



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DA CÓRNEA
CANINA E FELINA**

ROSÉLIA DE LIMA SOUSA ARAÚJO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA-DF

FEVEREIRO DE 2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DA CÓRNEA
CANINA E FELINA**

ROSÉLIA DE LIMA SOUSA ARAÚJO

ORIENTADORA: PROF. ^a DR. ^a PAULA DINIZ GALERA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: XX/2024

BRASÍLIA-DF

FEVEREIRO DE 2024

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Araújo, R.L.S., **Análise estrutural e ultraestrutural da córnea canina e felina**, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 73 p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Rosélia de Lima Sousa. Análise estrutural e ultraestrutural da córnea canina e felina /Rosélia de Lima Sousa Araújo. Brasília, 2024. 73 p.

Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, 2024. Orientador Paula Diniz Galera.

1. Transplante, 2. Enxerto, 3. Ceratoplastia, 4. Sequestro de córnea, 5. Cães, 6. Gatos

I. Galera, Paula, orientador.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. ^a Dr. ^a Paula Diniz Galera, (Universidade de Brasília- FAV) (ORIENTADORA)

Prof. Dr. ^a Maria Regina Chalita (Universidade de Brasília – FM)

Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade (FMVA UNESP – Araçatuba)

Prof. ^a Dr. ^a Angélica M. Vaz Safatle (Universidade de São Paulo - USP)

BRASÍLIA/DF, 26 de FEVEREIRO de 2024.

*“Entrega o teu caminho ao Senhor;
confia Nele, e ele tudo fará”*

(Sl. 37. 5)

AGRADECIMENTOS

Enquanto penso em toda a jornada até o momento da escrita destes agradecimentos, é impossível não deixar que as lágrimas molhem meu rosto ao lembrar de cada passo, de todos os que me ajudaram, que seguraram minha mão, que me fizeram chegar aqui, eis meus agradecimentos.

À Deus, por sempre ser meu porto seguro me guiando, sustentando, protegendo e capacitando.

Ao meu pai Severino José (*in memoriam*) que atrás de volantes de caminhões e de ônibus, lutou bravamente para proporcionar o melhor que podia a mim e meus irmãos. A minha mãe, Risalva Lima, que seja cuidando da casa ou tecendo, pintando e vendendo diferentes peças de artesanato, sempre esteve ao lado de meu pai, procurando cuidar de nós. Desde a satisfação de poder comprar um livro novo durante minha infância a se preparem com carinho para viajar de Aliança (PE) até Brasília para presenciarem sua filha se tornar Médica Veterinária, a saber como eu estava realizada em continuar estudando para tratar de olhos vermelhos e com “remela”, pois era assim que ele entendia, sempre foi possível sentir o quanto estavam felizes em ver onde os estudos estavam me levando.

Agradeço de forma muito especial ao meu esposo, Luciano França, por seu amor e apoio incondicional que sempre me impulsionaram e me deram todo o suporte para cumprir cada passo dessa jornada. À minha filha, Ruth França, que cresceu vendo a mamãe estudar, que me acompanhou em tantas aulas, que nunca questionou os momentos que precisei estar distante, que me deu motivos para não desistir, que faz meu coração saltar de alegria ao lhe ver seguindo, brilhantemente, na busca pelos seus objetivos através da educação.

Aos meus avós, aos meus irmãos Rosinete, Sérgio e Samuel, aos meus sobrinhos, aos meus tios, tias e primos, por sempre me ajudarem e se alegrarem comigo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera, que de forma excepcional me orientou, ajudou, confiou a mim o nosso tão querido Serviço de Oftalmologia Veterinária, que foi uma fortaleza e um exemplo singular de como passar pelas adversidades, meu muito, obrigada!

Aos antigos e atuais colegas do Laboratório de Oftalmologia Veterinária - UnB, Ana Carolina Rodarte, Mário Falcão, Ana Raquel Ferreira, Rafaela Tozetti, Clarissa Machado, Rômulo Vitelli, Júlia Batistella, Laura Reis, Fábio Langsch, Paulo Sampaio, Brendha Ferreira

e Aline Carvalho, onde cheguei como estagiária e tive a oportunidade de receber conhecimento por anos, só tenho a lhes agradecer.

Ao Prof. Dr. José Raimundo, por me abrir as portas do Laboratório de Microscopia Eletrônica. À bióloga Ingrid Gracielle por todo o auxílio e tempo dispensados a mim.

Aos professores, Maria Regina Chalita, Alexandre Lima de Andrade, Angélica M. Vaz Safatle e Giane Regina Paludo por sua disponibilidade em contribuir com este trabalho e compor minha banca.

Meus sinceros agradecimentos!!!

ÍNDICE

CAPÍTULO I	13
Resumo.....	13
Abstract	14
1. Revisão de literatura	15
1.1 Justificativa	20
1.2 Objetivos	20
2. Referências.....	21
CAPÍTULO II	26
Avaliação estrutural e ultraestrutural de córneas caninas mantidas em EUSOL-C®, e criopreservadas	26
Resumo.....	27
Abstract	28
Introdução	29
Materiais e métodos	30
Resultados	36
Discussão	47
Conclusão	51
Referências	52
CAPÍTULO III	56
Impacto do sequestro corneano felino na estrutura corneana	56
CONCLUSÃO GERAL	69

Obs.: Os Capítulos II e III encontram-se formatados segundo as normas para publicação do periódico *Veterinary Ophthalmology Journal*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Fases da coleta de amostras. **A** Bulbo ocular, coleta *pos mortem* por enucleação subconjuntival. **B** Obtenção de disco córneo-escleral.
32
- Figura 2.** Tratamento de amostras. **A** Representação esquemática de secção de disco córneo-escleral. **B.** Frações de discos córneo-esclerais. **C.** Temperaturas de preservação.
32
- Figura 3.** Esquema de descarte de bordas das frações de tecido córneo-escleral. **A** Delineamento das bordas. **B.** Corte das bordas.
33
- Figura 4.** Avaliação da opacidade do tecido corneano após 14 dias de conservação em meio Eusol-C[®], visualização de vogal A, fonte Arial 11.
34
- Figura 5.** Avaliação macroscópica de córneas preservadas em Eusol-C[®] e criopreservada a -196°C. **A.** Macroscopia de fragmentos de córnea canina, nota-se a conformação estromal preservada em fragmento mantido no Eusol-C[®] por 14 dias (asterisco azul) contrastando com o abaulamento do estroma da amostra mantida a -196°C pelo mesmo período (ponta de seta vermelha), respectivamente mostrados em B e C. **B.** Corte histológico da mesma amostra preservada em Eusol-C[®]. **C.** Histologia de amostra mantida a -196°C. HE 20x.
40
- Figura 6.** Análise histológica de amostras de córnea canina imunocoradas por E-caderina. Destacando as membranas das células epiteliais e deposições citoplasmáticas em amostras de diferentes estágios de conservação (setas vermelhas). **A.** Membranas fortemente coradas, cortes preservados em Eusol por 14 dias. **B** Áreas de erosão epitelial, evidente perda de camadas de células apicais em amostra conservada por 60 dias no Eusol-C[®], onde destaca-se a aderência das células epiteliais, contorno celular e citoplasma exibindo coloração

pontilhada por E-caderina. **C e D** Amostras em processo de degeneração celular, mantendo a coloração imuno-histoquímica positiva. IHQ 20x.

..... 41

Figura 7. MEV de córnea mantida em meio Eusol-C®. **A** Lamelas de colágeno perfeitamente alinhadas com discreta distensão do espaço interlamelar na periferia do tecido. **B**

Visualização de endotélio corneano, destaca-se as células perfeitamente justapostas de formato hexagonal (contorno branco). **C.** Nota-se o moderado desarranjo lamelar da amostra vista com 28 dias de armazenamento. **D** Abaulamento das lamelas estromais em amostra de tecido mantida congelada a -20°C por 14 dias, com a manutenção das células epiteliais (pontas de seta vermelhas) com bordos lamelares espessados e pouco definidos. **E. F** Amostras mantidas a -80°C por 28 dias com perda de definição entre suas camadas.

.....43

Figura 8. MET de tecido corneano de cão. **A e B** Multicamadas de células epiteliais íntegras

(Ep). **C** Desmossomos (pontas de seta azul). **D** Organização de fibras colágeno estromal (setas azuis). **E** Ceratócito perfeitamente alongado entre fibras de colágeno em corte longitudinal. **F.** Destaca-se o arranjo entrelaçado das fibras de colágeno estromal, corte transversal (estrela amarela), corte longitudinal (estrela branca). **G, H, I** Ceratócitos visualizados em diferentes amostras com adequada conformação estrutural (pontas de seta vermelha).

.....45

Figura 9. MET de Ceratócito localizado em estroma corneano de cão. Célula alongada, com núcleo (Nc) em região central, ocupando aproximadamente 60% do interior celular, vesículas dispersas pelo citoplasma.

.....46

CAPÍTULO III

Figura 1. Fotomicrografias SEM e TEM de estruturas da córnea felina. **A** Epitélio corneano por MEV, multicamadas de células hexagonais. **B** Borda da célula (seta branca) do epitélio da córnea. **C** Núcleo evidente (Nc); **D** Microvilosidades presentes no epitélio da córnea (seta azul). **E** Evidente organização lamelar na córnea saudável. **F** Membrana de Descemet (seta vermelha) e endotélio (estrela azul). **G, H** Fibras de colágeno em córnea saudável exibindo perfeito alinhamento em cortes longitudinais (ponta de seta branca) e transversais (estrelas amarelas).

.....53

Figura 2. Fotomicrografias de sequestro corneano felino obtidas através de MEV. **A** Estroma posterior com moderada preservação lamelar (círculo amarelo). **B, C** Degeneração e perda de estrutura lamelar. **D** Ceratócito degenerado (círculo vermelho).

.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

CRIO - Criopreservação

CPD - Critical Point Drying

FLPR - Filme lacrimal pré-corneano

G - Grupo

HE - Hematoxilina-eosina

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de Varredura

nm – Nanômetros

SEM - Scanning electron microscopy

TLS - Teste Lacrimal de Schirmer

TEM - Transmission electron microscopy

µm – Micrometros

LISTA DE SIGLAS

FLPC - Filme lacrimal pré corneano

ARVO - *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

Hvet - Hospital Veterinário de Pequenos Animais

LMM – Laboratório de Microscopia e Microanálise

IB – Instituto de Biologia

UnB - Universidade de Brasília

CEUA- Comitê de Ética de Uso Animal

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAPÍTULO I

ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DA CÓRNEA CANINA E FELINA

RESUMO

A córnea, avascular e translúcida, exerce fundamentalmente os papéis de proteção e refração ocular, devido a sua ultraestrutura altamente especializada. É composta histologicamente pelo epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. A manutenção estrutural e funcional da córnea está diretamente ligada à função refrativa, sendo a córnea responsável por cerca de 80% do poder refrativo dos olhos. Disfunções e opacidades em qualquer meio de refração - córnea, humor aquoso, lente e o humor vítreo - interferem na formação das imagens.

Afecções corneanas são frequentemente diagnosticadas em cães e gatos. Dentre tais afecções estão as ceratites ulcerativas profundas e as perfurações corneanas. São frequentemente diagnosticados como causas mais comuns de tais lesões em cães, as anormalidades palpebrais e de cílios como, entropião, triquíases, distiquíases, cílios ectópicos, bem como, os traumas por arranhaduras, abrasões, queimaduras químicas e corpos estranhos. Em gatos, o sequestro corneano é elencado como uma das principais afecções que potencialmente podem levar a déficit visual.

Na busca por uma alternativa eficaz para preservação da acuidade visual de cães, os enxertos com tecido corneano têm sido estudados na oftalmologia veterinária, pois geralmente favorecem uma melhor cicatrização e, conseqüentemente, redução de opacidades pós-operatórias e defeitos na curvatura da córnea.

No entanto, embora a córnea seja considerada um o melhor tecido para ceratoplastias penetrantes, discos corneanos frescos nem sempre estão disponíveis na rotina clínica. Além disto, verifica-se uma escassez de estudos na Medicina Veterinária quanto à preservação deste tecido e aos métodos de conservação que permitam seu armazenamento. Este estudo visa analisar por técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e varredura, córneas caninas sadias preservadas a frio em meio Eusol-C® a 4°C e, amostras criopreservadas, bem como avaliar o impacto do sequestro corneano na estrutura e função da córnea felina.

Palavras-chave: transplante, enxerto, ceratoplastia, sequestro de córnea, cães, gatos

STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE CANINE AND FELINE CORNEA

ABSTRACT

The cornea, avascular and translucent, essentially plays the role of ocular protection and refraction, due to its highly specialized ultrastructure. It is histologically composed of the epithelium, stroma, Descemet's membrane and endothelium. The structural and functional maintenance of the cornea is directly linked to the refractive function, with the cornea being responsible for around 80% of the refractive power of the eyes. Dysfunctions and opacities in any refraction medium - cornea, aqueous humor, lens and vitreous humor - interfere with image formation.

Corneal disorders are frequently diagnosed in dogs and cats. Among such conditions are deep ulcerative keratitis and corneal perforations. They are diagnosed as the most common causes of such lesions in dogs, eyelid and eyelash abnormalities such as entropion, trichiasis, distichiasis, ectopic eyelashes, as well as scratch trauma, abrasions, chemical burns and foreign bodies. In cats, corneal sequestration is listed as one of the main conditions that can potentially lead to visual impairment.

In the search for an effective alternative for preserving visual acuity in dogs, corneal tissue grafts have been studied in veterinary ophthalmology, as they generally favor better healing and, consequently, a reduction in post-operative opacities and corneal curvature defects.

However, although the cornea is considered to be the best tissue for penetrating keratoplasties, fresh corneal discs are not always available in the clinical routine. In addition, there is a lack of studies in veterinary medicine on the preservation of this tissue and the conservation methods that allow it to be stored. This study aims to analyze, using light microscopy, transmission and scanning electron microscopy techniques, healthy canine corneas preserved in cold Eusol-C® medium at 4°C and cryopreserved samples, as well as assessing the impact of corneal sequestration on the structure and function of the feline cornea.

Keywords: transplant, graft, keratoplasty, corneal sequestration, dogs, cats

1. REVISÃO DE LITERATURA

A córnea, avascular e translúcida, exerce fundamentalmente os papéis de proteção e refração ocular, devido a sua ultraestrutura altamente especializada (Gipson, 1994; Samuelson, 1999). É composta histologicamente pelo epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Seu epitélio encontra-se em contato direto com o filme lacrimal pré-corneano (FLPC), e é formado por camadas celulares estratificadas que recobrem uma membrana basal composta por laminina e fibrilas de colágeno tipo IV, conectadas por desmossomos.

O estroma é constituído principalmente por colágeno tipo I organizado em fibrilas, dentre outros componentes da matriz extracelular, incluindo os ceratócitos e proteoglicanos. Em forma de treliça, seus arranjos são regulares e formam lamelas bem espaçadas, contribuindo com a função óptica (Saika, 2002, Michelacci, 2003; Qazi *et al*, 2010; Winkler *et al*, 2011; Soh *et al*, 2020, Tinasi *et al*, 2023). Os proteoglicanos dermatan sulfato (decorim) e o queratan sulfato (lumican) possuem funções primordiais para propiciar a organização e manutenção da estruturaestromal,agindo diretamente no enovelamento e preservação do distanciamento lamelar (Michelacci, 2003; Vrana *et al*, 2008).

Posteriormente ao estroma e intimamente ligada ao endotélio está a membrana de Descemet, altamente retrátil, flexível e elástica (Johnson, 1982). O endotélio é constituído por uma única camada celular, com formato poligonal, participando ativamente na manutenção da transparência corneana por funções de barreira, e por contribuição direta na deturgescência (Samuelson, 1999; Fini, 2005; Nautscher *et al*, 2015).

A manutenção estrutural e funcional da córnea está diretamente ligada à função refrativa, sendo a córnea responsável por cerca de 80% do poder refrativo dos olhos (Waring, 1984; Waring III, 1992; Land & Fernald, 1992). Disfunções e opacidades em qualquer meio de refração - córnea, humor aquoso, lente e o humor vítreo - interferem na formação das imagens, gerando astigmatismos e reduzindo a acuidade visual (Pederson *et al*, 2019; Park *et al*, 2022).

Afecções corneanas são frequentemente diagnosticadas em cães e gatos (Grahm 2019; Sebbag & Mochel, 2020), interferindo na homeostase da superfície ocular, podendo levar a densas áreas de opacidade, chegando à perda visual em casos graves. Dentre tais afecções estão as ceratites ulcerativas profundas e as perfurações corneanas, são frequentemente diagnosticados como causas mais comuns de tais lesões em cães, as anormalidades palpebrais e de cílios como, entrópio, triquiases, distiquiases, cílios ectópicos, assim como, os traumas por arranhaduras, abrasões, queimaduras químicas e corpos estranhos (Sebbag *et al*, 2023; Walter *et al*, 2023). Em gatos, o sequestro corneano é elencado como uma das principais afecções que potencialmente podem levar a déficit visual (Voitekha & Shilkin, 2021).

Na busca por uma alternativa eficaz para preservação da acuidade visual de cães, os transplantes de córnea têm sido estudados na oftalmologia veterinária, pois geralmente resultam em melhor cicatrização e, conseqüentemente, redução de opacidades pós-operatórias e defeitos na curvatura da córnea (Marcon *et al*, 2013; Kim *et al*, 2019; Voitekha & Shilkin, 2021). Podem ser definidos como a substituição de um tecido afetado por tecido saudável com o objetivo de melhorar a acuidade visual (função óptica), correção de alterações anatômicas (tectônico), substituição do tecido lesionado, sem resposta a tratamentos clínicos (terapêutico) ou melhora do aspecto ocular (estético) (Marcon *et al*, 2013; Ledbetter & Gilger, 2013).

A córnea é considerada o melhor tecido para ceratoplastias penetrantes, porém discos corneanos frescos nem sempre estão disponíveis na rotina clínica. Além disto, verifica-se uma escassez de estudos na Medicina Veterinária quanto à preservação deste tecido e aos métodos de conservação que permitam seu armazenamento e logo, maior disponibilidade para aplicação imediata, contrastando com o que se observa na Oftalmologia humana, cujos métodos de armazenamento de córneas têm sido extensivamente estudados há décadas (Jang *et al*, 2017). Desde 1949, quando se descobriu a ação crioprotetora do Glicerol, comumente conhecido como glicerina, a comunidade científica tem grande interesse em estudos sobre sua aplicação

na preservação de tecidos, pois atua como um crioprotetor para o armazenamento de tecidos congelados, ligando-se fortemente à água, evitando que as moléculas de água se juntem a um cristal de gelo em crescimento e prevenindo a formação de cristais de gelo entremeando os tecidos. (Bakhach, 2009, Jinyang Li, 2012).

Contudo, buscando outras formas de conservação, em 1968 cientistas japoneses desenvolveram o armazenamento corneano *in situ*, mantendo a córnea no bulbo ocular, mantidos a 4°C em frascos de vidro, contendo meio de cultura líquido enriquecido com sulfato de condroitina, precursores de ATP (adenosina trifosfato), penicilina e estreptomicina. A efetiva preservação da córnea neste meio foi de até quatro dias. Embora tenha tido pouca repercussão fora do Japão, este método ganhou lugar na história como o primeiro meio líquido a preservar a córnea à baixa temperatura (Mizukava *et al*, 1968).

Em 1974, um segundo meio de armazenamento líquido a ser mantido a 4°C foi descrito, com a capacidade de conservar a vitalidade endotelial por até 4 dias. Diferente do método anterior, a córnea foi preservada fora do bulbo ocular e delimitada por uma borda escleral, de forma simples e de baixo custo. A formulação original consistiu em uma mistura de meio de cultura de tecidos, tampão de bicarbonato, dextrano e antibióticos (Lindstrom, 1990).

Posteriormente, foi introduzido o meio K-Sol[®] (Cilco, Huntington, West Virginia), cuja novidade foi a substituição de 5% de dextrano por 2,5% de sulfato de condroitina, visando prolongar o período de preservação do tecido por uma semana. Entretanto, o sulfato de condroitina, por si só, não possuía suficiente força osmótica para evitar o edema corneano, induzido pela preservação. Foram testadas várias combinações dos principais constituintes dos meios de armazenamento, dando origem a novas formulações comerciais. Entre eles, Eusol-C[®] e Optisol GS[®] (Chiron Ophthalmics, Irvine, Califórnia) que se destacam por seu uso generalizado. O Eusol-C[®] (Laboratórios Al. Chi. Mia, Itália) possui em sua composição

dextrana como agente osmótico, piruvato de sódio e glicose como fontes energéticas, aminoácidos, sais minerais e vitaminas como nutrientes, gentamicina como antibiótico, Hepes e bicarbonato como tampões e vermelho de fenol como indicador de pH (Yüksel *et al*, 2016). O Optisol-GS® (Bausch and Lomb, Irvine, CA, E.U.A.) é composto por sulfato de condroitina, dextran 40, solução salina balanceada, Hepes, bicarbonato de sódio, gentamicina, sulfato de estreptomicina, aminoácidos, piruvato de sódio, L-glutamina, 2-mercaptoetanol, água purificada e vermelho fenol, ambos preservam as córneas por até 14 dias a 4°C (Sousa & Barreto, 2017).

A criopreservação foi descrita em 1965 como um método prático e confiável de preservação, empregando temperaturas muito baixas para preservar células e tecidos vivos, estruturalmente intactos, e por um longo período de tempo. Nesta técnica realiza-se a imersão do botão corneoescleral durante 10 minutos em quatro soluções de 1 mL de albumina de soro humano, com concentrações crescentes de sulfóxido de dimetil e sacarose. O frasco contendo a solução e o disco córneo escleral é refrigerado de maneira controlada para -80°C e, depois, transferido e mantido em um tanque de nitrogênio líquido a -196°C (Jang *et al*, 2017).

Além das técnicas úmidas em meios de armazenamento, uma outra forma de conservação é a desidratação em granulado de sílica gel, dessecante (2 - 5 mm), acondicionado em recipientes selados e armazenados à temperatura ambiente. Estudos apontam que a manutenção do material por esta técnica é entre 4 meses a 2 anos, livre de contaminação bacteriana ou fúngica (Voitekha & Shilkin, 2021).

As aplicações das ceratoplastias no homem são direcionadas à afecção apresentada pelo paciente, permitindo um melhor prognóstico em relação ao restabelecimento da acuidade visual (Choi *et al*, 2009; Silva *et al.*, 2016). Como exemplos, pacientes com distrofia endotelial de Fuchs em estágio avançado e ceratopatias bolhosas são submetidos a ceratoplastia endotelial (Doughman *et al*, 1976; Hyunjoo *et al*, 2017; Sampaio *et al*, 2021). Podem se beneficiar da

ceratoplastia lamelar anterior, aqueles com distrofia estromal ou depósitos em estroma anterior (Soh *et al*, 2020; Català *et al*, 2020) resultando, principalmente, na manutenção da função óptica da córnea. Em casos emergenciais, onde se busca inicialmente a restauração da função tectônica, enxertos de espessura total podem ser empregados (Burgos-Blasco *et al*, 2023).

Na Oftalmologia veterinária, frente à elevada demanda de casos emergenciais, a aplicação dos enxertos visando a manutenção das funções tectônicas e terapêuticas são as mais exploradas. Com isso, diferentes tecidos têm sido empregados nas ceratoplastias, a exemplo dos enxertos autólogos, como a transposição córneo-conjuntival e enxertos conjuntivais (Brunelli *et al*, 2007; Cebrian *et al*, 2020), bem como as opções de tecidos heterólogos ou xenólogos, como córnea suína (Brunette *et al*, 2011; Voitekha & Shilkin, 2021), materiais biológicos preservados, a exemplo da membrana amniótica (Barros *et al*, 2005; Kalpravidh *et al*, 2009), cápsula renal (Andrade *et al*, 1999), pericárdio e submucosa intestinal (Galera *et al*, 2014; Dower *et al*, 2021), pele de tilápia (Cavalcanti & Pimentel, 2023), assim como membranas sintéticas compostas por biopolímeros (Galera *et al*, 2014; Dulaurent *et al*, 2014; Lacerda *et al*, 2017; Costa *et al*, 2019, Dower *et al*, 2021).

Sobre o uso de tecido corneano em ceratoplastias veterinárias, são descritas técnicas e aplicações de enxertos preservados a -20°C , conservados a frio (4°), desidratados e frescos (Arndt *et al*, 2001; Lacerda *et al*. 2017; Costa *et al*, 2018). Recentemente um estudo envolvendo 132 animais (81 felinos e 51 caninos) com perfuração corneana total, reportou o uso de tecido corneano heterólogo (córnea suína) criopreservado a -20°C ou desidratados (Voitekha & Shilkin, 2021), com perspectiva de bons resultados. Apesar disto, a ampla utilização de enxertos homólogos, visando menores complicações, encontra algumas limitações na rotina veterinária, como a pouca disponibilidade de córneas doadas, principalmente frente ao apego dos tutores aos seus animais de estimação, além de condições comprovadas de conservação das córneas. Estudos voltados à preservação da viabilidade deste tecido precisam ser incentivados

para o avanço das técnicas de ceratoplastias e a possibilidade de criação de bancos de córnea dentro da Medicina Veterinária.

1.1 Justificativa

Os enxertos com tecido corneano em cães têm sido estudados como uma alternativa eficaz para preservação da saúde ocular. Porém, não há estudos, em cães, que comprovem a viabilidade estrutural da córnea em diferentes meios de preservação em períodos de tempo pré-estabelecidos. Este estudo visa analisar córneas caninas sadias preservadas a frio em meio Eusol-C® a 4°C e, amostras criopreservadas, ambas as técnicas avaliadas por microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e varredura e imuno-histoquímica, com o intuito de avaliar com base na preservação do tecido, o melhor meio, temperatura e prazo de armazenamento. Adicionalmente, avaliar o impacto do sequestro corneano na estrutura e função da córnea felina.

1.2 Objetivos

1. Avaliar, através da análise estrutural de córnea canina preservada em diferentes intervalos de conservação em meio Eusol-C® e por criopreservação a -20° C, -80°C e -196°C, a sua preservação, bem como suas características macro e microscópicas após períodos de congelamento e descongelamento.
 - 1.1 Avaliar com o uso da imuno-histoquímica, microscopias de luz, eletrônica de varredura e transmissão, a manutenção da estrutura celular de córneas caninas preservadas.
2. Descrever as alterações e impactos na estrutura e funções na córnea felina acometida pelo sequestro corneano.

2. REFERÊNCIAS

1. Andrade A, Laus J. & Figueiredo F. The use of preserved renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 1999, 2, 79–82
2. Arndt C, Reese S, Kostlin R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol-GS. *Veterinary Ophthalmology* 2001;4(3):175-182.
3. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 2009, 5(3), 119–126.
4. Barros PS, Safatle AM, Godoy CA, et al. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Veterinary Ophthalmology*, 2005, 8, p.189–192.
5. Brunelli ATJ, Vicente FAM, Chahud F, Oriá, AP, Bolzan AA, Campos CF, Doria FA, Laus, J.L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2007, 59, n.5, p. 1194-1204.
6. Brunette I, Rosolen SG, Carrier M, Abderrahman M, Nada O, Germain L, Proulx S. Comparison of the pig and feline models for full thickness corneal transplantation. *Veterinary Ophthalmology* 2011, 14(6):365-77.
7. Burgos-Blasco B, Vidal-Villegas B, Collado-Vincueria I, Soria-García AM, Cuiña-Sardiña R, Mendez-Fernandez R, Diaz-Valle D, Ariño-Gutierrez M. Clinical outcomes of long-term corneas preserved frozen in Eusol-C used in emergency tectonic grafts. *Cell Tissue Bank*. 2023, 24:351–356.
8. Català P, Vermeulen W, Rademakers T, Antoon van den B, et al Transport and Preservation Comparison of Preloaded and Prestripped-Only DMEK Grafts. *Cornea* 2020; 39:1407–1414
9. Cavalcanti MC, Pimentel ML. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como enxerto para reparo corneal em cães: Revisão. *Pubvet*, 2023, 17(13): e1518.
10. Cebrian P, Escanilla N, Lowe RC, Dawson C, Sanchez R.F. Corneo-limbo-conjunctival transposition to treat deep and perforating corneal ulcers in dogs: A review of 418 eyes and corneal clarity scoring in 111 eyes. *Veterinary Ophthalmology*, 2020, 24, n.1, 48-58.
11. Choi JA, Jin, HJ, Jung S. *et al.* Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing in vitro. *Molecular Vision*, 2009, v,15, p. 2230-2238.

12. Costa D, Leiva M, Sanz F. et al. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. *Veterinary Ophthalmology*. 2019;1–8.
13. Costa D, Leiva M, Naranjo C, et al. Cryopreservation (-20° C) of canine corneoscleral tissue: histological, microbiological, and ultrastructural study. *Veterinary Ophthalmology*, 2018, 21, 556–564
14. Doughman DJ, Van Horn DL, Rodman W, Byrnes P, Lindstrom RL. Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol*. 1976 ;94:1791- 1796.
15. Dower NMB, Ribeiro AP, Gomes LG. et al. Concentrations of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and hyaluronic acid in canine amniotic membranes cryopreserved for different time points and its effects in dogs with complicated corneal ulcers. *Veterinary Ophthalmology*. 2021; 00:1–11.
16. Dulaurent T, Azoulay T, Gouille F, et al. Use of bovine pericardium (Tutopatch) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. *Veterinary Ophthalmology*, 2014; 17, 2, 91–99.
17. Fini, ME & Stramer, BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Córnea*, 2005, v.24, supl1, S2–S11.
18. Galera PD, Ribeiro CR, Sapp HL, Coleman J, Fontes W, Brooks DE, Proteomic analysis of equine amniotic membrane: characterization of proteins. *Veterinary Ophthalmology*, 2014; 1–12.
19. Gipson, I.K. Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. In: SMOLIN, G.; THOFT, R.A. (Eds.) *The Cornea: scientific foundations and clinical practice*. Boston: Little Brown, 1994. p.3-24.
20. Grahn B, Peiffer R, Wilcock B. Diseases of the córnea. In: *Histologic Basis of Ocular Disease in Animals*. Ed. Grahn B, Peiffer R, Wilcock B. John Wiley & Sons: Hoboken, 2019;143-180.
21. Hyunjoo JL & Wuqaas MM. Eventual Endothelial Failure After Initial Corneal Clearing After a Detached Endothelial Graft in Fuchs Dystrophy, *Cornea*. 2017;36:241–243.
22. Jang TH, Park Yang, JH, Kima, JY, Hong SE, Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 2017, 12-18.
23. Jinyang L, Shuai S, Xin Z, Shouxiang N, Yu W, Christine AC, Wei C. Comparison of Different Methods of Glycerol Preservation for Deep Anterior Lamellar Keratoplasty

- Eligible Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012, Vol.53, 5675-5685.
24. Johnson, D.H., Bourne, W.M., Campbell, R.J. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal cornea. *Arch. Ophthalmol.*, v.100, p.1942-47,1982.
 25. Kalpravidh M, Tuntivanich P, Vongsakul S, et al. Canine amniotic membrane transplantation for corneal reconstruction after the excision of dermoids in dogs. *Veterinary Research Communication*, 2009, 33, p.1003–1012.
 26. Kim J, Ji, Dong-Beom; Takiyama, N et al. Corneal collagen cross-linking following superficial keratectomy as treatment for corneal endothelial cell dystrophy in dogs: Preliminary clinical study. *Veterinary Ophthalmology*, 2019, 22, 4, 440–447
 27. Lacerda RP, Gimenez MTP, Laguna F, et al. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 2017, 20: 3, 222–231.
 28. Land MF, Fernald RD. The evolution of eyes. *Annu Rev Neurosci*. 1992;15:1-29.
 29. Ledbetter EC. & Gilger B. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: *Veterinary Ophthalmology* (eds Gelatt, K.N., Gilger, B.C. & Kern, T.J.), 5th ed., 2013. 976–1049. Ames, IA: Wiley-Blackwell
 30. Lindstrom RL. Advances in corneal preservation. *Tr Am Ophthalmol Soc* 1990;88:555-648.
 31. Marcon, ÍM. et al. Transplante de Córnea e Banco de Olhos. In: ELSEVIER (Ed.). Manual de Doação e Transplantes. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 1:6, 163- 174.
 32. Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2003. 36, n.8, 1037-1046.
 33. Mizukava T, Manabe R. Recent advances in keratoplasty with special reference to the advantage of liquid preservation. *Nihon Ganga Kiyo* 1968; 19 (12):1310-1318.
 34. Nautscher N, Bauer A., Steffl M, Amselgruber WM. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea, *Veterinary Ophthalmology*. 2015, p. 1-8.
 35. Park, S., Sebbag, L., Moore, B.A. et al. Multimodal ocular imaging of known and novel corneal stromal disorders in dogs. *BMC Vet Res*. 2022, 18, 117.
 36. Pederson SL, Cleymaet AM, Hess AM, Wotman KL, Freeman KS. Surgically induced astigmatism in canines following sutured dorsonasal vs dorsotemporal clear corneal incisions. *Veterinary Ophthalmology*. 2019;1–8

37. Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull.* 2010. 15;81(2-3):198-210.
38. Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, Liu, CY, Kao, WWY. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Córnea*,2002, n.21, supl.1, p.S23–S29.
39. Samantha LP, Allison MC, Ann MH, Kathryn L. Wotman, KS Surgically induced astigmatism in canines following sutured dorsonasal vs dorsotemporal clear corneal incisions. *Veterinary Ophthalmology.* 2019;1–8
40. Sampaio TL, Rodrigues IP, Cresta MBL, Queiroz ACO, Victor TNDF, Pontes DFS, de Araújo WN, Bão SN, Chalita MRC. Factors influencing endothelial cell density of corneas for transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2021, 22(2):263-275
41. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K.N. *Veterinary ophthalmology.* 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.31-150.
42. Sebbag L, Mochel JP. An eye on the dog as the scientist's best friend for translational research in ophthalmology: Focus on the ocular surface. *Med Res Rev.* 2020 Nov;40(6):2566-2604.
43. Sebbag L, Silva APS, Santos ÁPB, Raposo ACS, Oriá AP. An eye on the Shih Tzu dog: Ophthalmic examination findings and ocular surface diagnostics. *Veterinary Ophthalmology.* 2023; 26: 59-71.
44. Silva RED, et al. Perfil epidemiológico dos doadores de córnea do Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Oftalmologia,* 2016. 75:4, 274-278.
45. Soh YQ, Kocaba V., Weiss JS, Jurkunas UV, Kinoshita, S Anthony J. Aldave and Jodhbir S. Mehta. Corneal dystrophies. *NATURE reviews* 2020, 6:46.
46. Tinasi ALSN, Silveira CBB, Honsho CS, Laus JL, Aldrovani M. Birefringence analysis of collagen supraorganization in cat corneas with tropical keratopathy. *Veterinary Ophthalmology.* 2023; 00:1–9
47. Voitekha MA, Shilkin AG. A comparison between dehydrated and cryopreserved heterologous corneal grafts for penetrating keratoplasty in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology.* 2021; 00:1–11.
48. Vrana E, Builles N, Hindie M, Damour O, Aydinli A, Hasirci V. Contact guidance enhances the quality of a tissue engineered corneal stroma. *Journal of biomedical materials research,* 2008, 84(2):454-63.
49. Walter H, Bilotta T, Goncalves C, Busse C. A combination of modified Kuhnt–Szymanowski and Celsus–Hotz techniques for correction of entropion and overlong lower eyelids in dogs (40 eyes). *Veterinary Ophthalmology.* 2023; 00: 1-10.

50. Waring III, G.O. Corneal Anatomy and Physiology as Applied to Refractive Keratotomy. In: WARING III, G.O. Refractive keratotomy for myopia and astigmatism. St. Louis: Mosby, 1992. p.17-35.
51. Waring, G.O. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H. Corneal disorders: clinical diagnosis and management. Philadelphia: WB Saunders, 1984. p.3-25.
52. Winkler M, Chai D, Kriling S, *et al.* Non-linear optical macroscopic assessment of 3-D corneal collagen organization and axial biomechanics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011; 52:8818-27.
53. Yuksel B, Uzunel UD, Kusbeci T. Endothelial cell viability of donor corneas preserved in Eusol-C corneal storage medium. *Exp Clin Transplant*. 2016;14(4):441-444.

CAPÍTULO II

Avaliação estrutural e ultraestrutural de córneas caninas mantidas em EUSOL-C[®], e criopreservadas

Structural and ultrastructural evaluation of canine corneas maintained in EUSOL-C[®] and cryopreserved

Running Title: Ultrastructure of preserved canine cornea

Rosélia L.S. Araújo¹, José R. Corrêa² e Paula D. Galera³

¹ DVM, Msc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

² Dsc., Msc. Laboratório de Microscopia e Microanálise, Instituto de Ciências Biológicas, Professor Associado, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

³ DVM, Dsc., Msc. Laboratório de Oftalmologia Comparada, Professor Associado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Address communications to:

P.D.Galera

Tel: +55 61 98345-3330

e-mail: dra.paulagalera@gmail.com

Agradecimentos: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de aprovação ética: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, sob número de protocolo 23106.064222/2021-19, seguindo as normas de experimentação animal da Associação de Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO)

Obs.: O Capítulo II encontra-se formatado segundo modelo de submissão de artigos para publicação do periódico *Veterinary Ophthalmology Journal*

RESUMO

Objetivo: Avaliar as características estruturais e ultraestruturais de córneas caninas preservadas em meio Eusol-C[®] e criopreservadas, em diferentes temperaturas, utilizando-se técnicas de microscopia de luz e eletrônica, aliadas a estudo imuno-histoquímico.

Animais estudados: Três cães (Schnauzer, Shih tzu e Boxer), sem alterações oculares, histórico ou suspeita de patologias sistêmicas com repercussão ocular, eutanasiados devido a complicações de doença renal crônica, shunt portossistêmico e cardiomiopatia, respectivamente.

Procedimentos: Foram coletadas as duas córneas de cada um dos cães, em até 6 horas após a eutanásia dos mesmos. Os discos córneo-esclerais foram seccionados e divididos em duas porções iguais. O grupo Eusol (n = 4) foi mantido em Eusol-C[®] (Alchimia, Ponte San Nicolo, Itália) a 4°C (Fig 1), e o grupo Crio (n = 4, para cada temperatura de conservação) em Solução oftálmica a 0,3% de Ofloxacin (Oflox[®], Allergan, Brasil) a -20°C, -80°C e a -196°C. Após o acondicionamento por períodos de 14 dias, 28 dias e 60 dias, as amostras foram, respectivamente, submetidas à avaliação macroscópica e processadas para microscopia de luz, imuno-histoquímica (E-caderina), microscopias eletrônicas de transmissão e varredura.

Resultados: As avaliações macroscópicas e por microscopia de luz revelaram que as amostras mantidas por 14 dias em Eusol-C[®] e criopreservadas a -80°C com menores graus de alterações em relação as demais. Todas as amostras de G Eusol e G Crio exibiram alto grau de degeneração após 60 dias de preservação. Por imuno-histoquímica, a expressão da E-caderina foi positiva nas membranas epiteliais de todas as amostras. Por MEV amostras mantidas por 14 dias em meio Eusol-C[®] exibiram boa preservação. Nos cortes de tecido congelados observou-se espessamento dos arranjos lamelares do estroma. A análise por MET evidenciou a manutenção da celularidade epitelial e estromal, bem como as características dos ceratócitos nos tecidos corneanos mantidos por 14 dias.

Conclusão: O meio Eusol e a criopreservação a -80°C aos 14 dias mantiveram melhores características estruturais da córnea. No entanto, para atestar a viabilidade de sua implantação, são necessários estudos clínicos utilizando enxertos mantidos em tais métodos de preservação.

Palavras-chave: transplante, enxerto, ceratoplastia, banco de córneas, cães

ABSTRACT

Objective: To evaluate the structural and ultrastructural characteristics of canine corneas preserved in Eusol-C® medium and cryopreserved at different temperatures, using light and electron microscopy techniques, combined with immunohistochemical studies.

Animals studied: Three dogs (Schnauzer, Shih tzu and Boxer), with no ocular changes, history or suspicion of systemic pathologies with ocular repercussions, euthanized due to complications of chronic kidney disease, portosystemic shunt and cardiomyopathy, respectively.

Procedures: Both corneas from each dog were collected within 6 hours after their euthanasia. The corneoscleral discs were sectioned and divided into two equal portions. The Eusol group (n = 4) was kept in Eusol-C® (Alchimia, Ponte San Nicolo, Italy) at 4°C (Fig 1), and the Crio group (n = 4, for each storage temperature) in Solution ophthalmic 0.3% Ofloxacin (Oflox ©, Allergan, Brazil) at -20°C, -80°C and -196°C. After conditioning for periods of 14 days, 28 days and 60 days, the samples were, respectively, subjected to macroscopic evaluation and processed for light microscopy, immunohistochemistry (E-cadherin), transmission and scanning electron microscopy.

Results: Macroscopic and light microscopy evaluations revealed that the samples kept for 14 days in Eusol-C® and cryopreserved at -80°C had lower degrees of changes compared to the others. All G Eusol and G Crio samples exhibited a high degree of degeneration after 60 days of preservation. By immunohistochemistry, E-cadherin expression was positive in the epithelial membranes of all samples. By SEM, samples kept for 14 days in Eusol-C® medium showed good preservation. In frozen tissue sections, thickening of the stromal lamellar arrangements was observed. TEM analysis showed the maintenance of epithelial and stromal cellularity, as well as the characteristics of keratocytes in corneal tissues maintained for 14 days.

Conclusion: Eusol medium and cryopreservation at -80 C° at 14 days maintained better structural characteristics of the cornea. However, to confirm the feasibility of its implantation, clinical studies using grafts maintained in such preservation methods are necessary.

Keywords: transplant, graft, keratoplasty, cornea bank, dogs

1. INTRODUÇÃO

A visão ocorre pela perfeita sintonia de fatores anatômicos, fisiológicos e físicos, através da passagem de luz pelos meios refringentes do olho.¹ No entanto, doenças oculares, sejam elas sistêmicas ou focais, interferem na homeostase corneana levando ao seu desequilíbrio e comprometendo a acuidade visual.²

As ceratites ulcerativas, ceratites pigmentares crônicas, distrofias e degenerações, frequentemente são diagnosticadas em cães e gatos. Ceratites ulcerativas profundas, com exposição do estroma corneano, endotélio ou membrana de Descemet, assim como as que culminam em perfuração ocular, estão entre as mais graves afecções na clínica oftálmica de pequenos animais.³

Diferentes técnicas de ceratoplastias utilizando-se enxertos autólogos, heterólogos ou xenólogos têm sido utilizadas no tratamento de lesões corneanas.^{3,4,5} Apesar disso, a busca pela transparência e manutenção da refração da córnea após a correção cirúrgica tem sido um desafio, e o emprego de tecido corneano têm merecido atenção na oftalmologia veterinária.⁶

O transplante de córnea pode ser definido como a substituição de um tecido afetado por tecido saudável, com o objetivo de melhorar a acuidade visual (função óptica), corrigir alterações anatômicas (tectônico), ou substituir o tecido lesionado, sem resposta a tratamentos clínicos (terapêutico) ou melhora do aspecto ocular (estético).^{2,7} Amplamente utilizados na oftalmologia humana, os discos corneanos geralmente são conservados a frio, visando a redução ou inibição do metabolismo celular e preservação estrutural dos tecidos.⁶

Na Medicina Veterinária a carência de córneas disponíveis para o uso imediato têm sido uma barreira para a realização deste procedimento. Nos últimos anos, foram descritos estudos sobre o uso de enxertos heterólogos criopreservados aplicados em ceratoplastias penetrantes e lamelares em cães e gatos.⁸ Porém, não é de conhecimentos destes autores,

estudos comparativos que avaliem alterações estruturais decorrentes dos métodos de conservação do tecido corneano de cães, bem como os efeitos inerentes ao congelamento e descongelamento de tais tecidos.⁹

Propõem-se por meio deste estudo, avaliar os aspectos estruturais e ultraestruturais de explantes de córneas de cães, após períodos distintos de preservação a 4°C em meio Eusol-C®, e de amostras criopreservadas a -20° C, - 80° C e a -196° C, assim como, as alterações secundárias ao congelamento e descongelamento destas amostras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Animais

Foram coletados olhos de 3 cães (Tabela 1) provenientes da rotina clínica de hospitais veterinários parceiros. Os olhos foram submetidos à avaliação por biomicroscopia com lâmpada em fenda (Slitlamp Kowa® SL-15) e teste de coloração com fluoresceína. Excluíram-se animais com afecções em superfície corneana, e com alterações sistêmicas com repercussão ocular. Todos os pacientes foram incluídos mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos tutores. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA-UnB), com número de protocolo 23106.064222/2021-19, atendendo às normas para experimentação animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

	Raça	Idade	Sexo	Causa do óbito	Coleta <i>pos mortem</i>
<i>Amostra 1</i>	Schnauzer	5 anos	Macho	Doença renal crônica	20 min
<i>Amostra 2</i>	Shih tzu	1 ano	Macho	Shunt portossistêmico	30 min
<i>Amostra 3</i>	Boxer	6 anos	Fêmea	Cardiomiopatia	6 horas

Tabela 1. Dados dos cães doadores.

2.2 - Coleta e processamento das amostras

2.2.1 Obtenção e armazenamento das amostras

Foram coletados bulbos oculares *post mortem* de 3 cães, dois de cada indivíduo, somando 6 bulbos, através de enucleação subconjuntival em um período de até seis horas após o óbito. Posteriormente os discos córneo-esclerais foram obtidos por meio de incisões perilimbais em 360°, limpos e descontaminados por lavagens consecutivas em solução salina isotônica estéril e solução de iodo-povidona a 5% (Fig. 1).¹⁰ As amostras foram obtidas com a mínima manipulação, a fim de evitar danos à superfície corneana. No caso do animal 3, cuja coleta foi realizada 6 horas após o óbito, o corpo foi mantido refrigerado até o momento da coleta das córneas.

Os discos foram divididos em duas porções iguais, dando origem a 4 fragmentos de tecido corneano de cada animal, somando um total de 12 amostras, separadas em dois grupos: G (grupo) Eusol, composto por 1 fragmento de cada cão, refrigerado a 4°C em Eusol-C® (Alchimia, Ponte San Nicolo, Itália);¹¹ e o G (grupo) Crio, 3 fragmentos de córnea de cada animal, totalizando 9 amostras, foram criopreservadas em solução oftálmica de Ofloxacin 0,3% (Oflox[®], Allergan, Brasil),^{12,13} em 3 diferentes temperaturas, -20°C, -80°C e -196°C (Fig 2).^{5, 14, 15} As amostras mantidas a 4°C foram acondicionadas em refrigerador (Cônsul, Frost Free, modelo CRB 19AB), as congeladas a -20°C em freezer (Cônsul, Frost Free, modelo CRB 19AB) (Costa et al, 2018), aquelas mantidas a -80°C em Ultrafreezer (UltraFreezer -80°C, Panasonic VIP Plus, modelo MDF-U-56VC), e as mantidas a -196°C, foram armazenadas em botijões com nitrogênio líquido. Todas as amostras foram gradativamente congeladas, de acordo com cada temperatura previamente estabelecida (-20°C, -80°C e -196°C), e posteriormente descongeladas até chegar à temperatura ambiente, para realização das análises; não foram usados crioprotetores. Os períodos de armazenamento foram atribuídos aos

respectivos intervalos de tempo (14, 28 e 60 dias). Após cada descongelamento, as bordas de cada fragmento foram seccionadas e descartadas (Fig. 4),¹⁰ e cada fração foi imediatamente submetida à avaliação macroscópica, seguida do preparo para as técnicas de microscopia. Córneas frescas (controle) seguiram o mesmo processo de descontaminação e processamento.

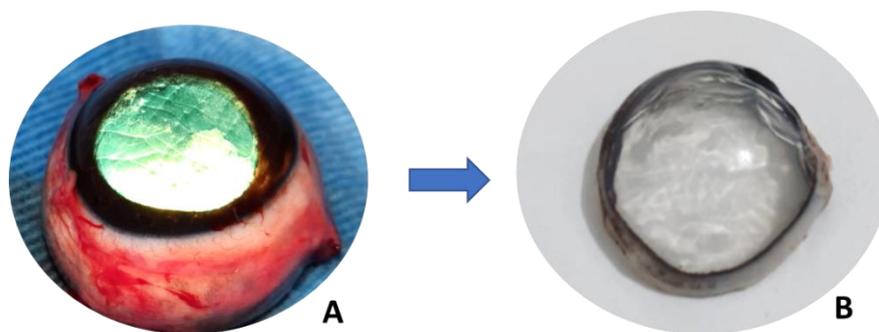


Figura 1. Fases da coleta de amostras. **A** Bulbo ocular, coleta *pos mortem* por enucleação subconjuntival. **B** Obtenção de disco córneo-escleral.

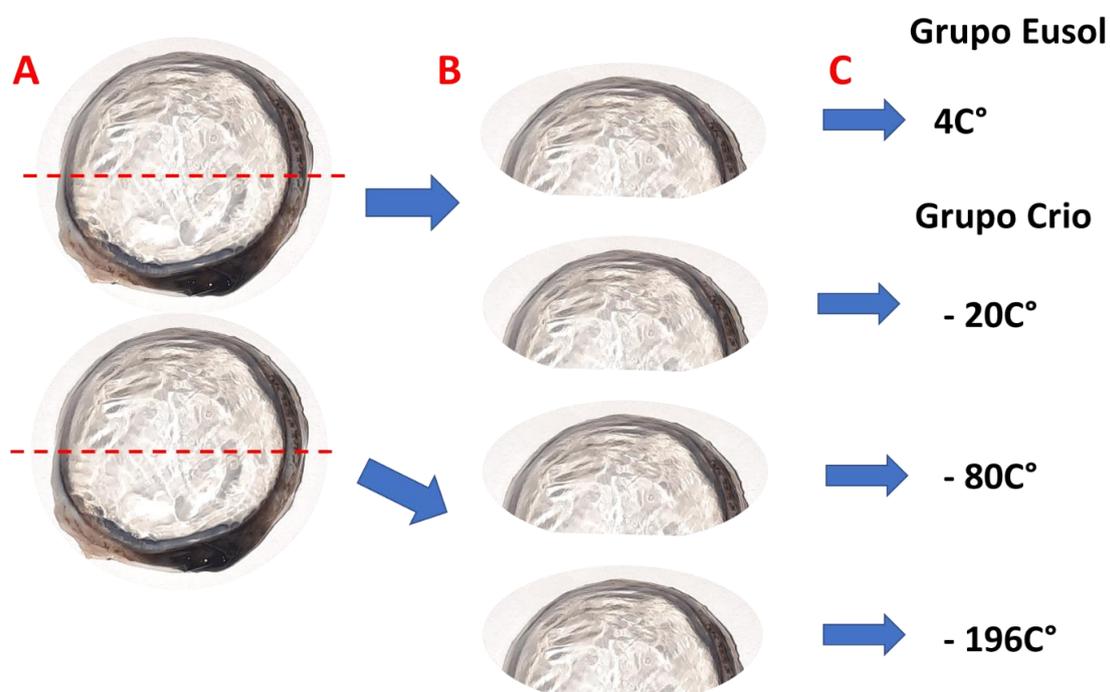


Figura 2. Tratamento de amostras. **A** Representação esquemática de secção de disco córneo-escleral. **B.** Frações de discos córneo-esclerais. **C.** Temperaturas de preservação.

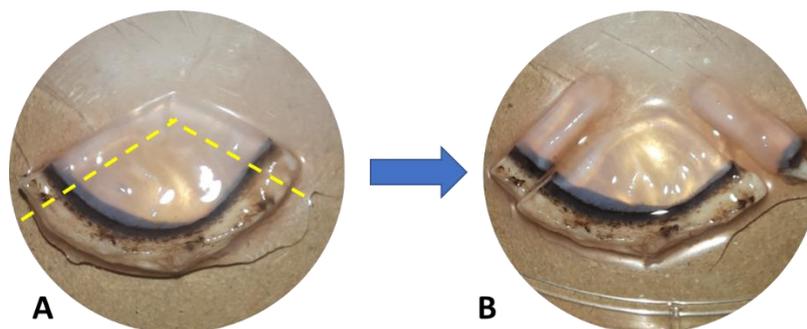


Figura 3. Esquema de descarte de bordas das frações de tecido córneo-escleral. **A** Delineamento das bordas. **B.** Corte das bordas.

2.3 - Processamento das amostras

2.3.1 Avaliação macroscópica

Após os períodos estipulados de armazenamento e posterior resfriamento e/ou descongelamento, as amostras foram avaliadas quanto ao estado macroscópico de conservação pela análise de sua transparência e preservação de arquitetura estrutural.

As secções córneo-esclerais foram distribuídas em placas de Petri e depois posicionadas sobre a impressão de uma linha de fonte Arial de 11 pontos (Fig. 4).¹⁶ A avaliação da transparência e distensão macroscópica do tecido foi realizada por um único observador com os olhos desarmados. O grau de opacidade de cada amostra foi atribuído de acordo com a seguinte classificação: 0 (transparente), 1 (neblina); e 2 (opacidade). Os parâmetros da espessura (arquitetura tecidual) foram mensurados de 0-4, mediante a observação de: 0 (arquitetura preservada), 1 (distensão estromal sutil a óbvia), 2 (estroma irregular, abaulado).¹⁶



Figura 4. Avaliação da opacidade do tecido corneano após 14 dias de conservação em meio Eusol-C[®], visualização de vogal A, fonte Arial 11.

2.3.2 *Microscopia*

2.3.2.1 *Microscopia de luz*

Amostras de córnea canina foram fixadas em solução de formaldeído a 10% durante 24 horas. Ato contínuo, foram seccionadas e processadas rotineiramente para exame histopatológico, incluídas em parafina, cortadas a 5 μ m de espessura e coradas com hematoxilina/eosina (HE).

As lâminas de vidro foram visualizadas, avaliadas e digitalizadas com o uso do microscópio Opticam modelo O500R FLUO (Opticam. Microscopy Technology[®]). Para obtenção da distância do epitélio ao endotélio, foram realizadas mensurações com o software OPTHD (Opticam Microscopy Technology[®]).¹⁷

2.3.2.2 – *Imuno-histoquímica*

Foi realizada a imunocoloração para E-caderina, glicoproteína de adesão intercelular fundamental para a manutenção da polaridade e arquitetura epitelial.¹⁸ Para tal, os blocos de parafina contendo as amostras de córnea foram cortados a 4 μ m de espessura, desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol e lavados em água destilada. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor em

solução de pH alto (Target Retrieval solution High pH-DM828, K800221-2 EnV FLEX+, High pH Link, DAKO) na panela de pressão (PascalR, Dako). Posteriormente, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento e lavadas com água deionizada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio pronto para uso (EnVision™ FLEX PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT SM801, K800221-2 EnV FLEX+, High pH Link, DAKO). Após essa etapa os cortes foram lavados em solução tris (pH 7,4). Os sítios inespecíficos foram bloqueados, com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum-free – DAKO, X0909). A incubação com anticorpo primário E-caderina, clone HECD-1, foi realizada por 18 horas a 4°C. Como sistema de amplificação e detecção utilizou-se o EnVision FLEX/HRP, SM802 (Dako) e o cromógeno diaminobenzidina (EnVision FLEX DAB+CHROMOGEN, DM827, DAKO). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris. ¹⁹

2.3.2.3 - Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

Frações de córnea canina foram seccionadas em fragmentos de 3mm de diâmetro, fixadas em paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 24 h, à temperatura ambiente. Após lavagem em 0,1 M de cacodilato de sódio tampão pH 7,2, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 2%, 1,6% ferricianeto de potássio (1: 1 v/v) e 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, durante 1 h, à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. As amostras foram mantidas durante 24 h em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% a 4°C, lavadas em água destilada e desidratadas numa série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). O material foi embebido numa mistura de (3:1 v/v) acetona/resina Spurr (Eletron Microscopy Sciences, Co.) durante 6 h, (2: 1 v/v) acetona/resina Spurr durante a noite, (1: 1 v/v) acetona/resina Spurr para 6 h, (1: 2 v/v) acetona/resina Spurr durante a noite

e finalmente em resina pura durante 6 h. As amostras foram embebidas em resina Spurr por 3 dias em incubadora, a 60°C. Secções semi-finas de um micrômetro foram cortadas em vidro e coradas com azul de toluidina para identificação da região a ser seccionada. Secções ultrafinas de 70 nm foram seccionadas com faca diamantada de diamante de 45° (micrótomo Leica Ultracut UCT) e contrastadas com acetato de uranila aquoso a 3% e com citrato de chumbo a 10%. As amostras foram analisadas em um MET, JEM 1011 (Electron Microscopy Sciences, Co, Jeol).²⁰

2.3.2.4 - Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Semelhantemente ao processamento anterior os fragmentos de córnea foram seccionados em filetes fixados, contrastados e desidratados numa série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Posteriormente foi realizada a secagem a ponto crítico (Critical Point Drying - CPD 030, Balzers) em CO₂ líquido e após a secagem, as amostras foram fixadas em stubs metálicos com fitas dupla face de carbono. Em seguida, foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm, com o uso do metalizador de alto vácuo (Leica EM SCD500). Posteriormente, as amostras foram visualizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão de campo Jeol JSM-7000F (Jeol Ltd.). As técnicas de microscopia eletrônica foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM-UnB).¹⁷

2.3.3 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software estatístico SPSS Statistics (Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp). Foram aplicados os testes não paramétricos de Friedman, Kruskal Wallis e o Post Hoc d Dunn-Bonferroni, com o nível de significância de 5%. Comparações múltiplas intragrupos dos valores de médios foram realizadas pelo teste de Friedman e pelo

teste post hoc de Dunn-Bonferroni. Comparações múltiplas intergrupos dos valores em cada momento de avaliação foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste post hoc de Dunn-Bonferroni.

3. RESULTADOS

Avaliação macroscópica

A análise macroscópica a olho desarmado revelou que as amostras mantidas em meio Eusol-C® apresentaram uma melhor manutenção da transparência e espessura em até 14 dias de armazenamento (Fig. 5). Aos 28 dias foram observadas alterações estruturais, listadas na tabela 2. As amostras criopreservadas e mantidas em solução de Ofloxacina 0,3%, mantidas a -20° C, e -196° C exibiram maiores alterações estruturais quando comparadas às armazenadas a -80°C, nos três diferentes períodos estabelecidos. As amostras referentes aos 14 e 28 dias, apresentaram menor grau de alterações. Praticamente todas as amostras de G-Eusol e G-Crio exibiram alto grau de degeneração após 60 dias de preservação (Tabelas 2 e 3).

Para identificar se existiu diferença entre o grau de arquitetura entre os grupos, nas mensurações das amostras aos 14, 28 e 60 dias, foi realizado o teste de Friedman (p-valor = 0.13) e o teste de Kruskal-Wallis. Para o teste de Friedman, o p-valor foi superior a 0,05 e indicou a não rejeição da hipótese nula. Dessa forma, não houve evidências estatísticas que apontem uma diferença entre os grupos. Contudo, no teste Kruskal-Wallis, o p-valor foi inferior a 0,001, onde uma comparação com diferença estatisticamente significativa (p-valor <0,05) foi entre 14 dias de congelamento para 60 dias de congelamento, onde foram apresentados maiores valores de grau de arquitetura no maior período de armazenamento.

Em relação a avaliação estatística das mensurações das amostras, foi realizado o teste de Friedman (p-valor = 0.13) e o Kruskal-Wallis, onde o p-valor foi de 0,0002, apontando que não há evidências estatísticas que indiquem diferenças entre os grupos.

Para identificar quais grupos apresentaram a diferença, foi realizado o teste de Dunn, com método de Bonferroni. Duas comparações dentro do próprio grupo se mostraram significativas, nas amostras congeladas por 14 dias de congelamento para as mantidas por congeladas por 60 dias de congelamento, onde foram apresentadas maiores mensurações para 60 dias de congelamento; e nas preservadas por 14 dias em meio Eusol para as com 60 dias no mesmo meio, onde foram apresentadas maiores mensurações para 60 dias de Eusol. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação as mensurações da espessura.

Avaliação por microscopia de luz

A mensuração dos cortes histológicos com o auxílio do software OPTHD (Opticam Microscopy Technology®) foi listada na Tabela 4. A espessura dos cortes acondicionados a 4°C em Eusol por 14 dias apresentaram valores de 0,487 a 0,96 µm, e aumentaram ao longo do maior o período de acondicionamento variando entre 0,953 a 1,801 µm nas mantidas por 28 dias e de 1,488 até acima de 2,000 µm, após os 60 dias. Na comparação entre mensuração dos cortes criopreservados, temos valores mais próximos aos mantidos no Eusol naquelas amostras mantidas a -80°C, com 0,529 a 0,812 µm aos 14 dias, e 0,8 a 1,162 µm aos 28 dias. As amostras criopreservadas por 60 dias apresentaram valores acima de 2,000 µm, inviabilizando uma mensuração precisa, devido à expansão tecidual ser maior que o limite de mensuração possível por este método.

ARQUITETURA TECIDUAL				
	EUSOL-C®		CRIO	
	4°	-20°	-80°	-196°
<i>AMOSTRA 1</i>				
14 dias	0	1	0	1
28 dias	1	2	1	3
60 dias	2	4	3	4
<i>AMOSTRA 2</i>				
14 dias	0	1	1	1
28 dias	1	2	1	3
60 dias	2	3	2	4
<i>AMOSTRA 3</i>				
14 dias	1	1	1	2
28 dias	1	2	1	3
60 dias	2	3	3	4

Classificação: 0, Arquitetura preservada; 1, Edema estromal leve; 2, Edema estromal moderado; 3, Edema estromal acentuado; 4, Completa perda de arquitetura tecidual.

Tabela 2. Classificação de alterações estruturais de tecido corneano por avaliação histológica.

	EUSOL-C		CRIO					
	4°		-20°		-80°		-196°	
<i>AMOSTRA 1</i>	Transparência	Espessura	Transparência	Espessura	Transparência	Espessura	Transparência	Espessura
14 dias	0	0	1	1	0	0	1	1
28 dias	1	0	2	2	1	1	2	2
60 dias	1	0	2	2	2	2	2	2
<i>AMOSTRA 2</i>								
14 dias	0	0	1	1	1	1	1	2
28 dias	2	2	2	2	1	1	2	2
60 dias	1	1	2	2	2	2	2	2
<i>AMOSTRA 3</i>								
14 dias	1	0	1	1	0	0	1	1
28 dias	1	1	2	2	1	1	2	2
60 dias	2	2	1	2	2	2	2	2

Transparência: 0, Transparente; 1, Neblina (moderada perda de transparência); 2, Opacidade

Espessura: 0, Arquitetura preservada; 1, Distensão estromal sutil a óbvia; 2, Estroma irregular a abaulado.

Tabela 3. Avaliação macroscópica de córneas preservadas em Eusol-C® e criopreservadas a -20°C, -80°C e -196°C em curto, médio e longo prazo, expressos em número para cada amostra. As amostras são classificadas de 0 a 2 de acordo com o grau de acometimento do tecido, sendo zero correspondente aquelas com a transparência preservada e 2, o grau atribuídos as que exibiam opacidade tecidual.

Mensurações de cortes histológicos				
	EUSOL-C®	CRIO		
	4°	-20°	-80°	-196°
<i>AMOSTRA 1</i>				
14 dias	0,487mm	0,963 mm	0,529 mm	0,960mm
28 dias	0,953mm	1,566 mm	0,800 mm	1,665mm
60 dias	1,488mm	1,992 mm	1,445mm	2,465mm
<i>AMOSTRA 2</i>				
14 dias	0,567mm	1,047mm	0,607 mm	1,214mm
28 dias	0,988mm	1,574mm	0,904 mm	1,778mm
60 dias	2,305mm	1,984mm	1,465mm	2,563mm
<i>AMOSTRA 3</i>				
14 dias	0,782mm	0,963mm	0,812 mm	1,105 mm
28 dias	1,801mm	1,566mm	1,162mm	1,767mm
60 dias	2,908mm	1,997mm	1,962mm	2,668 mm

Tabela 4. Mensuração em micrômetros (μm) de espessura dos cortes histológicos de amostras mantidas em Eusol-C® e criopreservadas a -20°C , -80°C e -196°C em curto, médio e longo prazo.

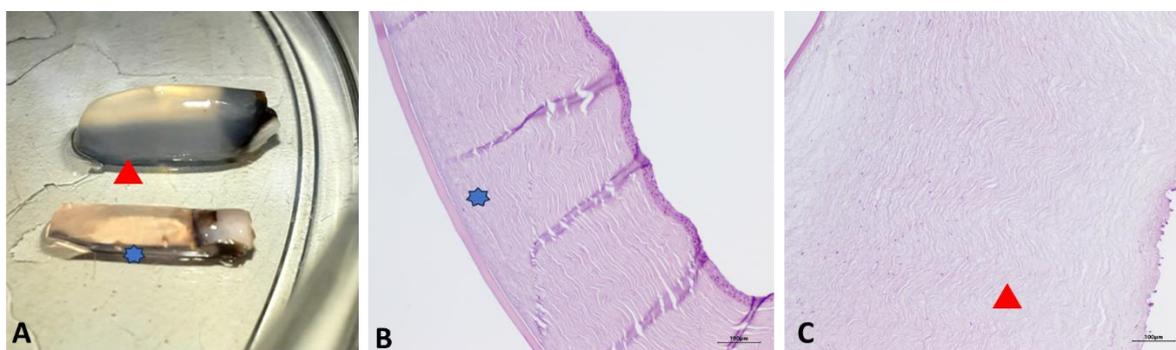


Figura 5. Avaliação macroscópica de córneas preservadas em Eusol-C® e criopreservada a -196°C . **A.** Macroscopia de fragmentos de córnea canina, nota-se a conformação estromal preservada em fragmento mantido no Eusol-C® por 14 dias (asterisco azul) contrastando com o abaulamento do estroma da amostra mantida a -196°C pelo mesmo período (ponta de seta vermelha), respectivamente mostrados em B e C. **B.** Corte histológico da mesma amostra preservada em Eusol-C®. **C.** Histologia de amostra mantida a -196°C . HE 20x.

Imuno-histoquímica

A expressão da E-caderina foi positiva nas membranas celulares epiteliais, bem como em depósitos pontilhados intracitoplasmáticos, principalmente das amostras em degeneração celular, caracterizando sua endocitose nestas amostras (Fig. 6).

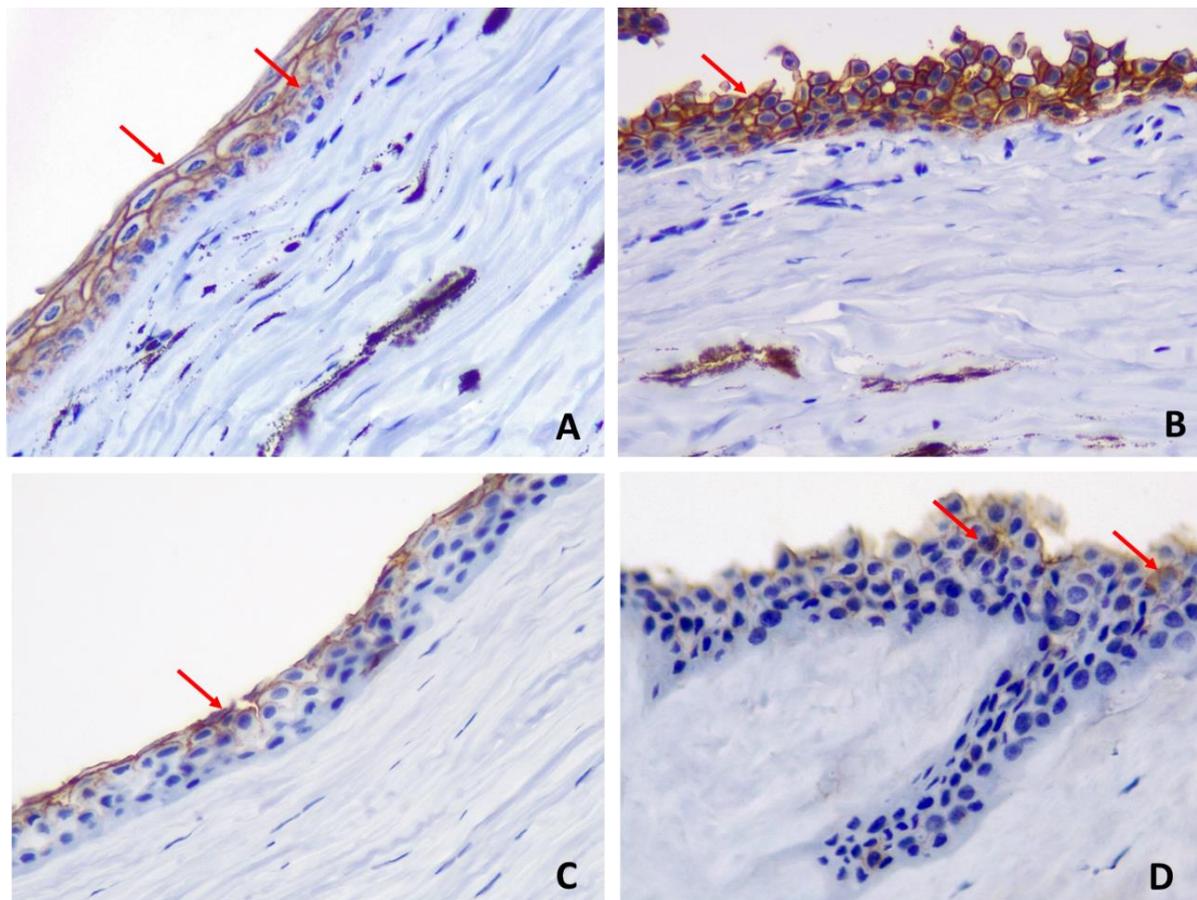


Figura 6. Análise histológica de amostras de córnea canina imunocoradas por E-caderina. Destacando as membranas das células epiteliais e deposições citoplasmáticas em amostras de diferentes estágios de conservação (setas vermelhas). **A.** Membranas fortemente coradas, cortes preservados em Eusol por 14 dias. **B** Áreas de erosão epitelial, evidente perda de camadas de células apicais em amostra conservada por 60 dias no Eusol-C®, onde destaca-se a aderência das células epiteliais, contorno celular e citoplasma exibindo coloração pontilhada por E-caderina. **C e D** Amostras em processo de degeneração celular, mantendo a coloração imuno-histoquímica positiva. IHQ 20x.

Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por MEV das córneas preservadas permitiu a visualização das alterações nos diferentes períodos de acondicionamento das amostras (Fig. 7). Nas amostras mantidas por 14 dias em meio Eusol-C[®] foram visualizadas lamelas de colágeno do estroma sem sinais de edema (Fig. 7 A), alinhadas na maior extensão do corte, e com algumas áreas de distensão na porção periférica. O endotélio se mostrou com células hexagonais uniformes (Fig. 7 B). Amostras mantidas por 28 dias, apresentaram-se com moderado desarranjo lamelar (Fig. C-D). Em todos os cortes de tecidos mantidos sob congelamento, observou-se diferentes graus de espessamento dos arranjos de colágeno presentes nas lamelas estromais (Fig. 7 E-F).

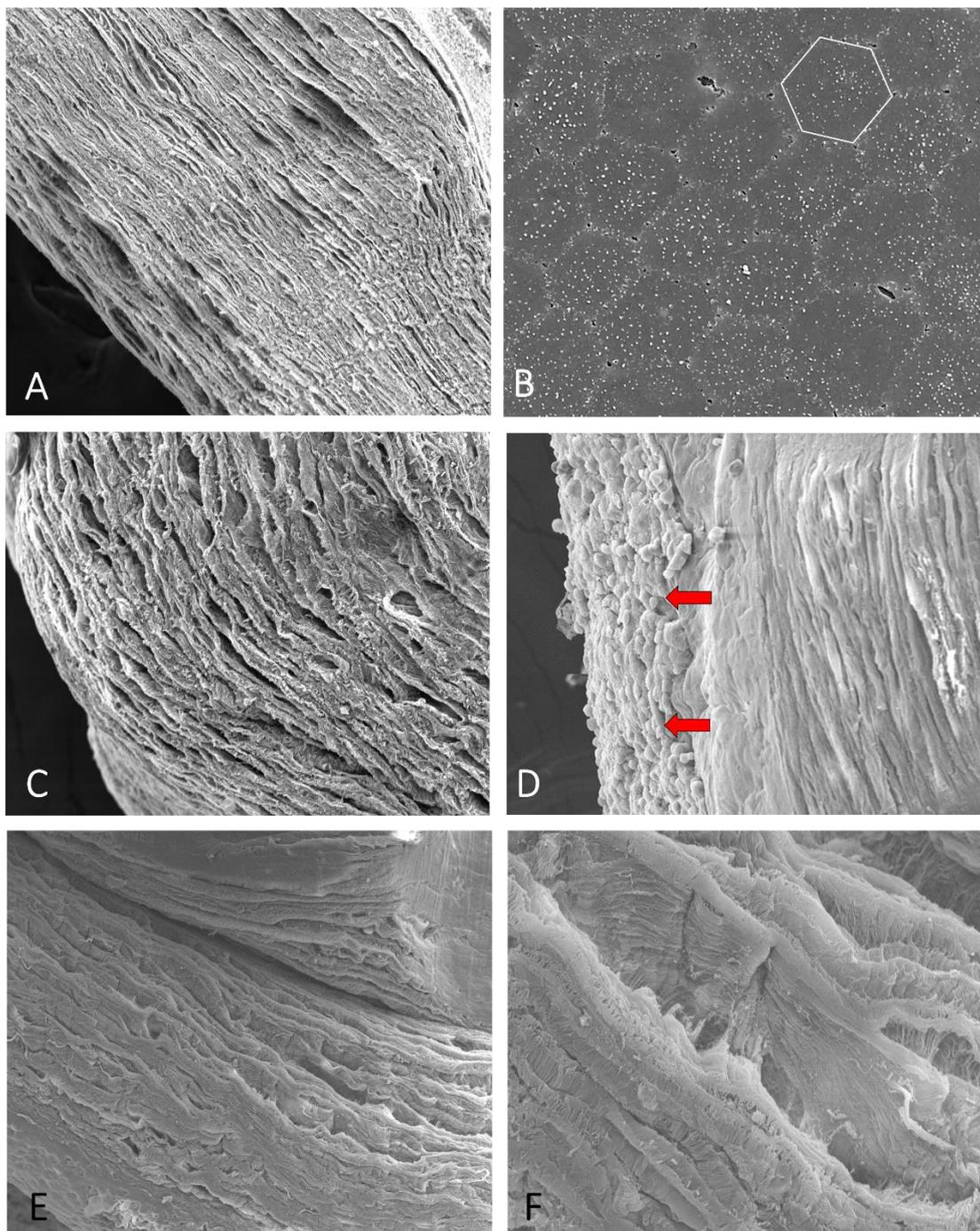


Figura 7. MEV de córnea mantida em meio Eusol-C®. **A** Lamelas de colágeno perfeitamente alinhadas com discreta distensão do espaço interlamelar na periferia do tecido. **B** Visualização de endotélio corneano, destaca-se as células perfeitamente justapostas de formato hexagonal (contorno branco). **C.** Nota-se o moderado desarranjo lamelar da amostra vista com 28 dias de armazenamento. **D** Abaulamento das lamelas estromais em amostra de tecido mantida congelada a -20°C por 14 dias, com a manutenção das células epiteliais (pontas de seta vermelhas) com bordos lamelares espessados e pouco definidos. **E. F** Amostras mantidas a -80°C por 28 dias com perda de definição entre suas camadas.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O estudo por MET foi realizado em amostras de tecido corneano de cães saudáveis preservados por 14 dias. Todas as amostras, conservadas em Eusol-C® e criopreservadas, foram preparadas para a análise por MET seguindo o mesmo protocolo de processamento, no entanto, a alteração tecidual das amostras com maior tempo de preservação não permitiu a obtenção de cortes ultrafinos adequados para visualização ao microscópio de transmissão. Nos fragmentos avaliados, o epitélio se apresentou com células justapostas (Fig.8 A,B). O alinhamento e posicionamento dos desmossomos em íntimo contato entre a camada epitelial basal e primeira camada estromal, foi visualizado (Fig. 8 C). Cortes das fibras de colágeno mostraram arranjos segmentados em disposições transversais e longitudinais (Fig.8. D, E, F). Os ceratócitos visualizados se mantiveram íntegros e dispostos entremeando as fibras estromais (Fig. 8 G. H. I e Fig. 9).

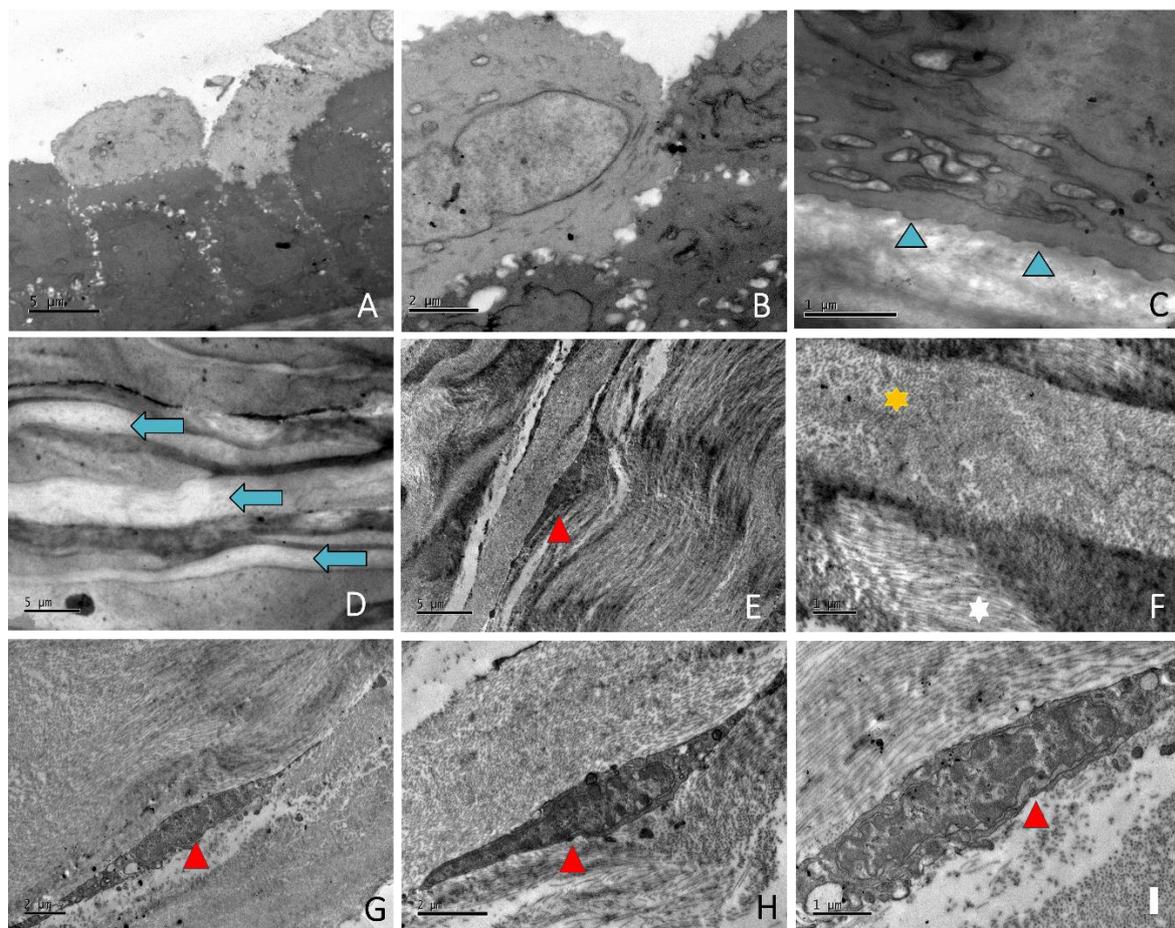


Figura 8. MET de tecido corneano de cão. **A e B** Multicamadas de células epiteliais íntegras (Ep). **C** Desmossomos (pontas de seta azul). **D** Organização de fibras colágeno estromal (setas azuis). **E** Ceratócito perfeitamente alongado entre fibras de colágeno em corte longitudinal. **F.** Destaca-se o arranjo entrelaçado das fibras de colágeno estromal, corte transversal (estrela amarela), corte longitudinal (estrela branca). **G, H, I** Ceratócitos visualizados em diferentes amostras com adequada conformação estrutural (pontas de seta vermelha).

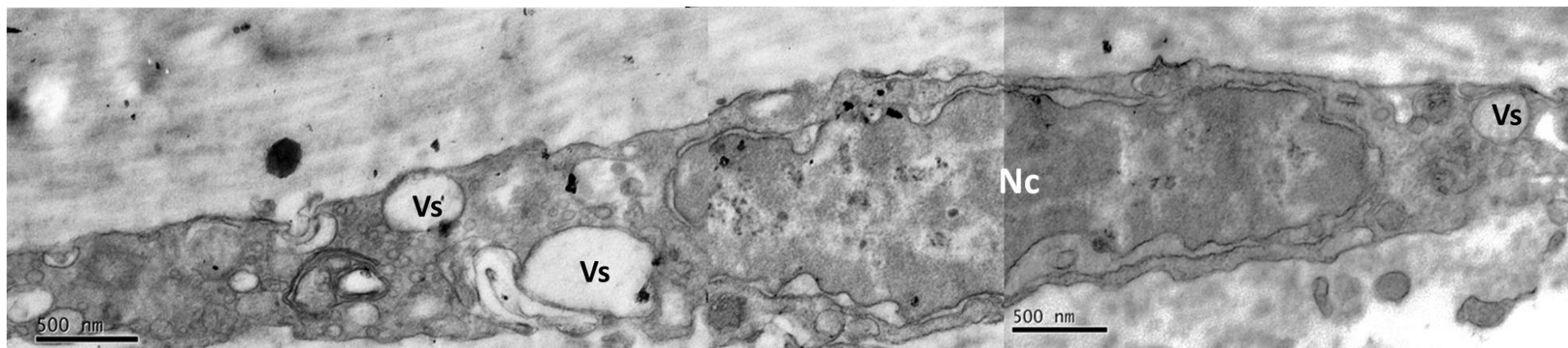


Figura 9. MET de Ceratócito localizado em estroma corneano de cão. Célula alongada, com núcleo (Nc) em região central, ocupando aproximadamente 60% do volume celular, vesículas dispersas pelo citoplasma (Vs)

DISCUSSÃO

O crescente avanço terapêutico na condução do tratamento cirúrgico de afecções corneanas em animais domésticos demanda disponibilidade e qualidade de enxertos de córnea. Visando contribuir na análise de métodos de conservação deste tecido, estudamos córneas caninas preservadas em meio Eusol-C a 4 C° e criopreservadas a -20 C°, -80 C° e -196 C° em diferentes períodos de tempo, curto (14 dias), médio (28 dias) e longo (60 dias). Em nossas análises, amostras mantidas pelo período de 14 dias em meio Eusol-C a 4 C° apresentaram melhor manutenção das características teciduais, e amostras criopreservadas a -80 C° mantiveram sua estrutura mais próxima ao tecido fresco. Em ambos os métodos se observou a manutenção da viabilidade epitelial, menor edema e desalinhamento interlamelar, além da preservação estrutural de ceratócitos.

O meio Eusol é amplamente utilizado na conservação de córneas humanas destinadas a transplantes em todo o mundo, ²¹ com estudos reportando a sua eficácia frente a manutenção da viabilidade da córnea humana pelo período de 14 dias, a 4 C°. ^{6,21}

Em relação a criopreservação, as temperaturas de -20 C°, -80 C° e -196 C, foram definidas baseando-se na possibilidade de conservação deste tecido em freezers domésticos (-20 C°), costumeiramente disponibilizados em clínicas, farmácias e laboratórios veterinários; ou, em ultra freezer (-80 C°), equipamento comumente disponível em centros laboratoriais, e a -196 C°, pelo histórico de boa manutenção da viabilidade de alguns tipos celulares, quando mantidos nesta temperatura ¹⁷ e, pela possibilidade de manter a amostra em botijão de nitrogênio líquido, o qual pode ser facilmente transportado.

Pelas avaliações macro e microscópicas verificou-se que as amostras com melhor preservação em relação a manutenção da espessura e transparência foram as mantidas por 14 dias em meio Eusol; e dentre as criopreservadas, aquelas acondicionadas a -80 C°, nos três

períodos de tempo estipulados. Contudo, os melhores resultados foram observados nas córneas mantidas por 14 dias, e um variável grau degenerativo nas acondicionadas por 28 dias. As córneas preservadas a -20°C , tal como, a -196°C apresentaram alterações teciduais em todos os períodos, 14 dias, 28 e 60 dias, com aumentos gradativos de degeneração e perda de morfologia.

As amostras mantidas por 60 dias apresentaram os maiores danos de preservação, e de forma mais acentuada naquelas preservadas a -196°C , onde houve evidente abaulamento do tecido, acentuado grau de edema, opacidade e desestruturação, conforme reportado anteriormente.^{5,9} Estatisticamente, o teste de Dunn, pelo método de Bonferroni, atestou que as maiores diferenças das mensurações em relação a distensão estromal e consequente desestruturação das córneas, estão entre as amostras mantidas por 14 dias em relação aquelas mantidas por 60 dias, armazenadas tanto em meio Eusol como as congeladas.

Os achados deletérios observados nas amostras mantidas a -196°C , podem ser justificados pelo desencadeamento de estresse químico e térmico, levando a alterações nas funções biológicas dos tecidos.²² Embora, nesta temperatura ocorra a interrupção das reações metabólicas, o que teoricamente preserva os tecidos indefinidamente, as fases de congelamento e descongelamento empregadas entre as análises podem ser destrutivas, levando à perda de cerca de 95% de água intracelular, e a um aumento considerável das concentrações de eletrólitos nos meios intra e extracelulares. Adicionalmente, pode haver formação de cristais de gelo nos espaços intracelulares que deformam e comprimem as células, causando sua desestruturação.^{5,22,23}

Crioprotetores podem reduzir as reações decorrentes da concentração intracelular de eletrólitos e também prevenir a desnaturação das proteínas celulares, auxiliando na manutenção da arquitetura celular,^{22,24} mas não são empregados no armazenamento das amostras corneanas em bancos.

A manutenção e aderência epitelial pode ser observada com a evidente imunocoloração das E-caderinas contornando as membranas citoplasmáticas das amostras. Semelhante ao que ocorreu na maioria das avaliações, as amostras conservadas no Eusol por 14 dias apresentaram melhor delineamento da marcação imuno-histoquímica, ressaltando a maior estabilidade e adesão epitelial conferida pela formação de complexos caderina-catetina e consequente ativação das integrinas, propiciando a adequada estabilização do epitélio,¹⁸ assim como visualizamos na figura 6. Porém, nas córneas com maior período de armazenamento, especialmente nas mantidas criopreservadas por intervalos de 28 e 60 dias, a densidade da coloração das membranas foi menor, com maior endocitose da E-caderina, visivelmente expressa por deposições intracitoplasmáticas. Pode-se inferir que, quanto maior a degeneração do colágeno, menor a aderência epitelial ao estroma e, consequentemente, menor manutenção estrutural da córnea.^{18,25,26}

O emprego da solução de Ofloxacina (a 0,3%) foi realizado devido à sua ampla ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, e pela menor toxicidade epitelial, conferida em estudos clínicos realizados com córneas humanas.²⁷

Houve perda do endotélio na maioria das amostras, desde as mantidas por em menor tempo no Eusol, como as criopreservadas. Estudos anteriores descrevem a viabilidade endotelial por pelo menos 8 dias,²¹ um período menor ao que as córneas foram mantidas neste estudo (14 dias). Isto se deve à interrupção súbita da formação do humor aquoso após o óbito, com consequente esgotamento dos nutrientes e suprimento de oxigênio intraocular, especialmente à temperatura ambiente, resultando em dano inicial por autólise, levando a gradativa perda endotelial.^{21,28}

As análises ultraestruturais por MEV e MET permitiram a observação de delineamento e adequado distanciamento entre as camadas lamelares do estroma, células epiteliais e endoteliais nos cortes de tecido com melhor preservação. Por MET foram

visualizadas as estruturas de cortes preservados por 14 dias, desde a presença de desmosomos às organelas celulares. Adicionalmente, foram encontrados ceratócitos viáveis, com corpos alongados, entremeando as lamelas estromais, bem como a alta densidade de mitocôndrias em seu núcleo, ^{5,29} conferindo viabilidade celular dos ceratócitos identificados. Sabe-se que mudanças anatômicas nestas células indicam a fase de transição para tornarem-se miofibroblastos, o que indicaria uma maior possibilidade de fibrose corneana. ^{30,31}

As amostras com maior tempo de preservação não geraram cortes adequados para visualização por MET, provavelmente porque a degradação tecidual tenha inviabilizado a adequada penetração e polimerização da resina, impedindo a realização do corte ultrafino. ²⁹

A microscopia eletrônica de varredura do estroma revelou fibrilas de colágeno em cortes transversais e longitudinais. O padrão uniforme dos espaços lamelares arranjados paralelamente foi preservado nas amostras mantidas em Eusol por 14 dias, contrastando com o desarranjo das fibrilas de colágeno, nas amostras armazenadas por maiores períodos, da mesma forma como foi observado por Oh e colaboradores (2009), em investigação com córneas de suínos, coelhos e humanos. Nas amostras onde houve a manutenção do endotélio, suas células se apresentaram hexagonais e perfeitamente alinhadas, confirmando sua viabilidade. ^{29,32}

Como limitações para o desenvolvimento deste trabalho citam-se a seleção de cães que estivessem dentro dos parâmetros exigidos para animais doadores, tendo como principal ponto de desclassificação a suspeita ou diagnóstico de doenças infecciosas, seguido da recusa dos tutores em autorizar a coleta dos bulbos oculares. No conhecimento destes autores, este é o primeiro estudo a avaliar a conservação de córnea canina nos diferentes métodos e períodos de armazenamento apresentados nesta pesquisa.

CONCLUSÃO

Amostras de córnea canina mantidas por 14 dias em meio Eusol e criopreservadas a -80 C° foram as que mantiveram melhores características estruturais, comparativamente aos outros períodos de conservação. Sugerem-se estudos clínicos que possam atestar a viabilidade de sua implantação como enxerto.

AGRADECIMENTOS: À equipe do Laboratório de Microscopia e Microanálise IB/UnB pela disponibilização de instalações e equipamentos para a realização desta pesquisa. Ao laboratório VETMOL, pelas análises imuno-histoquímicas. Aos laboratórios de Patologia Clínica FAV/UnB, HistoPato e MVL Patologia Veterinária, pelo auxílio no preparo e visualização das lâminas histológicas. Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

CONFLITOS DE INTERESSE: O autor declara não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Gelatt, KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. 5ed. Media: Williams & Wilkins, 2013.
2. Ledbetter EC. & Gilger B. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: *Veterinary Ophthalmology* (eds Gelatt, K.N., Gilger, B.C. & Kern, T.J.), 5th ed., 2013. 976–1049. Ames, IA: Wiley-Blackwell
3. Dulaurent T, Azoulay T, Gouille F, et al. Use of bovine pericardium (Tutopatch) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. *Veterinary Ophthalmology*, 2014; 17, 2, 91–99.
4. Lacerda RP, Gimenez MTP, Laguna F., et al. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 2017, 20: 3, 222–231.
5. Costa D, Leiva M, Sanz F. et al. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. *Veterinary Ophthalmology*. 2019;1–8.
6. Burgos-Blasco B, Vidal-Villegas B, Collado-Vincueria I, Soria-García AM, Cuiña-Sardiña R, Mendez-Fernandez R, Diaz-Valle D, Ariño-Gutierrez M. Clinical outcomes of long-term corneas preserved frozen in Eusol-C used in emergency tectonic grafts. *Cell Tissue Bank*. 2023, 24:351–356.
7. Marcon, ÍM. et al. Transplante de Córnea e Banco de Olhos. In: ELSEVIER (Ed.). Manual de Doação e Transplantes. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 1:6, 163- 174.
8. Voitekha MA, Shilkin AG. A comparison between dehydrated and cryopreserved heterologous corneal grafts for penetrating keratoplasty in dogs and cats *Veterinary Ophthalmology*. 2021; 00:1–11

9. Oh JY, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Kee JH. Comparative observation of freeze–thaw-induced damage in pig, rabbit, and human corneal stroma. *Veterinary Ophthalmology*. 2009;12(1):50-56
10. Arndt C, Reese S, Kostlin R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol-GS. *Veterinary Ophthalmology* 2001;4(3):175-182.
11. Rodella U, Bosio L, Giurgola L, Gatto C, Rossi O, Ferrari S, Tothova JD. A porcine cornea and lamellar tissue model to investigate effects of storage conditions on corneal preservation. *BMJ Open Ophthalmol*. 2022;7(Suppl 2): A8.
12. Hansen PA, Guandalini A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. *Vet Ophthalmol*. 1999;2:233-241.
13. Yalvac, IS, Nursabah E, Bozkurt A, Sunay D. Penetration of topically applied ciprofloxacin and ofloxacin into the aqueous humor and vitreous. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2003, 29(3): p 487-491
14. Jang TH, Park Yang, JH, Kima, JY, Hong SE, Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 2017, 12-18.
15. Català P, Vermeulen W, Rademakers T., Antoon van den B. Kruijt PJ, Rudy MMA. Nuijts MD, LaPointe VLS, Dickman, MM. Transport and Preservation Comparison of Preloaded and Prestripped-Only DMEK Grafts. *Cornea* 2020;39:1407–1414.
16. Marlo TL, Giuliano EA, Sharma A, Mohan R. Development of a novel *ex vivo* equine corneal model. *Vet Ophthalmol*. 2017;20(4):288-283.
17. Ricci CL, Araújo RLS, Passareli JVGC. et al. Morphological and ultrastructural study of the palpebral conjunctiva of healthy domestic cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2023, 00:1–6.

18. Eswaramoorthy R, Wang CK, Chen WC, et al. “DDR1 regulates the stabilization of cell surface E-cadherin and E-cadherin-mediated cell aggregation.” *Journal of cellular physiology*. 2010. vol. 224,2: 387-97
19. Bisevac J, Moe MC, Drolsum L, Kristianslund O, Petrovski G, Noer A. A Novel Technique of Amniotic Membrane Preparation Mimicking Limbal Epithelial Crypts Enhances the Number of Progenitor Cells upon Expansion. *Cells*. 2023;12(5):738.
20. Araújo RLS, Corrêa JR, Galera PD. Ultrastructural morphology of goblet cells of the conjunctiva of dogs. *Veterinary Ophthalmology*. 2019, 22:891-897.
21. Yuksel B, Uzunel UD, Kusbeci T. Endothelial cell viability of donor corneas preserved in Eusol-C corneal storage medium. *Exp Clin Transplant*. 2016;14(4):441-444.
22. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 2009, 5(3), 119–126.
23. Braslavsky I. Control of ice formation in biological samples. *Cryobiology*. 2015;71(1):168.
24. Steponkus PL, Dowgert MF, Gordon-Kamm WJ. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology*. 1983;20:448–465.
25. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991;251(5000):1451-1455.
26. Imamichi Y, König A, Gress T, Menke A. Collagen type I-induced Smad-interacting protein 1 expression downregulates E-cadherin in pancreatic cancer. *Oncogene*. 2007;26(16):2381-2385.
27. Fraunfelder FW. Corneal Toxicity From Topical Ocular and Systemic Medications. *Cornea*, 2006, 25(10): p 1133-1138.

28. Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edelhauser HF. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(6):805-809.
29. Jinyang Li, Shuai S. Xin Z, Shouxiang Ni, Yu W, Curcio CA, Wei C. Comparison of Different Methods of Glycerol Preservation for Deep Anterior Lamellar Keratoplasty Eligible Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012, Vol.53, 5675-5685.
30. Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Progress in retinal and eye research*, 2008, vol. 27,2: 177-96.
31. Ledbetter, E.C. Applications of in vivo confocal microscopy in the management of infectious keratitis in veterinary ophthalmology, *Veterinary Ophthalmology*. 2021;00:1–12
32. Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Moacyr P, Smith. RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages *Veterinary Ophthalmology*, 2006, 9, 2, 101–107.

Capítulo III

Impacto do sequestro corneano felino na estrutura corneana

Impact of feline corneal sequestration on corneal structure

Running Title: *Ultrastructure of feline corneal sequestum*

Rosélia L.S. Araújo¹, Paulo H. Sampaio ², José R. Corrêa ³ and Paula D. Galera ⁴

¹ DVM, Msc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

² DVM,, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

³ Dsc., Msc. Laboratório de Microscopia e Microanálise, Instituto de Ciências Biológicas, Professor Associado, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

⁴ DVM, Dsc., Msc. Laboratório de Oftalmologia Comparada, Professor Associado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Address communications to:

P.D.Galera

Tel: +55 61 98345-3330

e-mail: dra.paulagalera@gmail.com

Agradecimentos: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de aprovação ética: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, sob número de protocolo 23106.064222/2021-19, seguindo as normas de experimentação animal da Associação de Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO).

Obs.: O Capítulo III encontra-se formatado segundo modelo de submissão de artigos para publicação do periódico *Veterinary Ophthalmology Journal*.

RESUMO

Objetivo: Descrever e analisar a córnea felina afetada por sequestro utilizando microscopia óptica, de varredura e eletrônica de transmissão, em comparação com uma córnea saudável.

Animais estudados: Foram coletadas amostras unilaterais de córnea de quatro felinos, sendo dois animais sem alterações oculares, que foram a óbito por motivos não relacionados a esta pesquisa; e de dois animais com sequestro corneano.

Procedimentos: As amostras de córnea foram coletadas por incisões perilimbais em olhos enucleados, e por ceratectomia lamelar para olhos com sequestro corneano, processadas para microscopia de luz, MEV e MET.

Resultados: Foram visibilizadas células epiteliais hexagonais, núcleos evidentes com bordas celulares visíveis e arquitetura de microvilosidades corneanas nas amostras saudáveis. O espaço intralamelar do estroma apresentou valor médio de $3,507 \pm 1,639 \mu\text{m}$ (IC 95%: 2,634–4,380). A espessura lamelar média foi de $1,31 \pm 0,41$ (IC 95%: 1,13–1,49). As imagens do sequestro da córnea revelaram áreas de ulceração e opacificação, com epitélio corneano irregular estendendo-se até as bordas do tecido afetado como resultado da degradação do tecido adjacente.

Conclusão: O arranjo simétrico e homogêneo das estruturas corneanas saudáveis contrasta com amostras afetadas pelo sequestro corneano, onde a perda de delineamento e orientação das fibras colágenas, bem como a retração entre as lamelas do estroma, morte celular e tecidual, inviabiliza a refração da luz e, conseqüentemente, a perda de função nas áreas afetadas.

Palavras-chave: gatos, superfície ocular, necrose, microscopia eletrônica

ABSTRACT

Objective: To describe and analyze the feline cornea affected by sequestrum using light, scanning, and transmission electron microscopy, in comparison to a healthy cornea.

Animal studied: Unilateral cornea samples were collected from four felines, two animals without ocular changes, which died for reasons unrelated to this research; and two animals with corneal sequestration.

Procedures: The samples of cornea were collected and processed for light microscopy scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) and measured.

Results: Hexagonal epithelial cells, evident nuclei with visible cell borders and corneal microvilli architecture were visible in healthy samples. The intralamellar space of the stroma had a mean value of $3.507 \pm 1.639 \mu\text{m}$ (95% CI: 2.634–4.380). The mean lamellar thickness was 1.31 ± 0.41 (95% CI: 1.13–1.49). Images of the corneal sequestration revealed areas of ulceration and opacification, with irregular corneal epithelium extending to the edges of the affected tissue as a result of degradation of adjacent tissue.

Conclusion: The symmetrical and homogeneous arrangement of healthy corneal structures contrasted with samples affected by corneal sequestration, where the loss of delineation and orientation of collagen fibers, as well as retraction between the stromal lamellae, cell and tissue death, makes light refraction unfeasible, and consequently loss of function in the affected areas.

Keywords: cats, ocular surface, measured corneal, electron microscopy

1. INTRODUÇÃO

A córnea possui uma conformação estrutural diferenciada, e fatores como sua espessura, concentração e empacotamento de fibras de colágeno contribuem diretamente para isso.^{1,2,3} Ela confere proteção ocular contra traumas, é esférica, reflexiva, altamente sensível e atua na refração da luz. Composta por epitélio, estroma, membrana de Descemet e o endotélio, sua transparência permite refração e formação da imagem de forma nítida, e fatores como avascularidade (equilíbrio de fatores antiangiogênicos e angiogênicos), baixa densidade celular, ausência de pigmentação e de queratinização, contribuem diretamente para isso.^{4,5}

No entanto, afecções que acometem a superfície ocular interferem na homeostase corneana, levando a opacidade e interferindo diretamente em suas funções. Dentre elas, destaca-se o sequestro corneano caracterizado por áreas de mumificação, necrose epitelial e estromal, com coloração que varia de acastanhada a negra, acometendo principalmente as porções central ou paracentral do estroma corneano. Sua profundidade e extensão podem variar com o tempo de evolução, chegando a perfurações oculares em casos crônicos. Relata-se como causas ou fatores predisponentes para a evolução do sequestro o entrópico, alterações do filme lacrimal⁶ e afecções dos cílios, sendo estas mais relacionadas a animais lagofálmicos como os felinos das raças Persa e Himalaia, assim como agentes infecciosos, dentre eles o *Herpesvirus felino tipo I*, *Chlamydomphila felis* e *Toxoplasma gondii*.^{7,8,9}

O tratamento preconizado é a remoção cirúrgica da área afetada por ceratectomia lamelar anterior associada com tratamento clínico. Fatores como desconforto ocular, extensão e profundidade da lesão devem ser levados em consideração na escolha do tratamento, no emprego ou não de enxertos, dentre eles o pedículo conjuntival, transposição corneconjuntival, enxertos com córnea homóloga fresca ou congelada ou heterólogas, têm sido listados como opções.^{8,9,10}

Com o objetivo de compreender os aspectos ultraestruturais do sequestro corneano e seu impacto na arquitetura e função deste tecido, objetivou-se descrever e analisar a córnea felina afetada pelo sequestro utilizando microscopia eletrônica de luz, varredura e transmissão, em comparação com a córnea saudável.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Animais

Foram coletadas amostras de córnea de quatro felinos (uma amostra de cada animal). Duas córneas íntegras de dois gatos sem alterações oculares, sem raça definida, fêmeas, ambas de pelo curto, com 9 e 11 anos de idade, que vieram a óbito por motivos não relacionados a esta pesquisa. As amostras de sequestro corneano foram obtidas por ceratectomia lamelar de dois gatos diagnosticados com sequestro corneano, sendo machos, adultos, um Persa e um sem raça definida. Previamente às coletas a superfície ocular foi avaliada por biomicroscopia com lâmpada em fenda (Slitlamp Kowa® SL-15). Todos os animais foram incluídos neste estudo mediante obtenção do consentimento livre e esclarecido de seus responsáveis. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal sob número de protocolo 23106.064222/2021-19 atendendo às normas para experimentação animal da Associação de Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO).

2.2 - Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras da córnea felina foram fixadas em paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 24 h, à temperatura ambiente. Após lavagem em 0,1 M de cacodilato de sódio tampão pH 7,2, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 2%, 1,6% ferricianeto de potássio (1: 1 v/v) e 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, durante 1 h, à temperatura ambiente, seguido de lavagem em

tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. As amostras foram mantidas durante 24 h em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% a 4°C, lavadas em água destilada e desidratadas numa série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). O material foi embebido numa mistura de (3: 1 v/v) acetona/resina *Spurr* (Electron Microscopy Sciences, Co.) durante 6 h, (2: 1 v/v) acetona/resina *Spurr* durante a noite, (1: 1 v/v) acetona/resina *Spurr* para 6 h, (1: 2 v/v) acetona/resina *Spurr* durante a noite e finalmente em resina pura durante 6 h. As amostras foram embebidas em resina *Spurr* por 3 dias em incubadora, a 60°C. Secções semi-finas de um micrômetro foram cortadas em vidro e coradas com azul de toluidina para identificação da região a ser seccionada (Fig. 1). Secções ultrafinas de 70 nm foram seccionadas com faca diamantada de diamante de 45° (micrótomo Leica Ultracut UCT) e contrastadas com acetato de uranila aquoso a 3% e com citrato de chumbo a 10%. As amostras foram analisadas em um MET, JEM 1011 (Electron Microscopy Sciences, Co, Jeol). ¹¹

2.3 - Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Semelhantemente ao processamento anterior os fragmentos de tecido foram fixados, contrastados e desidratados numa série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Posteriormente foi realizada a secagem a ponto crítico (Critical Point Drying - CPD 030, Balzers) em CO² líquido e após a secagem, as amostras foram fixadas em *stubs* metálicos com fitas dupla face de carbono. Em seguida, foram metalizados com uma camada de ouro de 20 nm, com o uso do metalizador de alto vácuo (Leica EM SCD500). Logo após as amostras foram visualizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão de campo Jeol JSM-7000F (Jeol Ltd.). ¹²

2.4 - Histologia

Fragmentos de córnea felina saudável e acometidos pelo sequestro corneano, foram fixadas em solução de formaldeído a 10% durante 24 horas, seccionadas e processadas rotineiramente para exame histopatológico. ¹²

2.5 Morfometria

As imagens obtidas pela microscopia óptica e por MEV foram submetidas à análise morfométrica para mensuração total da córnea, mensuração do espaço entre as lamelas estromais, e a espessura lamelar, todas as aferições realizadas em dez campos distintos. A análise foi realizada com o programa ImagePro Plus ® 6.0 (Media Cybernetics, Versão 6.0 para Windows).

2.6 Análise Estatística

Os dados de espessura total da córnea para microscopia óptica tradicional e MEV, espaço intralamelar e espessura lamelar foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk com nível de significância de 5% e em seguida foi realizada comparação de médias por meio do teste t de Student entre os resultados de espessura lamelar através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Os dados foram calculados utilizando o programa Prism (GraphPad Prism®, versão 10.0 para Mac).

RESULTADOS

Histologia e Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).

A córnea felina saudável apresentou células epiteliais hexagonais perfeitamente dispostas, núcleos evidentes, bordas celulares bem delimitadas e arquitetura das microvilosidades

corneanas preservadas (Fig 1A, 1B, 1C, 1D). As lamelas estromais apresentaram-se em formato empilhado e regular (Fig. 1E). Em sua mensuração, a espessura total da córnea na porção central por microscopia óptica apresentou valor de $440.1 \pm 3.612 \mu\text{m}$ (CI 95%, 437.5:442.7). Por MEV, os cortes sagitais mostraram espessura total da córnea de $687.7 \pm 25.85 \mu\text{m}$ (CI 95%, 669.2:706.2). Na comparação entre a mensuração corneana das técnicas de avaliação (microscopia óptica vs MEV) houve diferença significativa ($p < 0.0001$). A mensuração do espaço intralamelar estromal apresentou média de $3.507 \pm 1.639 \mu\text{m}$ (CI 95%, 2.634: 4.380). A espessura lamelar média foi de 1.31 ± 0.41 (CI 95%, 1.13:1.49). As amostras de sequestro corneano exibiram acentuada irregularidade entre os espaços intralamelares, fibras desarranjadas, delgadas e curtas, inviabilizando sua mensuração. Ceratócitos degenerados foram visualizados entremeando as porções necróticas (Fig. 2).

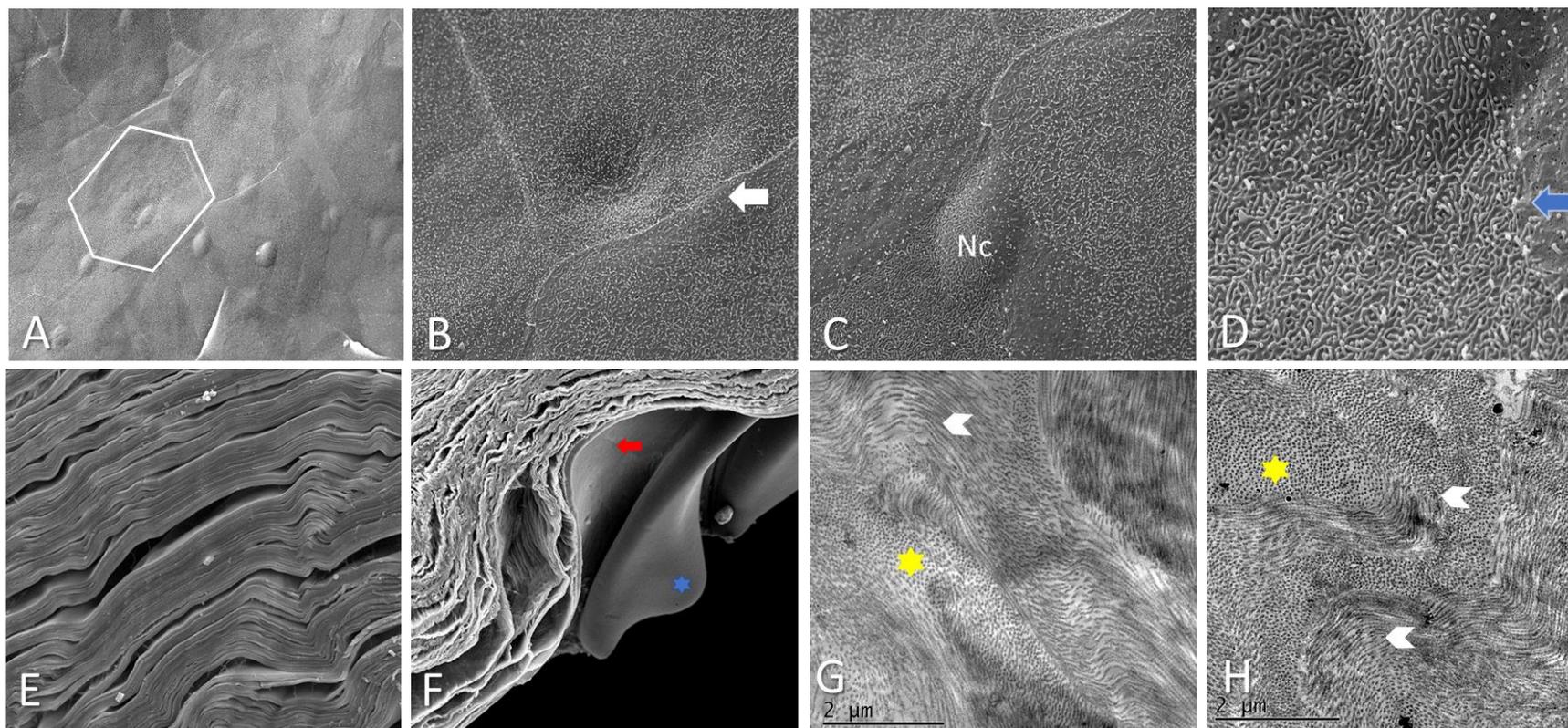


Figura 1. Fotomicrografias SEM e TEM de estruturas da córnea felina saudável. **A** Epitélio corneano por MEV, multicamadas de células hexagonais. **B** Borda da célula (seta branca) do epitélio da córnea. **C** Núcleo evidente (Nc); **D** Microvilosidades presentes no epitélio da córnea (seta azul). **E** Evidente organização lamelar na córnea saudável. **F** Membrana de Descemet (seta vermelha) e endotélio (estrela azul). **G, H** Fibras de colágeno em córnea saudável exibindo perfeito alinhamento em cortes longitudinais (ponta de seta branca) e transversais (estrelas amarelas).

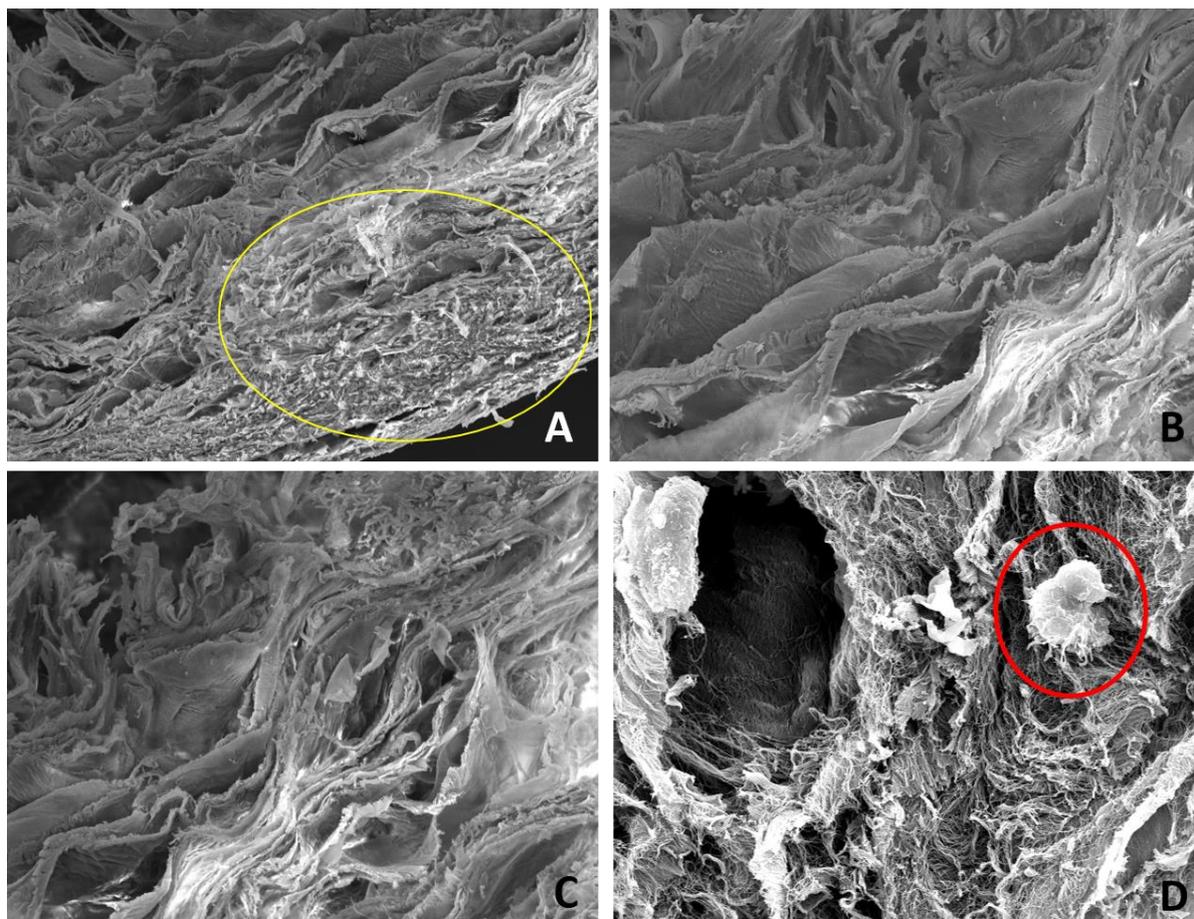


Figura 2. Fotomicrografias de sequestro corneano felino por MEV. **A** Estroma posterior com moderada compactação lamelar (círculo amarelo). **B, C** Degeneração e perda de estrutura irregularidade intralamelar, adelgaçamento de fibras colágenas. **D** Ceratócito degenerado (círculo vermelho).

Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

As córneas sem alterações permitiram a visualização da disposição simétrica e homogênea das lamelas estromais, com arranjo transversal exibindo a organização hexagonal de fibras (Fig 1G, 1H). Amostras de sequestro corneano não geraram cortes adequados para análise por este método.

4.DISSCUSSÃO

Diversas afecções acometem a superfície ocular, e o desenvolvimento de opacidades corneanas frente às lesões é dinâmico, diante de processos de migração, mitose e diferenciação celular. ¹³ Os sequestros corneanos são decorrentes de alterações inflamatórias crônicas que culminam em mumificação, geralmente iniciando pelo epitélio, estendendo-se ao estroma anterior e por vezes, ao posterior. ⁷

Nas amostras do tecido corneano sadio, nossa avaliação por MEV evidenciou células epiteliais com formato poligonal, microvilosidades e bordas retílineas. As lamelas estromais encontram-se empilhadas, com fibras paralelas entrelaçadas e com a presença ocasional de ceratócitos de corpo compacto. Quanto à morfometria, as lamelas apresentaram intervalo de espessura lamelar entre 1.1 e 1.4 μm , apresentando valores com menor variação com relação aos valores de referência para o homem, que variaram entre 0.2 e 2 μm . ^{14,15}

A espessura corneana mensurada através de microscopia óptica foi inferior aos valores de referência ($592 \pm 80 \mu\text{m}$ a $598 \pm 35 \mu\text{m}$)⁷, possivelmente em virtude de particularidades do método de coleta e do meio de processamento, não se descartando uma eventual retração tecidual. A espessura corneana mensurada através da microscopia eletrônica de transmissão apresentou valores mais próximos aos descritos anteriormente. ^{5,16}

A densidade estromal já fora previamente descrita em tecidos sadios através da microscopia confocal com redução na densidade dos ceratócitos à medida que o estroma se aprofunda, ¹⁶ o que não pode ser avaliado neste estudo por limitações relacionadas à análise por campos, bem como pela perda da conformação estrutural do tecido nos animais acometidos pelo sequestro corneano.

As espessuras das córneas de cães, gatos e cavalos foram anteriormente mensuradas através da tomografia de coerência óptica, microscopia confocal e biomicroscopia ultrassônica (UBM), com valores que variam de 584 ± 39.5 a $629.08 \pm 08 \mu\text{m}$ no gato ^{16,17}

valores muito próximos aos obtidos neste estudo, o que denota a precisão da mensuração da espessura corneana por técnicas de imagem não invasivas *in vivo*. No entanto, estas técnicas não permitem apurada análise do delineamento estromal, como foi possível observar por MEV.

As imagens do sequestro corneano evidenciaram áreas de ulceração e opacificação, com epitélio corneano irregular, estendendo-se para a periferia do tecido acometido, em decorrência da degradação tecidual adjacente (Fig. 2) ^{18,19}. Nestas amostras uma grande área focal de estroma acelular, desorganizado, com total perda de delineamento, orientação das fibras e maior espaçamento entre as lamelas estromais foi evidenciada. Periféricamente pode-se observar leucócitos, fibroblastos e ceratócitos degenerados com aspecto globoso evidenciando a perda de sua estrutura anatômica e interferindo diretamente na estruturação tecidual (Fig 2.D).

A angiogênese inicial nos processos inflamatórios como as ceratites que desencadeiam o sequestro corneano, levam a liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) seguido do edema e necrose tecidual, inicialmente levam tanto a apoptose como diferenciação dos ceratócitos em miofibroblastos, com propriedades contráteis e secreção de matriz extracelular. ^{20,21}

Soriano e colaboradores (2000) e Michelacci (2003), reportam a cicatrização corneana após traumas ou ceratectomia, com a regeneração do tecido estromal levando a opacidades decorrentes de ordem ultraestrutural diminuída ou totalmente irregular, bem como observamos por MEV, onde a contração e total desestruturação das fibras colágenas foi evidente, repercutindo em opacificação do tecido lesionado (Figura 2).

Sabe-se que a diferenciação do fibroblasto em miofibroblastos resulta em contorno irregular do tecido acometido por inflamações crônicas, mudanças na composição e configuração da matriz extracelular. ^{24,25} Acredita-se que a transparência intrínseca do

fibroblasto corneano desempenha um papel na transparência estromal em si.^{23,26,27} Análises realizadas em camundongos, coelhos e humanos, sugerem que a transformação do ceratócito quiescente em fibroblasto ativado reduz significativamente a expressão de proteínas cristalinas, além de alterar o enovelamento das proteínas.²⁵

Na córnea saudável a matriz extracelular presente no estroma tem em sua composição proteoglicanos de sulfato de queratina que regulam o diâmetro e espaçamento das fibrilas de colágeno em sua montagem,^{23,24,28} conforme observado nas lamelas das córneas sadias analisadas, diferentemente do arranjo aleatório observado no tecido necrótico (figura 2). A alteração estromal interfere diretamente no índice de refração, o qual varia de 1,38 – 1,373 ao longo da dimensão do estroma de humanos, com uma difração estimada em menos de 1%.^{28,29} Isto porque a distância mínima entre as fibrilas de colágeno em relação ao comprimento de onda da luz reduz a possibilidade de dispersão em córneas normais²⁴ já o aumento da densidade do tecido corneano e morte celular nas regiões acometidas, levam à opacificação e enegrecimento, resultando em perda de sua função refrativa.

5. CONCLUSÃO

A perda de delineamento e orientação das fibras de colágeno, bem como retração entre as lamelas estromais, morte celular e tecidual, inviabiliza a refração da luz, e conseqüentemente perda de função das áreas acometidas pelo sequestro corneano, contrastando com a disposição simétrica e homogênea das estruturas da córnea saudável.

AGRADECIMENTOS: À equipe do Laboratório de Microscopia e Microanálise IB/UnB pela disponibilização de instalações e equipamentos para a realização desta pesquisa. Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

CONFLITOS DE INTERESSE: O autor declara não haver conflitos de interesse.

CONCLUSÃO GERAL

As minuciosas análises macro e microscópicas das amostras de córnea canina preservadas em diferentes intervalos de conservação em meio Eusol-C® e por criopreservação a -20° C, -80°C e -196°C, bem como suas características macro e microscópicas após períodos de congelamento e descongelamento, revelaram que os cortes de córnea mantidos por 14 dias em meio Eusol e criopreservados a -80 C° foram os que mantiveram melhores características estruturais.

No estudo visando avaliar os impactos do sequestro corneano felino, constatou-se que a perda de delineamento e orientação das fibras de colágeno, retração entre as lamelas estromais, morte celular e tecidual, inviabiliza a refração da luz, e consequentemente perda de função das áreas acometidas por tal afecção.

REFERÊNCIAS

1. Gipson, I.K. Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. In: SMOLIN, G.; THOFT, R.A. (Eds.) *The Cornea: scientific foundations and clinical practice*. Boston: Little Brown, 1994. p.3-24.
2. Fini, M. E.; Stramer, B. M. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Córnea*, 2005, v.24, suppl, p.S2–S11, 2005.
3. Alzahrani K, Carley F, Brahma A, Morley D, Hillarby MC. Corneal clarity measurements in healthy volunteers across different age groups: Observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2017, v. 96, n. 46, p. 1-6.
4. Featherstone HJ, Franklin VJ, Jane Sansom J. Feline corneal sequestrum: laboratory analysis of ocular samples from 12 cats *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7, 4, 229–238.
5. Cleymaet AM, Hess AM, Freeman KS. Comparison between pentacam-hr and optical coherence tomography central corneal thickness measurements in healthy feline eyes. *Veterinary Ophthalmology* 2016;19.
6. Oksa-Minałto J, Maggs DJ, Akimova J, Ilgaža A, Sebbag L. Ocular surface physiology and aqueous tear secretion in cats of diverse cephalic conformations. *Veterinary Ophthalmology*. 2023;26:109–118
7. Cullen, CL; Wadowska, DW.; Sinah, A et al. Ultrastructural findings in feline corneal sequestra. *Veterinary Ophthalmology*, 2005, v. 8, n. 5, p. 295-303.
8. Barachetti, L; Giudice C; Mortellaro CM. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study *Veterinary Ophthalmology*, 2010, 13, 5, 326–330.

9. Michel J, Vigan M, Douet JY. Autologous lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestrum: A retrospective study of 35 eyes (2012–2020). *Veterinary Ophthalmology*. 2021; 00:1–12
10. Voitekha MA, Shilkin AG. A comparison between dehydrated and cryopreserved heterologous corneal grafts for penetrating keratoplasty in dogs and cats *Veterinary Ophthalmology*. 2021; 00:1–11.
11. Araújo RLS, Corrêa JR, Galera PD. Ultrastructural morphology of goblet cells of the conjunctiva of dogs. *Veterinary Ophthalmology*. 2019, 22:891-897.
12. Ricci CL, Araújo RLS, Passareli JVGC. et al. Morphological and ultrastructural study of the palpebral conjunctiva of healthy domestic cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2023, 00:1–6.
13. Chu PH, Yeh LK, Lin HC, Jung SM, Ma DH, Wang IJ, Wu HH, Shiu TF, Chen J. Deletion of the FHL2 gene attenuating neovascularization after corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:5314–8
14. Laguna F, Marta Leiva M, Costa D, Lacerda R, Gimenez TP. Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats) *Veterinary Ophthalmology* 2015; 18, 4, 291–296.
15. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian j Ophthalmol*. 2018;66(2):190-194.
16. Quantock AJ, Assil KK, Schanzlin DJ. Eletron microscopic evaluation of intrastromal corneal rings explanted from nonfunctional human eyes. *J Refract corneal surg*. 1994; 10:142-148.
17. Tinasi ALSN, Silveira CBB, Honsho CS, Laus JL, Aldrovani M. Birefringence analysis of collagen supraorganization in cat corneas with tropical keratopathy. *Veterinary Ophthalmology*. 2023; 00:1–9

18. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency, *Experimental eye research*, v. 91, issue 3, 2010, 326-335.
19. Nautscher N, Bauer A, Steffl M, Amselgruber WM. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. *Veterinary Ophthalmology*. 2016; 19:297-304.
20. Ambati BK, Anand A, Jousseaume AM, Kuziel WA, Adamis AP, Ambati J. Sustained inhibition of corneal neovascularization by genetic ablation of CCR5. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:590–3
21. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Survey in Ophthalmology* 2012; 57(5): 415- 429.
22. Soriano ES, Campos MS, Aguiar JA, Michelacci YM. Effect of epithelial debridement on human cornea proteoglycans. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(3):325-331.
23. Michelacci, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2003, v.36, n.8, 1037-1046.
24. Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull*. 2010. 15;81(2-3):198-210.
25. Ledbetter, E.C. Applications of in vivo confocal microscopy in the management of infectious keratitis in veterinary ophthalmology, *Veterinary Ophthalmology*. 2021;00:1–12
26. Scott, J.E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions in tissues: dermatan sulphate proteoglycan as a tissue organizer. In: SCOTT, J.E, *Dermatan sulphate proteoglycans. chemistry, biology, chemical pathology*. London: Portland Press, 1993. p.165-181.

27. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editores. *Córnea*. Elsevier Mosby; Nova Iorque: 2005
28. Waring III, G.O. Corneal Anatomy and Physiology as Applied to Refractive Keratotomy. In: WARING III, G.O. Refractive keratotomy for myopia and astigmatism. St. Louis: Mosby, 1992. p.17-35.
29. Jalbert I, Stapleton F. The corneal stroma during contact lens wear. *Cont Lens Anterior Eye*. 2005;28(1):3-12.