), o que não foi observado nessa pesquisa.

É discrepante a diferença do estroma em relação as outras camadas (Fig. 2A), sendo responsável por cerca de 90% da espessura da córnea (LEE et al., 2020). A membrana de Descemet não foi visualizada em nesse estudo, em função de sua retração durante o processamento das amostras, provavelmente porque o processo de secagem a ponto frio envolve diferenças de temperatura que contribuíram para esta retração. Estudo sobre a córnea de camelos por microscopia eletrônica identificou estruturas fibrilares presentes em toda a membrana de Descemet (ALMUBRAD; AKHTAR, 2012).

A camada basal dos gatos consiste em células isoprismáticas e de ceratócitos (NAUTSCHER et al., 2016). Nessa amplitude de visualização eletrônica não é possível notar a existência dessas células.

A fig. 4 consiste na visualização da superfície epitelial e endotelial da córnea do gato. Observa-se as células epiteliais e endoteliais com aspecto arredondado e proeminente (Fig. 4), as quais são protuberâncias redondas, onde os núcleos ficam dentro de cada célula - corroborando com a literatura, exceto quanto a

extensão de discretos poros que não foram visualizados nessa pesquisa (ABRAMS et al., 2002).

O endotélio é formado por células com formato hexagonal, planas e com interdigitações nas bordas entre as células endoteliais (Fig. 4B). Estudos utilizando a microscopia ótica também identificou células com formato hexagonal em suínos (CLEROT et al, 2019). Ocasionalmente pode ocorrer pleomorfismo e polimegatismo das células endoteliais. Isso pode ocorrer principalmente em animais mais velhos, que já sofreram diminuição da densidade das células endoteliais ao longo dos anos (RODRIGUES et al., 2006). Através da utilização do microscópio especular, concluíram que realmente existe essa relação entre a diminuição da densidade dessas células. Além disso, relataram aumento da área e o pleomorfismo das células do endotélio – parâmetros que mudam com o avançar da idade (FRANZEN et al, 2010). Estas células separam o humor aquoso localizado na câmara anterior do bulbo ocular, do estroma corneano hidrofílico da córnea (MAGGS et al., 2013).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microscopia eletrônica de varredura traz contribuições à microscopia de luz, dada a detalhada visualização das ultraestruturas que este método permite, podendo ser usado como modelo descritivo da córnea felina em pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABRAMS, George A. et al. Electron microscopy of the canine corneal basement membranes. **Cells Tissues Organs**, v. 170, n. 4, p. 251-257, 2002.

ALMUBRAD, Turki; AKHTAR, Saeed. Ultrastructure features of camel cornea–collagen fibril and proteoglycans. **Veterinary ophthalmology**, v. 15, n. 1, p. 36-41, 2012.

ARNDT, Carmen; REESE, Sven; KÖSTLIN, Roberto. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary ophthalmology**, v. 4, n. 3, p. 175-182, 2001.

BELMONTE, C. et al. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. **The Journal of Physiology**, v. 437, n. 1, p. 709-725, 1991.

BIRK, David E. et al. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *The Journal of cell biology*, v. 106, n. 3, p. 999-1008, 1988.

CLEROT, Lídia Luzia et al. Morphology of endothelial cells from different regions of the swine cornea. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. Vol. 47 (2019), Pub. 1623, 6 p., 2019.

COLLIN, Shaun P.; COLLIN, H. Barry. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 81, n. 6, p. 245-254, 1998.

CRISPIN, Sheila M. (ed.). **Notes on veterinary ophthalmology**. Blackwell Publishing, 2005. p. 177-227. v.1.

CULLEN, Cheryl L. et al. Ultrastructural findings in feline corneal sequestra. **Veterinary ophthalmology**, v. 8, n. 5, p. 295-303, 2005.

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EdIPUCRS, 2007.

FRANZEN, Angela A. et al. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary ophthalmology**, v. 13, n. 4, p. 222-226, 2010.

GILGER, B.C., Wright, J.C., WHITLEY, R.D. & MCLAUGHLIN (1993) Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. **American Journal of Veterinary Research**, 54, 228–230.

GRAHN, Bruce; PEIFFER, Robert; WILCOCK, Brian. **Histologic Basis of Ocular Disease in Animals**. John Wiley & Sons, 2018.

HE, Jiucheng; PHAM, Thang Luong; BAZAN, Haydee EP. Mapping the entire nerve architecture of the cat cornea. **Veterinary ophthalmology**, v. 22, n. 3, p. 345-352, 2019.

KAFARNIK, Christiane; FRITSCHKE, Jens; REESE, Sven. Corneal innervation in mesocephalic and brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal microscopy. **Veterinary ophthalmology**, v. 11, n. 6, p. 363-367, 2008.

KOMAI, Yoshiko; USHIKI, Tatsuo. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 32, n. 8, p. 2244-2258, 1991.

LEE, Sheng-Lin et al. Quantification of collagen structural changes during chick corneal development. **Journal of Biophotonics**, v. 13, n. 1, 2020.

MACCALLUM, D. K. et al. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 24, n. 2, p. 247-250, 1983.

MAGGS, David J. et al. **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. Elsevier Health Sciences, 2013.

MAJUMDAR, Shoumyo et al. Cyclodextrin Modulated Type I Collagen Self-Assembly to Engineer Biomimetic Cornea Implants. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 41, p. 1804076, 2018.

MARTIN, Charles Lloyd et al. **Ophthalmic disease in veterinary medicine**. London: Manson, 2005.

MEEKINS, Jessica M; RANKIN, Amy J; SAMUELSON, Don A. **Ophthalmic Anatomy: Veterinary Ophthalmology**. 6. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2021. v. 1, cap. 2, p. 41-61.

MIYAGAWA, Atsuko et al. Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 651-656, 2001.

MOODIE, K. L. et al. Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. **Veterinary ophthalmology**, v. 4, n. 4, p. 267-272, 2001.

NAUTSCHER, Nadine et al. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. **Veterinary ophthalmology**, v. 19, n. 4, p. 297-304, 2016.

OXLUND, Hans; SIMONSEN, Anders Hjorth. Biochemical studies of normal and keratoconus corneas. **Acta ophthalmologica**, v. 63, n. 6, p. 666-669, 1985.

RODRIGUES, Geórgia N. et al. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2006.

ROZARIO, Tania; DESIMONE, Douglas W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

SCHERMER, Alexander; GALVIN, Sharon; SUN, Tung-Tien. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. **The Journal of cell biology**, v. 103, n. 1, p. 49-62, 1986.

STADES, Frans C. et al. **Ophthalmology for the veterinary practitioner**. Schlütersche, 2010.

PATRUNO, M. et al. Morphological description of limbal epithelium: searching for stem cells crypts in the dog, cat, pig, cow, sheep and horse. **Veterinary research communications**, v. 41, n. 2, p. 169-173, 2017.

WEIR, A.B., COLLINS, M. Assessing ocular toxicology in laboratory animals: molecular and integrative toxicology. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 161-162, 2013.