

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Regeneração do epitélio da córnea após lesões parciais em
várias regiões em olhos de coelhos**

Flávia Leão Barbosa

**Ribeirão Preto
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Regeneração do epitélio da córnea após lesões parciais em
várias regiões em olhos de coelhos**

Flávia Leão Barbosa

Tese apresentada à da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-
Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Júlio de Faria e Sousa

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Flávia Leão

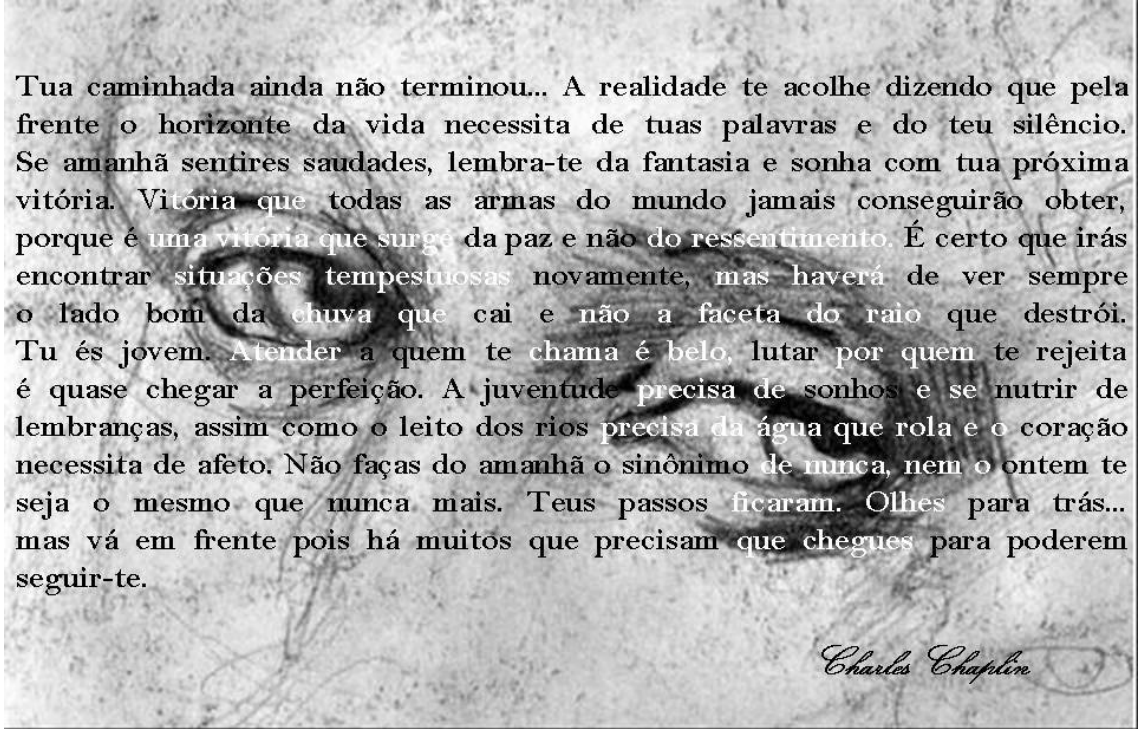
Regeneração do epitélio da córnea após lesões parciais em várias regiões em olhos de coelhos. Ribeirão Preto, 2009.

68p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Sousa, Sidney Júlio de Faria e

1. Epitélio; 2. Células Tronco; 3. Autorradiografia; 4. Limbo; 5. Córnea.



Tua caminhada ainda não terminou... A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio. Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória. Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento. É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói. Tu és jovem. Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar a perfeição. A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios precisa da água que rola e o coração necessita de afeto. Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

Meu Amado e Eterno Irmão...

Hoje eu te dedico uma prece. Uma prece de **Agradecimento**. Ouço as vozes dos que não falam. Falo por eles. Hoje eu te dedico uma prece. Uma prece de **Saudade**. Ouço o luminoso som das estrelas e preservo a lembrança apagada do que ficou. Perco-me nas cores do horizonte quando, assustadoramente, me defronto com a impossibilidade de encontrar-te. Na tardia recordação do teu existir, sacolejo a vontade de continuar te olhando. **Olhar de prece**. As minhas pegadas se distanciam deste presente que não me acompanha. **Tenho Saudade**. Uma saudade que antecipa o varar em caminhos que não se cruzam, antes anda em tempos simultaneamente diferentes. Procuro resgatar os instantes que revelam marcas de ti. Hoje eu te dedico uma prece. Uma prece de **Ausência**. A oração não se encerra em palavras. Ela se veste de força. Levando os olhos para além do cosmos e, no ritmo das gotículas que jorram da minha prece, eu converto esse **Adeus**, esse **Silêncio**, essa tamanha **Saudade**, essa **Ausência**, em **Agradecimento**. Fiu (a maneira de nos chamarmos), de rabisco em rabisco olha só onde fui parar!? Não poderia ser a melhor hora para retribuir tudo a você, **meu Eterno irmão Marco Aurélio**, ser divino e mais que perfeito, me iluminou, inspirou e ajudou. **Abençoado por Deus**. **O amor sublime e incondicional é igualmente emanado a todos**. Independente de alguma religião ou crença, as energias positivas que permeiam o universo favoreceram. É por isso que esse momento é dedicado a você, que transmitiu toda energia e força para que essa oportunidade de ajudar outros seres, continuando o ciclo de boas atitudes e perseverança. Dedico esse **Trabalho** com o sentimento que, em qualquer momento que olhar para os lados, seu **Amor, sua Mão, seu Olhar, seu Sorriso, sua Luz** estarão a me **Auxiliar** por toda minha **Vida** e muito além dela.
Você faz parte dessa conquista.

AMO-TE ETERNAMENTE,

Sua sempre Flávia (D^a Maria).

Ao meu Deus, que me ilumina a cada amanhecer, que me deu a missão e a mim cabe cuidá-la. Que esse Céu continue sobre mim e o caminho aos meus pés. Quando acreditamos que merecemos, tudo é possível. Obrigada pela proteção, pela Fé e pela Força. Aos Santos, Anjos e Mentores que me deram a Sabedoria para discernir e me induziram as melhores decisões. Existe um só caminho, onde leva? Não me pergunte, siga-o. “Dê-me a tua mão e não me importarei com a distância a ser percorrida seguiremos juntos Eternamente”. Confia no SENHOR de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas. **Provérbios 3, 5-6.**

À minha Eterna Mãe Vera Leão, Deus que tua bênção cubra de luz a vida de minha Mãe para que, inundada de ti, ela seja sempre mais Presença do Divino em minha vida. Amém! Mãe, que me esperou, acompanhou, ajudou, cuidou, vibrou... É como a vida! Tu és a flor do meu jardim, a mais bela de todas e que dá sentido ao lindo paraíso dos meus sonhos. Tu és o sinônimo do meu Amor pela vida. Que estejamos sempre unidas, **FEITO MÃE, FEITO FILHA**. Obrigada por estares aí... aquela estrela... Estrela Polar que brilha todos os dias nos céus me orienta e protege pelos caminhos da Vida. Obrigada por ter vindo pelas mãos divinas... Por me transformar... Por ser hoje melhor que ontem e assim espero que seja por toda minha Vida. Sua bênção, minha Mãe. **Amo Eternamente.**

Ao meu Pai José Carlos Barbosa, o cheiroso, o que direi ao meu Pai? Direi simplesmente o que poucos falam. Olhar dentro dos teus olhos e dar um grande sorriso. Sorriso esse que ninguém lhe deu um dia. Há pessoas que transformam o Sol numa simples mancha amarela. Mas há, também, aquelas que fazem de uma simples mancha amarela, o próprio Sol. Nesse momento, o meu maior desejo, é poder transformar as manchas amarelas no Sol mais lindo que possa existir... **AMO VC.**

À Rosane, esposa do cheiroso, obrigada pelo carinho, amizade e respeito. *Cuidem-se.

Ao meu irmão, José Carlos Barbosa Júnior, os girassóis são as mais “felizes” das flores e seus significados incluem a lealdade e longevidade, são únicos na habilidade de prover energia vibracional, como um espelho do SOL, provendo seu calor e sua Luz, invocando sentimentos de calor, conforto e felicidade. Você, meu irmão, meu Girassol! **AMO-TE.**

Família Leão & Barbosa e aos Amigos, para todos aqueles em que penso com frequência, estejam eles presentes ou distantes da minha vida. Para todos aqueles a quem quero tão bem e que me povoam o pensamento com lembranças inesquecíveis e algumas com muita Saudade. As alegrias de hoje foram estímulos para tamanha conquista. ***Minha Vó Bel, Vó Véio (in memorian), Vó Noca (in memorian) Tia Rosângela, Tia Lena e Tia Vera, Tio Vadinho e Tio Silomar, Tia Maria, Tio Dorival e Tia Jê. **Minhas primas: Rebecca, Samantha e Virgínia, Letícia, Michele, Elisa, Lorena, Daniela, Luciane e aos primos: Eduardos, Jilson, Ryan, Nivaldo e Vanderval Neto, Luciano e Cláudio. Minha pequenina e amada priminha Geovana. AMO VOCÊS PARA TODO O SEMPRE.**

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes” Isaac Newton.
Ao querido Prof. Dr. Antonio Haddad, os momentos, as idéias... Nossa persistência... Quase uma década... Meu mestre, meu Amigo... Tudo está gravado em meu coração. Tua semente foi plantada e irá florescer. Você faz parte de minha Existência... Minha Eterna gratidão. Saudades!

Ao Prof. Dr. Sidney Júlio Faria e Sousa, por ter acreditado em mim, por me aceitar e por sua inestimável Dedicação, Paciência e Amizade. **Meus sinceros agradecimentos.**

Aos animais, minha respeitosa homenagem, pois passaram por nossas mãos entregando seus corpos para que pudéssemos compreender melhor os mistérios da vida. O olho é a janela do corpo humano pela qual ele abre os caminhos e se deleita com a beleza do mundo.

Minhas Dedicatórias

"... o que quero dizer simplesmente é que, desde aquele tempo, tudo o que eu tinha de executar neste mundo, procurava fazê-lo bem, que me devotei de corpo e alma a tudo que empreendi, e que assim, nas pequenas como nas grandes coisas, marchei sempre decididamente para o fim. Não acho que seja possível, mesmo aos filhos dos pais influentes, conseguir o êxito se não se unirem ao talento natural das qualidades simples, sólidas, laboriosas, e principalmente uma legítima confiança no sucesso: nada há no mundo como o poder da vontade." **David Copperfield**.

Exatamente **10 anos**. Foi em 1.999, que descobri à **FMRP/USP**... Os estágios, o Mestrado e enfim, o Doutorado. Agora entendi os enigmas do tempo! Caminhei soberana dos meus desejos, dos meus anseios. Os detalhes nos dão certeza de que existem pessoas Especiais, assim como vocês: **Minhas queridas Amigas-Irmãs-Mães: Vani**, sua **Amizade**, generosidade, atenção... Nunca esquecerei nossos momentos. **Izilda**, as histórias de dança, sua cumplicidade, sua alegria: Sentirei Saudades! **Tuca**, quantas vezes sentei na cadeirinha azul e fiquei horas papeando sobre as histórias de nossas vidas... Minha **"terapeuta"**! Levo vc Eternamente, Obrigada! **Teresa**, minha companheira nos horários de almoço, obrigada por tudo. A **Mara** (sempre disposta a me auxiliar), a **Cláudia** (pelo carinho e socorro nas estufas), a **Joana**, a **Lúcia** (por sua inestimável compreensão e amizade), a **Catarina** (querida e sincera), o **Marinho** (xeroqueiro, meus sinceros agradecimentos), o **Zé**, José Maulin (suportes no PC), o **Anderson**, os **Valdir** (mas ele é um só, obrigada pelos Cafés e os bate papos), o **Domingos**, pessoa incomparável. **À linda Marina Astragalli**, boa sorte e amei conhecer você!

Ao **Prof. Dr. João Kajiwara**, grande amigo e sua inestimável dedicação e o **Prof. Dr. Jorge Cury** pelo carinho e amizade. Às **Profs. Maria Célia e Constance Oliver** pelo carinho, atenção e eterna Amizade. Obrigada pelas letters recommendation. **À sua Equipe: Lili**, pessoa encantadora e eterna, **Júnior**, vc um Amigo e que me ajudou, a **Lorena**, desejo que o pedido daquela noite (nosso segredo do céu) se realize e vc é uma PESSOA simplesmente indescritível. **Celiane** se faz presente e atenciosa. **Vivian**, sempre prestativa, **Vanina, Pati, Maria Rita, Cláudia, Rodrigo, Willian, Valéria e Adriana**: obrigada sempre pelas conversas, dúvidas, cafés, sorrisos, experimentos... Levarei vcs eternamente.

Meu Amigo **Michel**, que mesmo distante dos meus olhos, faz presente em mim. Saudades...

Aos **Grandes** pós-graduandos da Bio Cel: **Rafa, Gus Borges, Kamila Peroni, Cristiano, Cleidson, Rodrigo Ribeiro, Guilherme, Milene, Gabi, Juliana, Josane, Valéria, Antonio, Mipsi, Maiaro, Lucas, Ana, Marcelão, Mari, Joni e Fausto Almeida**.

Aos **Docentes: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz, Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico, Profa. Dra. Maria Luísa Paço Larson, Prof.Dr. Roy Edward Larson e Prof. Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos**.

Aos **Funcionários** que deixarão belas lembranças para todo o sempre. Muito Obrigada!

Aos Eternos, **Prof. Dr. Eduardo Miguel Laicine, Prof. Dr. Rubens Bertazzolli** (Berta), longe é um lugar que não existe! Muito obrigada por tudo. SAUDADE IMENSA. Minha eterna **Angélica Gobbi Jorge**, filha única, mas que tem da vida uma eterna irmã, Flávia, meu coração agradece. Vc faz parte dessa história. **À Laura**, pessoa muito Especial e querida... Obrigada por TUDO!

A **CAPES**, a tão esperada bolsa, muito obrigada. A **FAEPA** pela atenção e auxílio.

Minhas Dedicatórias

No Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, deixaram suas marcas: **Prof.^a Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, Prof. Dr. Rodrigo Jorge, Prof. Dr. Jayter Silva de Paula, Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz, Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira**, a inesquecível **Maria Rossato** (a Maria da Cóclea), **Rita, Amélia, Édson, Querida Maria Cecília** (Pessoa formidável, meus sinceros agradecimentos) e **Rogério Castania**, obrigada a todos pelo carinho, atenção e respeito.

Aos pós-graduandos: **Gisele Oliveira** uma pessoa muito especial e Boa Sorte em tudo! Ao **Marcelo Jordão, Léssia Cintra, Alexandre de Faria, Rogério Néri, Carolina Módulo, Ariane Bonucci, Abrahão Lucena e David Lucena**. E aos **Especiais: Felipe Almeida e Fabrício Penha**.

Desde pequena, alguém sempre dizia e o Universo conspirou. Hoje, você, **Carlos Augusto Nunes**, faz parte desse sonho. Muito obrigada por soprar ao vento.

A Grande Família, **Naita Mello, Tia Célia e Geraldo (G)**, que estas linhas possam traduzir o meu Amor e a minha Eterna gratidão por estarem tão presentes em meu caminho. "Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz. A única falta que terá será a desse tempo que, infelizmente, nunca mais voltará". **Ná**, o nosso caminho é feito pelos nossos próprios passos, mas a beleza da caminhada depende dos que vão conosco! Assim é você, um presente da vida... E que possamos caminhar mais e mais... E que essa Bela Amizade seja como uma tocha que iluminará nossos caminhos. Minha Amiga-Irmã, que esse Elo nos prenda e nos encante para sempre. Obrigada!

Minha Amiga Marília Alessi, você uma companheira incomparável, o Bar do Silvão nosso relaxamento das Aulas de Estatística, as Farras, a Polícia, os Shows... Enfim, em pouco tempo demonstrou a diferença interiorizada em relação às demais e que passou a dividir comigo os mais diversos instantes de minha vida. Em quem confio; com quem ri ou chorei; que me levantou o astral e que me faz sentir bem pelo simples fato de poder compartilhar de sua existência. Pessoa essa a quem chamo de Amiga Especial AMO VOCÊ.

A minha sobrinha **Isabelly**, lembra? **САВАБОНА ШИКОБА**. Você é a **tradução**. Minha Eterna **Fran**, sempre fica um pouco de perfume nas mãos de quem oferece flores. Agradeço imensamente sua Amizade, Respeito, Força e Carinho.

As minhas irmãs **Auriane, Gabrielly e Isadora Barbosa**, para estar junto não é preciso estar perto, e sim do lado de dentro. AMO VOCÊS ETERNAMENTE. Ao **Manoel Carlos**, a vida me ensinou a dizer Adeus às pessoas que AMO sem ter que tirá-las do meu CORAÇÃO!

A toda equipe da **Executiva** pela torcida, amizade, atenção e carinho. **Paulinha**, pennnnnnna numa irmã de coração, obrigada pelo imenso Carinho, Atenção, Amizade e Apoio.

Jô, sua Amizade e Orações ficarão para todo o sempre, nó! Agradeço de coração eternamente.

Não importa a distância, e sim o AMOR, ao **Eterno Levi Aguiar Nunes**, sempre VOCÊ. Amo-te e muito Obrigada. À **Virgínia Dias**, por sua Amizade e Atenção. À minha querida e eterna **Roberta Dias**, lembra-te: "Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão." Obrigada por seu Amor e Amizade.

Em 2006, muita coisa mudou em meu caminho... Aprendi a olhar a vida com outros olhos, ou melhor, enxergar com os olhos da Alma. Você, **Teresinha F. Arruda** me entregou esse lindo dizer e nunca esqueci: "Aceita as surpresas que transformam teus planos, derrubam teus sonhos, dão rumo totalmente diverso ao teu dia e, quem sabe, à tua vida... Não há acaso. Dá liberdade ao Pai para que ele conduza a trama de teus dias..." Assim estou a seguir o meu caminho. Meu coração agradece.

Minhas Dedicatórias

Luisa Caliri, "Never take someone for granted. Hold every person close to your heart because you might wake up one day and realize that you've lost a diamond while you were too busy collecting stones". Thank you and if you ever need me, just give me a call and... **I WILL BE THERE**.

I'm very happy for this opportunity in my life and right now, I would like to thank **Dr. Steven E. Wilson** of the Cleveland Clinic Foundation.

Aos Laboratórios de **Microscopia Eletrônica e Histotecnologia** do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À notável equipe, **Maria Dolores Seabra Ferreira, Vani Maria Alves Correa, José Augusto Maulin e ao Domingos**, pela inestimável dedicação, atenção, amizade e auxílio. Querer bem é guardar dentro da alma a lembrança de alguém. É aquela crença forte e nunca desmentida. Naquilo que se espera. A **saudade** depois que tudo termina.

A minha **Abençoada Banca examinadora** pelo Aceite, Atenção, Carinho e Amizade.

A **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** e aos **Departamentos de Biologia Celular e Molecular e Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, pela oportunidade, meus sinceros agradecimentos.

*In the search for me, I discovered truth.
In the search for truth, I discovered Love.
In the search for love, I discovered God.
And in God, I have found everything.*

Flávia Leão Barbosa

Ribeirão Preto, 05 de Junho de 2009.

RESUMO

A fisiologia da renovação do epitélio da córnea constitui área de ativa investigação. A pesquisa foi centrada na regeneração do epitélio da córnea em olhos de coelhos submetidos a tratamentos que a estimulam. Para isto, em um primeiro grupo experimental, a córnea (olho direito) de coelhos albinos (Oryctolagus cuniculus) foi demarcada em sua porção central com um trépano de 6 mm e o epitélio periférico em relação à marca foi raspado uma ou mais vezes até o limbo (junção esclerocorneana) utilizando-se uma espátula oftálmica (esclerótomo). Em um segundo grupo, os animais tiveram a córnea demarcada com um trépano de 5 mm e o epitélio central dentro da marca foi raspado uma ou mais vezes. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam bilateralmente uma injeção intravítrea de ^3H -timidina ($^3\text{H-TdR}$) e foram sacrificados em vários intervalos após a injeção (12 horas a 49 dias). Em um terceiro grupo, olhos não estimulados receberam a injeção intravítrea de $^3\text{H-TdR}$ e sacrificados 8-24 horas após. As córneas foram processadas para obtenção de cortes histológicos, sendo processados para autorradiografia.

Os resultados da autorradiografia das córneas submetidas a debridamento central demonstraram que o alto índice de marcação foi observado a partir de 2 dias apenas no epitélio neoformado e não na periferia e no limbo. A lesão do epitélio da região central, mesmo em caráter múltiplo, não causou estímulo proliferativo no epitélio de revestimento do limbo ou da periferia da córnea. Nos intervalos mais longos onde se observou persistência da marcação epitelial, até 7 semanas após a lesão, houve expansão centrífuga da região contendo altos índices de marcação, demonstrando-se o papel quase

solitário do epitélio central na regeneração do epitélio corneano, sem qualquer evidência morfológica ou autorradiográfica da participação do limbo.

Em condições fisiológicas, foi observada marcação das células do estrato basal do epitélio do limbo (local das possíveis células tronco) em tempos relativamente curtos (6horas-2dias), após uma única injeção intravítrea de ^3H - timidina. Os dados se opõem aos conceitos correntes de que o estrato basal do limbo é a “residência” de células de ciclo lento, assim como de células que retêm a marcação nuclear adquirida em ciclo celular anterior, ambas situações consideradas características fundamentais de células tronco.

Os resultados demonstraram a capacidade do epitélio da região central na manutenção e regeneração do epitélio da córnea. Assim, as lesões centrais de até 5 mm foram reparadas com a participação exclusiva do epitélio que existia em torno da ferida. A raspagem periférica, por atingir a região do limbo, causou estímulo para a proliferação do seu epitélio, tendo os dados morfológicos indicado a sua contribuição em cerca de 25% para a re-epitelização. Os experimentos em que ocorreram múltiplos debridamentos periféricos na mesma córnea também demonstraram que o epitélio central não se esgotou na sua capacidade de proliferação.

Os resultados da presente investigação levantam dúvidas sobre a questão da localização de células tronco epiteliais exclusivamente no limbo, conceito altamente difundido na literatura oftalmológica.

ABSTRACT

The proliferation behavior of the corneal epithelium of rabbits was investigated by autoradiography after intravitreal injections of ^3H -thymidine (^3H -TdR) into eyes previously treated for central and peripheral epithelial debridement together with their respective controls. The corneal epithelium of un-stimulated rabbits killed at 8 and 24hr after a single injection exhibited segments with unlabeled nuclei all over its extension. At a long time intervals, 28-49 days, about 20% of the nuclei in the basal stratum were shown to be labeled. The highest frequencies of labeled nuclei were visualized in the central and peripheral regions where the corneal epithelium was undergoing regeneration, as well as around the site of debridement (including the limbal epithelium of eyes with peripheral scraping), whereas the labeling indexes for the untouched epithelium were comparable to control eyes. No evidence for the participation of the limbal epithelium in the regeneration of corneal epithelium could be detected, even in rabbits with the central region of their corneas scraped thrice. Also, no indication for the existence of slow-cycling cells could be found in the limbus in rabbits injected with the DNA precursor. Instead, quick proliferation and migration were evident for the unique basal stratum in the limbus. Cells which remained labeled for more than four weeks were detected in all eyes and this did not depend exclusively on epithelial damage. Therefore, if label-retaining is the only reliable criterion to characterize stem cells it is suggested that these ones are located throughout the corneal epithelium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	0
1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
1.2. O EPITÉLIO DA CONJUNTIVA	13
1.3. O LIMBO	17
1.4. O EPITÉLIO DA CÓRNEA	19
1.5. O FILME LACRIMAL	20
1.6. REPRODUÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS	21
1.7. FATORES MODULADORES E A REPARAÇÃO DO EPITÉLIO	22
1.8. REPARO DA LESÃO EPITELIAL DA CÓRNEA	23
1.9. A EXISTÊNCIA DE CICLO LENTO E RETENÇÃO DA MARCAÇÃO NO EPITÉLIO DA CÓRNEA	24
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. MANUSEIO DOS ANIMAIS	28
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	28
3.2.1 LESÃO PERIFÉRICA DA CÓRNEA	28
3.2.2 LESÃO CENTRAL DA CÓRNEA	29
3.2.3 A INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE ³ H-TDR EM ANIMAIS NÃO ESTIMULADOS	29
3.3. OBTENÇÃO DAS CÓRNEAS	30
3.4. O PROCESSAMENTO DAS CÓRNEAS	30
3.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	31
3.6. COLORAÇÃO PELO PAS	31
3.7. IMUNOHISTOQUÍMICA	32
3.8. AUTORADIOGRAFIA	33
3.9. CONTAGEM DAS CÉLULAS MARCADAS	33
4. RESULTADOS	35
4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS	35
4.2. AUTORADIOGRAFIA DOS OLHOS NÃO ESTIMULADOS	39
4.3. A RASPAGEM PERIFÉRICA DA CÓRNEA	41
4.4. MÚLTIPLAS RASPAGENS PERIFÉRICAS DA CÓRNEA (TRÊS RASPAGENS)	44
4.5. A RASPAGEM CENTRAL DA CÓRNEA	46
4.6. MÚLTIPLAS RASPAGENS CENTRAIS DA CÓRNEA (TRÊS RASPAGENS)	48
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1.Considerações iniciais

A superfície anterior do globo ocular e as superfícies internas das pálpebras são cobertas por um tecido epitelial onde as células, distribuídas em camadas, encontram-se firmemente unidas umas às outras (Bron et al., 1997). A principal função desse tecido é a proteção da superfície do olho da dessecação e da invasão microbiana. Serve, também, para a absorção de nutrientes dissolvidos na lágrima, como o oxigênio e a glicose. Na córnea, em específico, ele exerce a sua mais nobre função, ou seja, a de proporcionar interface lisa, homogênea e transparente, necessária à visão. Embora as características das células epiteliais e do córion subjacente variem conforme a região, (conjuntiva, o limbo ou a córnea), a mucosa ocular tende a reagir como um todo, em diversas enfermidades. Por isso, essas doenças foram agrupadas sob o nome de “doenças da superfície ocular” (Nelson et al.,1983). Entretanto, em virtude das funções da superfície ocular estarem intimamente relacionadas com a lágrima, o conceito foi posteriormente ampliado para “doenças da superfície ocular e do filme lacrimal” (Tseng e Tsubota, 1997)

1.2. O epitélio da conjuntiva

A conjuntiva é a membrana mucosa que reveste as faces internas das pálpebras e a superfície do terço anterior do olho, exceto a córnea. Ela permite movimentos independentes das pálpebras e globo ocular, fornece muco para lubrificação e contém tecido linfóide para a proteção imunológica. Inicia-se nas junções mucocutâneas das bordas palpebrais, posterior aos orifícios das glândulas meibomianas e termina ao redor da córnea.

Embora a conjuntiva seja contínua, ela é descrita como tendo uma porção palpebral e outra bulbar, separadas por dobra tecidual, em fundo de saco, chamada fórnice. Ela é firmemente presa aos tarsos e à junção córneo-escleral e frouxamente aderida aos fórnices e ao globo ocular. Em posição primária, os fórnices superior e inferior distam aproximadamente 8 milímetros do limbo; o fórnice medial dista 5 e o lateral a 14 milímetros do mesmo. O saco conjuntival habitualmente acomoda cerca de 7 μ l de fluido lacrimal.

Duas estruturas especializadas se apresentam na porção medial da conjuntiva: a prega semilunar e a carúncula. A primeira é uma dobra de conjuntiva que se estende do fórnice superior ao inferior. Serve como fonte adicional de conjuntiva, permitindo a rotação lateral do olho. A segunda, posicionada medialmente à prega, é essencialmente uma modificação do tecido cutâneo que alberga pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas, não sendo, contudo, queratinizada. Outros dois importantes elementos anatómicos mergulhados na conjuntiva são: as glândulas de Krause e as glândulas de Wolfring. Suas estruturas são similares às das glândulas lacrimais. As primeiras estão localizadas no fórnice superior e carúncula e a segundas, nas porções superiores do tarso superior e inferiores do tarso inferior.

Nos cortes histológicos, o epitélio da conjuntiva apresenta múltiplas camadas de células. A fileira de células mais interna, aderida a uma membrana basal, configura a camada das células basais. Essas células são as únicas a sofrer mitose. A membrana basal as separa do tecido conectivo subjacente denominado córion ou estroma. Acima da camada basal, encontram-se uma ou mais fileiras de células poligonais e, mais acima, acham-se as fileiras da camada superficial. As células desta última, dependendo da região ocular,

apresentam formatos que variam do cilíndrico ao pavimentoso, porém, sem queratinização e com núcleos evidentes. O nome do epitélio é baseado no formato dessas células. Assim sendo, as margens palpebrais são revestidas por epitélio pavimentoso estratificado. Do tarso ao fórnice, ele torna-se estratificado prismático. Do fórnice ao limbo, ele volta a ser estratificado pavimentoso, com células basais mais altas, camadas intermediárias mais numerosas e células superficiais progressivamente mais planas.

As células epiteliais da conjuntiva possuem bordas interdigitadas, unidas umas às outras por desmossomos. É essa adesão que dá resistência mecânica ao epitélio. As células mais superficiais apresentam ainda as junções ocludentes, que selam os espaços intercelulares. Isto confere ao epitélio a propriedade de membrana semipermeável, que facilita a passagem de moléculas lipossolúveis da lágrima para a conjuntiva e dificulta o movimento de proteínas e outras substâncias hidrossolúveis no sentido oposto. As células basais se prendem à membrana basal por meio dos hemidesmossomos.

As superfícies das células epiteliais da conjuntiva apresentam microvilosidades e o respectivo glicocálice, ambos responsáveis pela aderência da mucina da lágrima. As células caliciformes são as principais fontes dessa mucina, elemento essencial para a lubrificação da superfície ocular. Essas células distribuem-se por toda conjuntiva, na forma isolada ou agrupadas em criptas mucosas. Elas se originam na camada basal do epitélio e vão se avolumando à medida que caminham para a superfície. Ao atingir a superfície, secretam, ou seja, descarregam o conteúdo dos seus grânulos e assim permanecem até a sua descamação. A frequência das células caliciformes é máxima nasalmente, particularmente na prega semilunar, mínima no fórnice

temporal superior e nula no limbo e nas junções muco-cutâneas das bordas palpebrais. Seu número aumenta nas inflamações crônicas e diminui no olho seco, penfigóide e na deficiência de vitamina A.

O córion da conjuntiva compõe-se de uma camada linfóide superficial e uma camada fibrosa profunda. A camada linfóide é a que vem logo abaixo da membrana basal do epitélio. É constituída por tecido conjuntivo frouxo contendo uma população de linfócitos. Abaixo da camada linfóide encontra-se a camada fibrosa na qual se assentam os nervos, os vasos conjuntivais e as glândulas de Krause. A configuração do córion também varia com a região do olho. Na porção tarsal, ele é sinuoso, formando múltiplas elevações, com o centro ocupado por minúsculos vasos sangüíneos. Essas elevações, chamadas papilas, são niveladas pelo epitélio que as cobre, mantendo plana a superfície da conjuntiva na região. No fórnice o córion forma numerosas pregas e sulcos, em geral transversais. No globo ocular, o córion apresenta-se liso, sem pregas ou sulcos. Entretanto, na região límbica, o córion forma numerosas pregas radiadas em torno da córnea, denominadas cristas papilares, mais evidentes nas regiões inferior e superior. Essas cristas também são niveladas pelo epitélio suprajacente.

1.3. O limbo

O limbo é a zona de transição entre a esclera e a córnea. Nessa região, o epitélio da conjuntiva bulbar perde as células calciformes e se continua com o corneano. A largura da superfície do limbo é de 2 milímetros no meridiano vertical e de 1,5 milímetros no horizontal. Seu limite corneano anterior é a borda da camada de Bowman. Seu limite corneano posterior é a borda da camada de Descemet. Seu limite escleral é uma linha vertical imaginária que tangencia o ápice do esporão da esclera.

O epitélio nessa região é do tipo pavimentoso estratificado. Nos cortes histológicos, ele apresenta o dobro de camadas celulares que o epitélio corneano e repousa sobre uma delgada membrana basal contínua diretamente com a da córnea. Na zona de transição entre o epitélio límbico e o corneano são identificadas células basais menores, com núcleos grandes e nucléolos proeminentes, que determinam um contraste muito típico nas preparações histológicas (Busacca, 1952). O córion forma numerosas pregas radiais em torno da córnea, conhecidas como cristas papilares. Elas nada mais são que papilas alongadas, bem evidentes no limbo inferior e superior e praticamente inexistentes no nasal e temporal. Os vales, formados entre as cristas, são preenchidos por epitélio, que mantêm a regularidade da superfície mucosa. Esses preenchimentos epiteliais são visualizados, na biomicroscopia, como formações minitubulares de aspecto vítreo, dispostos como estrias paralelas em torno da córnea. Por causa do aspecto, recebem o nome de paliçadas de Vogt. Suas bordas são tão mais definidas quanto mais pigmentadas forem as células basais do preenchimento epitelial. As cristas papilares são irrigadas por delicadas alças vasculares oriundas das artérias episclerais. Os tecidos

conjuntivos densos da córnea, episclera e esclera formam uma estrutura contínua.

A principal diferença entre os epitélios da conjuntiva e do limbo é a ausência de células caliciformes no último. A diferença mais marcante entre a córnea e o limbo é a presença de suprimento sangüíneo no tecido conjuntivo do último.

Estudos mais abrangentes, já levaram às evidências estruturais e bioquímicas sugestivas não só da individualidade anátomo-funcional do limbo, como também, da possibilidade de que a região seja o reservatório das células tronco da córnea (Daniels et al., 2001). Um exemplo típico dessas evidências, freqüentemente citado na literatura, é a presença das citoqueratinas 3 e 12 em todo o epitélio da córnea e limbo, com exceção da camada basal do último. Como estas citoqueratinas são marcadores da diferenciação celular do epitélio corneano, isto tem sido aceito como prova da baixa diferenciação dessas células basais e, portanto, uma evidência indireta de que a região acomode as células tronco da córnea. (Schermer et al., 1986; Kurpakus et al., 1990). Outro exemplo relaciona-se com o fato de que a maioria das células basais límbicas ser total ou parcialmente destituído de conexinas (exemplo: integrina $\alpha 9$). Como essas proteínas são necessárias para a formação das “junções comunicantes”, presume-se que haja uma falta de comunicação intercelular na região. Esse fenômeno seria um indício da presença de células indiferenciadas no limbo. As células completamente desprovidas de conexina 43 seriam células germinativas primitivas e as parcialmente destituídas dessa proteína seriam sua mais direta progênie (Matic et al., 1997).

1.4. O epitélio da córnea

O epitélio da córnea se continua com o do limbo. Sua espessura é em torno de 50 μm . É um epitélio do tipo estratificado pavimentoso. À microscopia de luz, as células basais compõem uma fileira única de células colunares que repousam sobre uma membrana basal lisa. Tal como na conjuntiva, elas são mitoticamente ativas. Acima da camada basal encontram-se duas ou três camadas de células poligonais e, mais superficialmente ainda, outras duas ou três fileiras de células pavimentosas não ceratinizadas.

À microscopia eletrônica, o epitélio é formado por células com citoplasma contendo redes de tonofibrilas e escassas organelas. As células basais são particularmente ricas em tonofibrilas (filamentos intermediários formados por queratinas) ancoradas em desmossomos e filamentos de actina. As tonofibrilas são as responsáveis pela manutenção da arquitetura celular enquanto que os filamentos de actina têm papel relevante na migração celular por adesão focal, durante o processo de reparação epitelial. Essas células estão firmemente aderidas a uma membrana basal por hemidesmossomos. A membrana basal, por sua vez, une-se ao estroma corneano superficial por meio de fibras ancorantes.

A camada de células poligonais destaca-se pelo grande número de desmossomos. As células da superfície exibem microvilosidades, com abundante glicocálice. Suas junções ocludentes conferem ao epitélio corneano a propriedade de membrana semipermeável.

Diferentemente do epitélio conjuntival, o corneano assenta-se sobre uma camada de tecido conjuntivo compacto, ou seja, sobre a camada de Bowman do estroma corneano. Esta é uma camada acelular, de 7 a 12 μm ,

presumivelmente sintetizada pelos queratócitos superficiais da córnea. Ela é constituída por delgadas fibrilas colágenas cruzadas em todas as direções e com arranjo condensado. Isto, presumivelmente, lhe confere resistência aos traumas e às invasões de microorganismos ou de células tumorais. A camada de Bowman é perfurada por grande quantidade de nervos não mielinizados, que inervam o epitélio da córnea. Ela não tem capacidade de regeneração.

1.5. O filme lacrimal

A lágrima oxigena, nutre, lubrifica e lava a superfície ocular, contribuindo para a vitalidade das células epiteliais, para a proteção contra a adesão e invasão microbiana e para manutenção das propriedades ópticas da córnea. Ao longo das bordas posteriores das pálpebras a lágrima forma um menisco côncavo onde mergulham os pontos lacrimais. Ela é eliminada do saco conjuntival, parte por absorção, parte por evaporação e parte pelo escoamento no sistema naso-lacrimal.

O filme lacrimal é composto por três camadas: uma profunda, de mucina, uma intermediária, aquosa e uma superficial oleosa. A camada de mucina adere-se ao glicocálice das células epiteliais. É derivada das células caliciformes da conjuntiva. A mucina reduz a tensão superficial da superfície epitelial favorecendo sua umidificação. Entretanto, estudos atuais sugerem que a superfície ocular se mantém razoavelmente molhada mesmo na ausência de mucina, devido à riqueza de glicocálice das suas células superficiais (Cope et al., 1986, Liotet et al., 1987; Dilly, 1985).

A camada aquosa é a mais espessa. Contém sais, enzimas, substâncias antimicrobianas (exemplo: lisozima e lactoferrina) e mucina dissolvida (Bron and Seal, 1986). É secretada pelas glândulas lacrimais

principais e acessórias. Inúmeras células estão presentes nessa camada, derivadas do epitélio corneano e conjuntival, assim como do tecido linfóide conjuntival e vasos conjuntivais.

A camada oleosa é a mais superficial e a mais delgada. É derivada principalmente da secreção das glândulas tarsais e, secundariamente, das glândulas de Zeis. Contém ésteres de ácidos graxos e colesterol. A função dessa camada é retardar a evaporação do filme lacrimal. É funcionalmente avaliada pelo teste do tempo de ruptura do filme lacrimal.

1.6. Reprodução das células epiteliais

As populações celulares dos organismos dos mamíferos podem ser classificadas (Leblond, 1991) em **a)** não renováveis (exemplo: neurônios); **b)** em expansão (exemplo: a proliferação observada para o crescimento dos órgãos) e **c)** renováveis (exemplo: sangue e epitélios). Nas populações renováveis, células germinativas coexistem com células altamente diferenciadas. As células germinativas, denominadas células tronco, têm basicamente as seguintes propriedades: (1) são pouco diferenciadas, com poucas organelas citoplasmáticas; (2) tem vida longa, com ciclo lento de divisão celular; (3) tem a capacidade de divisão assimétrica. Quando a divisão é assimétrica, uma das células filhas permanece indiferenciada, para recompor o arsenal celular original, enquanto que a outra se destina a multiplicação e diferenciação (Lanza et al.,2006).

À luz dos conhecimentos atuais, aceita-se que o revestimento da superfície ocular, à semelhança do cutâneo, siga o modelo de renovação celular mediado por células tronco. Como as células epiteliais da conjuntiva e

córnea multiplicam-se na camada basal, presume-se que as células tronco se localizem nessa camada. A questão ainda a ser respondida é em que região da camada basal elas se encontram.

Relativamente à córnea, prevalece a idéia de que as células tronco estejam na camada basal do epitélio límbico. A hipótese do “nicho de células tronco” (Schofield,1983), pressupõe que essas células estejam abrigadas em locais que previnam a diferenciação celular e que esses locais estejam no limbo. Também presume que as sinuosidades das paliçadas de Vogt, ao aproximarem os vasos sangüíneos das células basais do epitélio, favoreçam o aporte de substâncias que possam favorecer a “indiferenciação” das células tronco.

Em termos de células tronco, acredita-se na seguinte sequência de eventos: após a divisão celular uma célula filha permanece como célula tronco, para recompor o nicho, enquanto que a outra torna-se uma “célula amplificadora transitória”. As células amplificadoras caminham para centro da córnea, povoando a camada basal da mesma. Após novos ciclos de divisão celular, parte delas entra num processo de diferenciação terminal, passando pelos clássicos estágios de células poligonais, células escamosas e descamação. A outra parte, que não seguiu o curso da diferenciação terminal, repõe as células basais.

1.7. Fatores moduladores e a reparação do epitélio

A manutenção da integridade da superfície ocular depende, dentre outras coisas, da presença de inúmeros fatores moduladores oriundos na inervação ocular. Os neurônios do gânglio trigêmeo, por exemplo, liberam fatores que estimulam as células epiteliais da córnea a crescer, proliferar e

diferenciar. Fatores neuroquímicos adicionais são fornecidos pelo filme lacrimal. É por isso que os olhos que apresentam problemas da inervação da superfície têm maior risco de lesões epiteliais. Outros fatores envolvidos nesses processos são: a substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator neurotrófico ciliar (CNTF), a norepinefrina, a acetilcolina e a neurotensina (Muller et al., 2003).

No processo de reparação da superfície ocular também existem evidências de complexas interações entre as células do epitélio e os fibroblastos da córnea, mediadas por fatores moduladores. Por exemplo, quando uma célula epitelial é agredida, ela libera interleucina-1 β . Esta, por sua vez, estimula os fibroblastos do limbo a secretarem o fator de crescimento do queratinócito (KGF) e os fibroblastos da córnea a secretarem o fator de crescimento do hepatócito (HGF). Especula-se que o KGF seja um ativador de mitose das células tronco do limbo e que o HGF estimule a migração das células amplificadoras transitórias em direção à córnea (Li and Tseng, 1995).

1.8. Reparo da lesão epitelial da córnea

A perda de uma área do epitélio da superfície ocular é habitualmente seguida por uma seqüência típica de eventos: logo após a lesão celular, cessa imediatamente a atividade mitótica local e a reparação se faz pela migração das células basais circunjacentes para o centro da lesão. O movimento das células, em trânsito, parece advir de um rearranjo das fibras de actina (Gipson et al., 1982) dentro das finas extensões filopódicas das células migrantes (Pfister, 1975). Para transladarem-se, as células desatam-se das vizinhas e da

membrana basal e viajam, com movimentos amebóides, até seu curso ser detido pelo contato com as células de sentido oposto. Então, elas voltam a se ancorar na membrana basal e as mitoses retornam, até o restabelecimento da espessura epitelial original. As junções ocludentes se refazem, restaurando a permeabilidade seletiva do epitélio (Thoft and Friend, 1977).

Quando a perda do epitélio da córnea é total, incluindo o limbo, a reparação é feita pela conjuntiva. A córnea torna-se coberta por um epitélio semelhante ao da conjuntiva, contendo células caliciformes e um grau variado de vascularização superficial. O fenômeno é conhecido como conjuntivalização da córnea. Com o passar do tempo, o epitélio pode permanecer assim ou recobrar o fenótipo original. A última situação foi inicialmente interpretada como decorrente de uma transdiferenciação das células conjuntivais em corneanas (Thoftt and Friend, 1977). Atualmente, prevalece a hipótese de que essa recuperação decorra da proliferação de células tronco límbicas, poupadas da destruição (Tseng et al, 1982).

1.9. A existência de ciclo lento e retenção da marcação no epitélio da córnea

A fisiologia da renovação da célula epitelial da córnea constitui área de ativa investigação. O epitélio da córnea mantém sua população celular em equilíbrio dinâmico entre perda e renovação, a capacidade de auto-renovação rápida e possui um reservatório de células conhecidas como células tronco, semelhante a outros órgãos que possuem esse tipo de equilíbrio (Thoft & Friend, 1983). Nas situações em que há necessidade de regeneração tecidual, as células germinativas entram em mitose, originando uma célula-filha, que

permanece como célula germinativa, garantindo a manutenção das mesmas, e outra destinada a dividir-se e diferenciar-se na célula epitelial da córnea (Tseng, 1989).

A proposta de renovação do epitélio da córnea foi apresentada na forma de Carta aos Editores (Thoft & Friend, 1983), sendo conhecida mais tarde como a hipótese X, Y, Z. De acordo com ela, a perda das células da superfície (Z) seria compensada por mitoses que ocorreriam no estrato basal (X) mais a migração das células periféricas (células tronco?) em direção ao centro da córnea (Y), donde $X+Y=Z$. Todavia, a participação das células periféricas (mais tarde consideradas células tronco por outros investigadores) ainda não foi comprovada. Além disso, os dados, que estão de acordo com estudos realizados em córneas de rato (Haskjold et al., 1989; Haddad, 2000) sugerem que as capacidades proliferativas de células basais centrais são suficientes para garantir a renovação do epitélio da córnea em condições fisiológicas. A localização das células tronco para o epitélio da córnea (Bron et al., 1997) continua a ser investigada. Duas linhas de pesquisas essenciais têm prevalecido nessa questão: a) marcadores moleculares confiáveis para células tronco (exemplo: ABCG2, P63, α enolase); b) marcação de DNA caracterizando células de ciclo lento e as retentoras da marcação (Haskjold et al., 1989; Beebe and Masters 1996; Góes et al., 2008). A identificação das células tronco da córnea na região límbica tem sido baseada em marcadores (Gerdes et al., 1983; Zieske et al., 1992; Schlotzer-Scherhardt et al., 2005). Esses marcadores identificariam características específicas das células basais do limbo, que demonstram que a estrutura histológica do mesmo é única. O que os marcadores ainda não conseguiram provar é que essas características

únicas estejam relacionadas ao fato dessas células se comportarem como células tronco. Todos os trabalhos da Literatura que propõem que as células germinativas da córnea estejam situadas no limbo partiram de experimentos onde o centro da córnea é desepitelizado. Com isso a regeneração parte sempre da periferia, donde a conclusão que o limbo é a fonte das células epiteliais neoformadas. Investigadores usaram 5-bromo-2-deoxiuridina associada à imunohistoquímica, e timidina radioativa com a autoradiografia, que é a mais confiável técnica para revelar, por longos períodos de tempo, eventos associados à renovação da população celular (Leblond 1965, 1991; Rogers 1979). Uma única administração do marcador de DNA possibilita a identificação de células de ciclo lento e a sua comprovação pode ser conseguida por administração múltipla ou contínua do marcador. A retenção da marcação é caracterizada pela persistência, durante pelo menos 4 semanas, de marcação adquirida em ciclo anterior (Cotsarelis et al., 1989; Lehrer et al., 1998; Lavker et al., 2004). Atualmente, em vista da impossibilidade da caracterização de células tronco do epitélio da córnea por imunohistoquímica, o ciclo lento e a retenção de marcação estão sendo consideradas as características mais importantes das células tronco.

2. OBJETIVO

Investigar a regeneração do epitélio corneano, após lesões parciais em várias das suas regiões, através de autorradiografia, focalizando as características previamente mencionadas para a identificação de células tronco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manuseio dos animais

Foram utilizados coelhos albinos New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*), de cerca de 3 meses de idade, com peso corporal entre 2 e 2,5kg, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os procedimentos cirúrgicos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (PCARP nº. 2005.1.779.53.5).

Os animais foram anestesiados através de uma injeção intramuscular com uma solução de ketamina 10% (AGENBER) e xilazina 2% (DOPASER). Antes do ato cirúrgico no olho direito, os olhos foram lavados com solução salina fisiológica estéril e instilados, no saco conjuntival inferior, com o colírio anestésico, cloridrato de proximetacaína (Anestalcon-0,5%, ALCON®).

3.2. Grupos Experimentais

3.2.1 Lesão Periférica da córnea

Utilizando-se microscópio cirúrgico Zeiss OPMI 6, as córneas foram demarcadas em sua porção central com um trépano de 6 mm e o epitélio periférico em relação à marca foi raspado até o limbo (junção esclerocorneana) utilizando-se uma espátula oftálmica (esclerótomo). Os animais foram sacrificados nos intervalos 4, 7, 12 e 36 horas.

Em outra série experimental, logo após a lesão periférica, os animais receberam uma injeção intravítrea de 50µCi/olho de timidina-³H ([³H-methyl]-thymidine (³H-TdR), Amersham, atividade específica 25 Ci/mmol, GE

Healthcare) usada para marcação de células que se encontram na fase S do ciclo celular. Esses animais foram sacrificados 12, 24 e 48 horas após raspagem. Omitimos a raspagem do epitélio dos respectivos olhos esquerdos, que serviu como controle.

Num segundo protocolo experimental, foram realizadas três raspagens nos olhos direitos em intervalos de uma semana. Um dia após última raspagem (terceira raspagem periférica), os animais receberam a injeção intravítrea de $^3\text{H-TdR}$. Esses foram sacrificados nos intervalos de 1, 2 e 3 dias após injeção. Também foi omitida a raspagem do epitélio do respectivo olho esquerdo, que serviu como controle.

3.2.2 Lesão Central da córnea

Num segundo grupo, os animais tiveram as córneas demarcadas com um trépano de 5 mm e o epitélio central dentro da marca foi raspado. Imediatamente após lesão, receberam injeção intravítrea de $^3\text{H-TdR}$. Esses animais foram sacrificados nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 14, 28 e 49 dias após raspagem.

Em outra série de experimentos, o epitélio central foi raspado três vezes em intervalos de uma semana. A $^3\text{H-TdR}$ foi injetada após o primeiro dia da última raspagem e os animais sacrificados 1 dia após injeção.

3.2.3 A injeção intravítrea de $^3\text{H-TdR}$ em animais não estimulados

Nesse grupo experimental, os animais sob condições fisiológicas, receberam a $^3\text{H-TdR}$ bilateralmente. Foram utilizados nessa série quatro animais, dois sacrificados 8 horas após injeção e dois após 24 horas.

Após os procedimentos descritos acima, a lavagem com salina foi feita após cada raspagem do epitélio e os coelhos receberam instilação ocular com o colírio antibiótico gatifloxacino (Zymar[®]- 0,3%, ALLERGAN) no pós-operatório imediato.

3.3. Obtenção das córneas

Para a retirada das córneas, coelhos foram injetados, por via endovenosa, com dose letal tiopental sódico. Após decapitação os olhos foram enucleados, limpos do excesso de tecidos adjacentes, fixados em formaldeído 4% de preparação recente, por 24 horas, à temperatura de 4°C. Após este tempo, as córneas foram extraídas cortando-se a cerca de 2 mm posteriormente à zona esclero-corneana e processadas conforme descrito no item a seguir.

3.4. O processamento das córneas

Após a primeira fixação, as córneas foram divididas em quatro quadrantes, tomando-se o cuidado de proteger o epitélio contra abrasões. Um dos quadrantes foi re-fixado em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (Sorensen) 0,1M, pH 7,2, durante 2-4 horas, à temperatura de 4°C e, por sua vez, dividido em fragmentos menores, identificando-se os centrais e os periféricos (com a esclera). Esses fragmentos foram processados para inclusão rotineira em resina, pós fixação em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄). Esse material foi utilizado para obtenção de cortes semifinos. Quando indicado, as inserções dos músculos extraoculares foram identificadas com ponto de fio cirúrgico 6-0, antes da enucleação dos olhos. As preparações obtidas foram processadas para análise morfológica e autorradiográfica.

3.5. Processamento histológico

Após a fixação descrita acima, os quadrantes de córnea destinados à inclusão em parafina foram lavados 3 vezes no mesmo tampão. A seguir, foram imersos em série de concentração crescente de etanol, diafanizados em benzol e impregnados e incluídos em parafina. Após a inclusão, cortes perpendiculares de 5µm de espessura foram colados em lâminas, desparafinizados, corados por HE e montados. Outros cortes, pré-corados ou não com ácido periódico-Schiff (PAS) foram processados para autorradiografia. Finalmente, cortes de parafina foram, também, utilizados para imunohistoquímica.

Os fragmentos de córneas destinados à inclusão em resina hidrofóbica foram fixados como descrito no item anterior. Após lavagem em tampão fosfato 0,1M, os fragmentos foram desidratados em soluções de etanol de concentrações crescentes, tratados por óxido de propileno, infiltrados em misturas de óxido de propileno e resina do tipo epóxi, marca LX 112 (Ladd Research Ind., Burlington, VT, U.S. A) e incluídos em resina plena.

Cortes semi-finos de 0,75µm, obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, foram corados com azul de toluidina 1% ou processados para autorradiografia.

3.6. Coloração pelo PAS

As lâminas destinadas à reação de PAS foram lavadas em água corrente, por 10 minutos, 3 banhos de água destilada, imersas em ácido periódico 0,5% por 10 minutos, lavadas em água destilada e tratadas com reativo de Schiff (fucsina básica 0,5% em solução aquosa saturada de anidrido

sulfuroso) por 20 minutos. Imediatamente após o tratamento com o reativo de Schiff, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, em água sulfurosa de preparação recente e, a seguir, em água corrente por 5 minutos e 2 banhos de água destilada. Foram contracoradas fracamente com hematoxilina, lavadas em água corrente, em água destilada e montadas.

3.7. Imunohistoquímica

As lâminas, após desparafinização e hidratação, foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e, a seguir, lavadas em água e salina tamponada com fosfato 0,05M (PBS). As lâminas foram tratadas com solução de albumina de soro bovino (BSA) 2% e Triton X-100, 0,1%, pH 7,4, por 30 minutos a 25°C e, em seguida, com BSA 1% e Triton X-100 0,5%, por 30 minutos a 25°C. A seguir foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal Anti Pan-citoqueratinas (SIGMA), por 2 horas, em câmara úmida, diluído 1:100, em solução BSA 1% e Triton X-100, 0,5%. Foram, então, lavadas em PBS por 30 minutos (3 banhos de 10 minutos) e, logo após, incubadas com anticorpo secundário IgG gerado em cabra contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Hyclone), por 2 horas, em câmara úmida, diluído 1:200, em solução de BSA 1% e Triton X-100, 0,5%. Após lavagem em PBS, 3 vezes, por 10 minutos cada, foram tratadas durante 20 a 30 minutos com 3-3'diaminobenzidina (DAB, Sigma) 0,05% com H_2O_2 0,02% em tampão Tris-HCL, 0,05M, pH 7,4. A seguir as lâminas foram desidratadas e montadas em Permount.

3.8. Autorradiografia

As lâminas com cortes de parafinas pré coradas ou não pelo P.A.S. e cortes semi-finos corados por hematoxilina férrica (Schantz A, Schecter A., 1965) foram revestidas em câmara escura com emulsão fotográfica LM1 (Amersham), diluída 1:1 (vol/vol) em água destilada. Após secagem da emulsão, as lâminas foram recolhidas para caixas à prova de luz e expostas por tempos variáveis a 4° C e em ambiente seco. Ao final do tempo de exposição (2 meses), os autogramas foram revelados em revelador fotográfico D-170 (Kodak) e fixados em tiosulfato de sódio a 24%. Ao término do processamento fotográfico, as preparações pré-coradas com hematoxilina férrica e secas ao ar foram montadas em Permount. Os cortes de parafina foram montados de acordo com a técnica proposta por Kopriwa e Leblond (1962).

3.9. Contagem das células marcadas

As células marcadas eram reconhecidas pela presença de grãos de prata sobre os núcleos das células que incorporam ³H-TdR durante a fase S do ciclo celular.

O índice de marcação (porcentagem de células marcadas ou número de células marcadas em cada 100 contadas) foi obtido por contagem através de um retículo de 20X20 divisões (Zeiss, cat. n° 474004), inserido numa das oculares do microscópio. Nas condições de contagem realizadas, cada divisão apresentava 12 µm de lado. Para as medidas lineares foi usado o retículo Zeiss, cat. n° 474011.

O epitélio da córnea dos olhos de animais não estimulados e sacrificados 8 e 24 horas após injeção, foi dividido em segmentos de 250 μm com ajuda dos discos micrométricos e o número de núcleos marcados com a timidina foram contados. Considerando que as córneas de coelhos exibem um raio de 7 mm, 28 medidas foram realizadas do limbo ao centro da córnea.

4. RESULTADOS

4.1. Características Gerais

Tanto ao exame com a vista desarmada quanto sob exame microscópico verificou-se que as inserções dos músculos extraoculares ocorriam muito próximas à zona esclero-corneana. Assim, foram observadas células (fibras) musculares estriadas esqueléticas inserindo-se a 0,4-0,6mm da borda da membrana de Descemet e 0,65-0,9mm da borda do epitélio corneano (Figura 1A).

Em regiões de inserção do músculo extraocular, particularmente na inserção do músculo reto superior, a vascularização do estroma da córnea foi um achado regular in vivo com microscópio cirúrgico e confirmado por observações com a microscopia de luz (Figuras 1A, B). Nesse local, a vascularização do estroma estendeu-se centripetamente quase 2 mm além da borda da membrana de Descemet. Em outras inserções musculares a vascularização do estroma foi de menor extensão do que a observada no reto superior, sendo em média de $512 \pm 156 \mu\text{m}$.

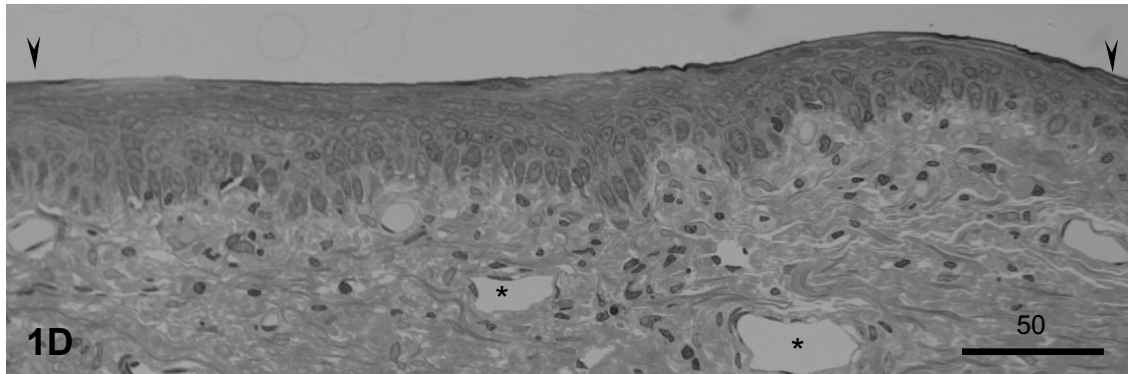
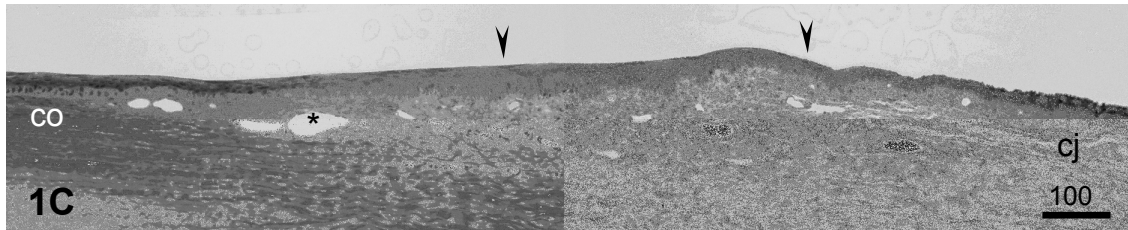
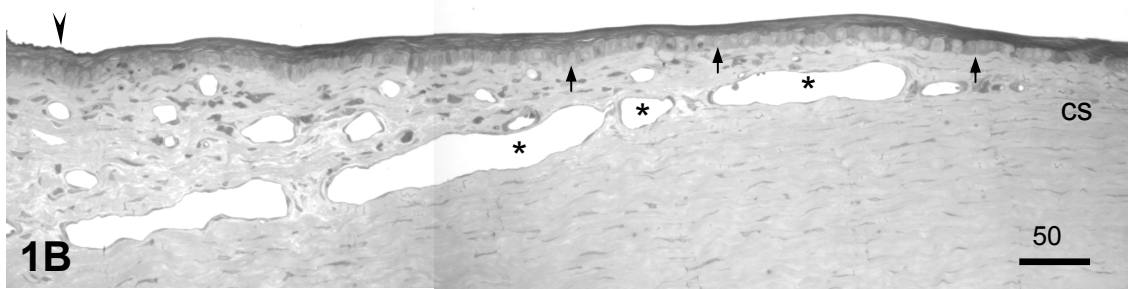
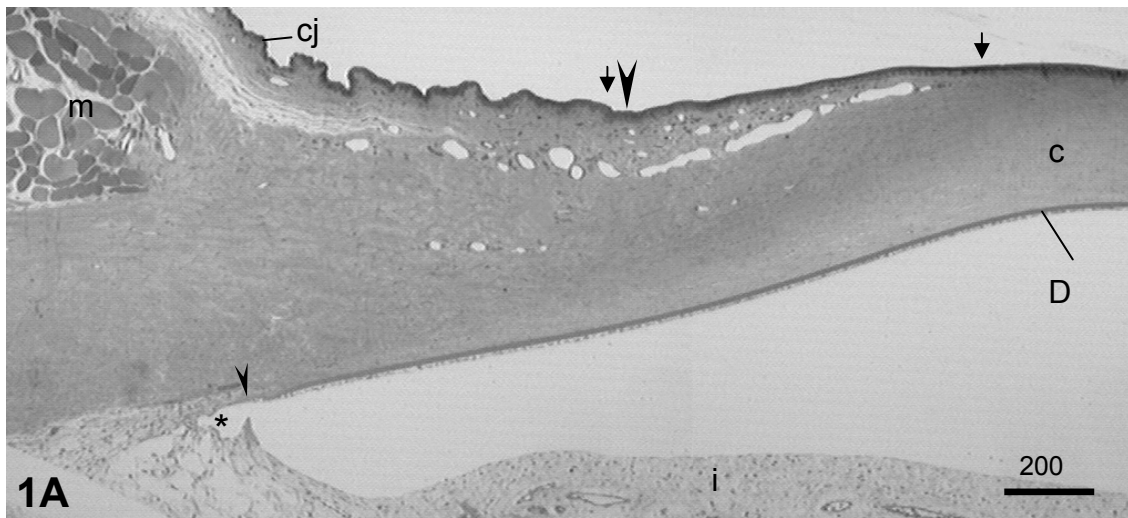
Três regiões morfológicamente distintas foram reconhecidas na transição córnea-conjuntiva de coelhos: **(1)** uma conjuntiva típica, **(2)** intermediária ou limbo, e **(3)** a córnea. Embora essas três regiões foram sempre identificadas ao redor de toda circunferência do olho, suas extensões eram variáveis, dependendo da localização das inserções dos músculos extraoculares. Cada região mencionada acima exibia características histológicas únicas.

Nos locais de inserções do músculo, o epitélio ($25,7\pm 3\mu\text{m}$ espessura) foi caracterizado por um epitélio basal constituído por células cubóides ou colunares baixas com citoplasma de pouca afinidade pelos corantes (H.E, P.A.S. ou hematoxilina férrica). O número de células claras no estrato basal foi variável (11 a 56) assim como suas extensões ($327\pm 110\mu\text{m}$). Um estrato intermediário (células aladas) não foi observado nessa região e as camadas suprabasais do epitélio foram compostas por células escamosas coradas fortemente por todos os corantes descritos. A média da penetração centrípeta dos vasos sanguíneos no estroma foi $512\pm 156\mu\text{m}$ além da borda da membrana Descemet, na inserção do músculo reto superior foi de 2 mm aproximadamente (Figuras 1A, B).

Nas regiões entre inserções de músculos extraoculares (Figuras 1C, D), o epitélio exibiu características intermediárias da córnea e da conjuntiva, sendo destituído de células caliciformes. As células epiteliais basais cubóides, com coloração leve do citoplasma eram escassas (5 a 11). A base das células constituindo o estrato basal era pregueada, sendo, a membrana basal quase imperceptível, com o microscópio de luz.

As características morfológicas gerais do epitélio da córnea de coelho já foram descritas em cortes de parafina e semifino (Haddad, 2000). Sua espessura variou de 26,1 a $42,8\mu\text{m}$. As células claras cubóides foram raramente observadas nesse epitélio e nunca além de uma extensão média de $60\mu\text{m}$, como prolongamento do estrato basal do limbo. A junção epitélio-estroma era plana, observando-se membrana basal distinta, com aproximadamente $1\mu\text{m}$ de espessura, fortemente corada por PAS e hematoxilina férrica.

Figura 1: Cortes semifinos corados com azul de toluidina (**A e B**). **A:** Conjuntiva (cj), córnea (c), o ângulo da câmara anterior (*) e a inserção do músculo reto superior (m). Pequena cabeça de seta aponta membrana de Descemet, e a grande, a periferia do limbo. Nota-se vascularização do estroma estendendo-se para a periferia da córnea (c). A área entre as duas setas verticais está ampliada em **B**. i, íris. **B:** Além da vascularização (*) do estroma, distintas células claras são observadas no estrato basal do epitélio estratificado (setas). Todas as camadas suprabasais estavam fortemente coradas. O limite entre a conjuntiva e o limbo é indicado pela cabeça de seta. O típico estroma corneano (cs) é observado na extremidade direita da figura. **C:** Visão panorâmica da transição conjuntiva (cj) - córnea (c) entre inserções musculares. Cortes semifinos corados com hematoxilina férrica (**C e D**). A conjuntiva (cj) com seu epitélio contendo células calciformes é visto a direita e a córnea (c) à esquerda. Entre eles há uma transição revestida por uma mucosa com epitélio estratificado sem células calciformes, alcançando espessura máxima de aproximadamente 50 µm, contendo células basais com a superfície basal pregueada. O estroma adjacente é vascularizado com fibras colágenas não organizadas. O número de células claras basais cubóides é reduzido nesse epitélio. **D:** Maior aumento correspondente à área indicada pelas duas cabeças de setas em C. Os números sobre as barras expressa µm.



4.2. Autorradiografia dos olhos não estimulados

Considerando apenas os olhos normais (não estimulados) assim como os controles (olhos esquerdo) nos experimentos das raspagens, os núcleos marcados foram praticamente restritos ao epitélio da córnea, visto que as células endoteliais não estavam marcadas e queratócitos, muito raramente exibiram marcação dos núcleos.

A distribuição das células marcadas a cada 0,25mm de epitélio, do limbo ao centro da córnea, em 8 horas após injeção pode ser verificada na Figura 2A. Neste intervalo a marcação dos núcleos localizados exclusivamente no estrato basal, com poucas na camada suprabasal, particularmente na periferia, incluindo o limbo. Em 10 segmentos havia apenas um ou nenhum (em média) núcleo marcado, distribuídos ao acaso no epitélio. Alguns cortes demonstraram a existência de três segmentos consecutivos sem nenhum núcleo marcado, ou seja, uma extensão de 0,75mm. Além do mais, o número máximo de núcleos marcados por segmento raramente atingiu dois. A heterogenidade na distribuição dos núcleos marcados no epitélio da córnea foi também observada no intervalo de 24 horas (Figura 2B), embora a média de núcleos marcados por segmento foi maior do que em 8 horas. Apenas os segmentos da periferia continham quatro núcleos marcados. O alto desvio padrão indica a grande variação da distribuição de núcleos marcados no epitélio.

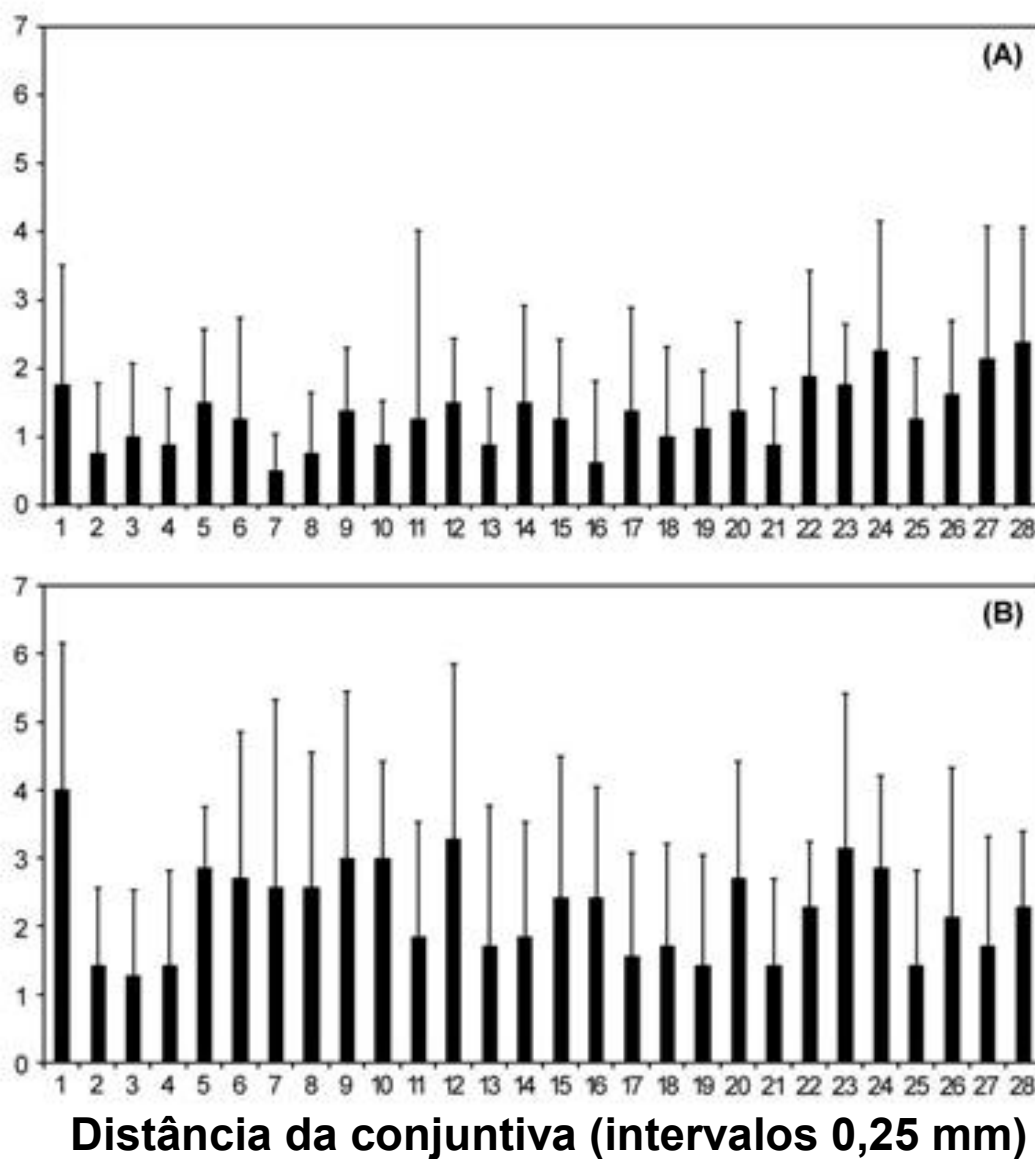


Figura 2: Distribuição dos núcleos marcados em todo o epitélio da córnea em cortes de parafina nos animais não estimulados e sacrificados 8 horas **(A)** 24 horas **(B)** após injeção de $^3\text{H-TdR}$. Contagem iniciada no limbo (primeira coluna a esquerda) e completada no centro da córnea, com intervalos de 0,25mm cada. Dois animais para cada intervalo (N=4 córneas). Cada coluna é a média de núcleos marcados (\pm s.d.m.) por 0,25mm de segmento do epitélio.

4.3. A Raspagem Periférica da Córnea

O epitélio central das córneas manteve as mesmas características morfológicas do epitélio estratificado controle. O estroma da córnea foi exposto por uma extensão variável na periferia, sendo obviamente mais extensivamente exposto nos olhos com intervalo de tempo de 4 horas após raspagem. No intervalo de tempo de 7 horas o epitélio estratificado original adelgaçou-se mais proeminentemente e estendeu-se em direção à periferia (Figura 3). Neste local, e sempre em continuidade com o epitélio estratificado da córnea, uma monocamada de células escamosas ou cubóides baixas foi visualizada espalhando-se lateralmente, alcançando cerca de 2 mm em 24 horas. Neste tempo a interrupção epitelial foi menor que 1 mm. O epitélio neoformado originado da região central foi de 2.7 a 3mm nos cortes de parafina, ao passo que o originado da periferia foi menor que 1 mm e completando a cobertura do estroma em 48 horas na maioria dos olhos cujo epitélio foi raspado. Ainda havia descontinuidade epitelial no intervalo de 36 horas, e com 48 horas, este novo epitélio formado era constituído por duas camadas de células, sendo a camada superficial composta por células muito delgadas (cerca de 4µm de espessura), coradas fortemente por hematoxilina férrica ou PAS positivas.

No intervalo de 12 horas após a raspagem epitelial, células marcadas com ³H-TdR eram muito raras na córnea, inclusive no seu epitélio.

No primeiro dia após a raspagem do epitélio periférico o epitélio neoformado (Figura 4B) apresentava células marcadas principalmente no segmento que surgiu a partir do epitélio central. Queratócitos marcados tornaram-se evidentes a partir do segundo dia e se localizavam na zona de debridamento (Figura 4C).

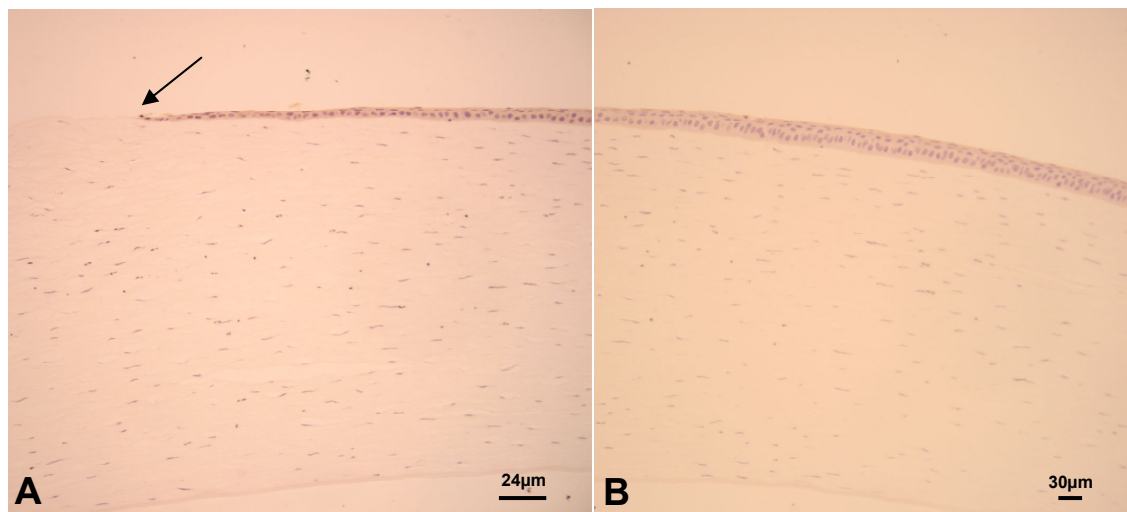


Figura 3: Fotomicrografias de cortes de córneas incluídas em parafina. Os cortes foram submetidos à reação imunohistoquímica indireta usando-se o anticorpo Pan-citoqueratina. A figura é o resultado de duas fotomicrografias montadas, sendo uma a seqüência da outra. **A:** Seta aponta a frente de avanço do epitélio remanescente em direção à área lesada. **B:** Região contígua à área exibida em A, mostrando parte do epitélio não lesado.

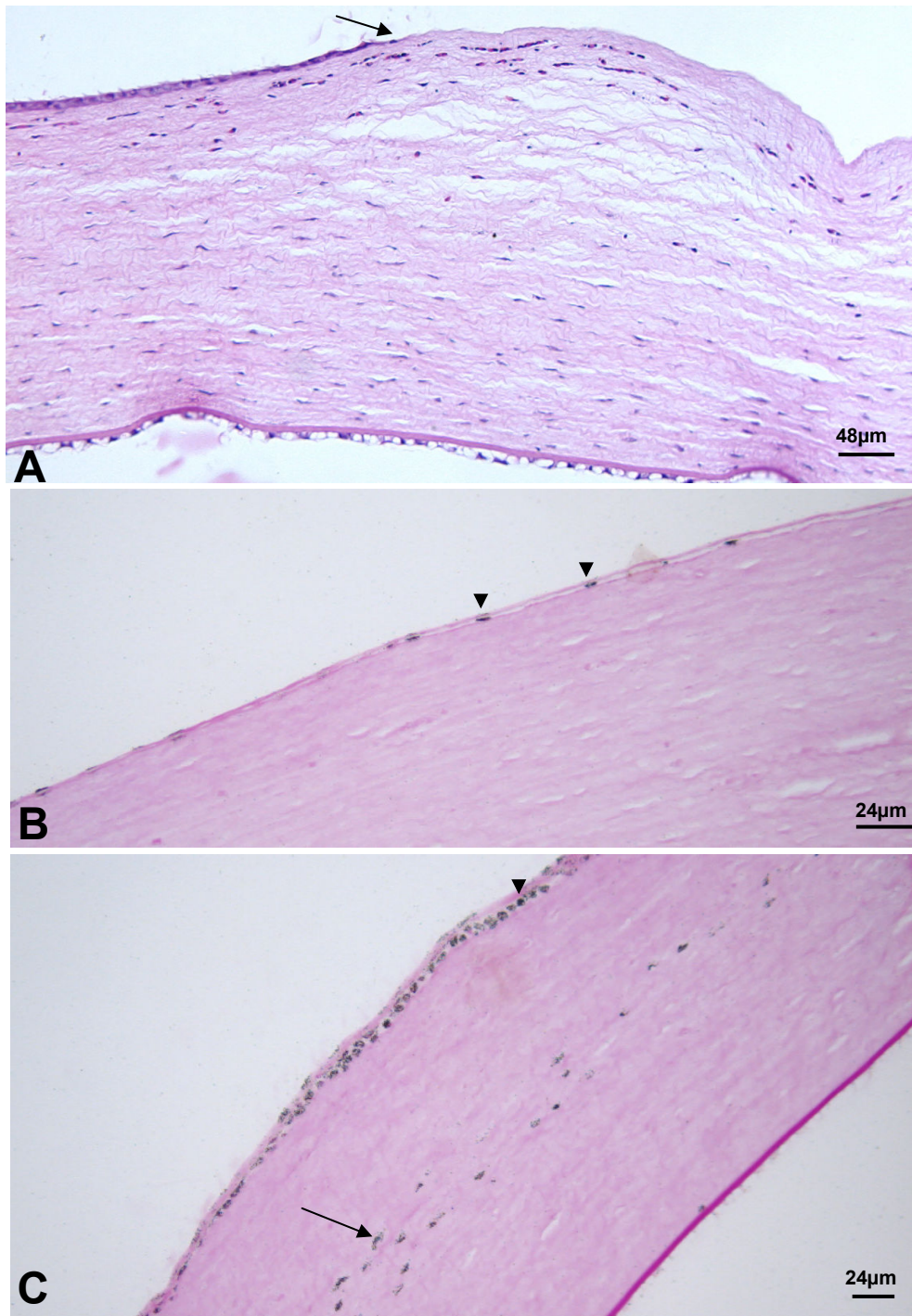


Figura 4: Autogramas de cortes de córneas incluídas em parafina após uma raspagem periférica. Coloração com hematoxilina e eosina após o processamento autorradiográfico. **A:** Animal sacrificado 12 horas após a raspagem. Seta aponta frente de avanço em direção à periferia, não se observando núcleos marcados. **B:** Após 24 horas poucos núcleos marcados no epitélio em monocamada (cabeça de setas) na região intermediária. **C:** No intervalo de 48 horas, o epitélio já totalmente reconstituído e forte marcação na maioria das células epiteliais (cabeça de seta). Notam-se queratócitos marcados na região cujo epitélio foi removido (seta).

4.4. Múltiplas Raspagens Periféricas da Córnea (três raspagens)

A interrupção causada através raspagem do epitélio periférico da córnea, como descrita em métodos, deixou a área do estroma desnudo por uma extensão de aproximadamente 4 mm entre a borda do epitélio central remanescente (intacto) e a região esclerocorneana. As figuras de mitoses foram raras no epitélio neoformado após 1 dia da raspagem. Após 48 horas, todas as córneas estavam cobertas por epitélio.

O epitélio central intacto, apresentando todas as camadas, 1 dia após injeção $^3\text{H-TdR}$, continha raros núcleos marcados. Um segmento de 3 mm, contendo 760 núcleos, visualizados em cortes semifinos, exibiram apenas 1-2 núcleos marcados. Na periferia, onde se originou o epitélio neoformado, o índice de marcação aumentou nas células da camada basal incluindo toda a extensão do epitélio neoformado (Figura 5). O índice de marcação na camada basal foi maior do que 70%. O pré-existente epitélio do limbo, bem como a região periférica do epitélio neoformado foi também altamente marcada. Os dados obtidos no autograma no intervalo de 2 dias foram similares àqueles observados em 1 dia após administração do precursor DNA. No intervalo de 3 dias um grande número de núcleos marcados, particularmente na camada basal, pode ser visualizado no epitélio aparentemente intacto assim como nas proximidades do local do epitélio neoformado atingindo valores próximos 100% (Figura 5D). Nos intervalos de 2 e 3 dias após injeção foram freqüentes as células das camadas suprabasais marcadas em toda extensão do epitélio neoformado. Foi encontrada marcação dos queratócitos em todos os olhos experimentais, particularmente na área do estroma desnudo que foi exposto à raspagem epitelial (Figuras 5B, D).

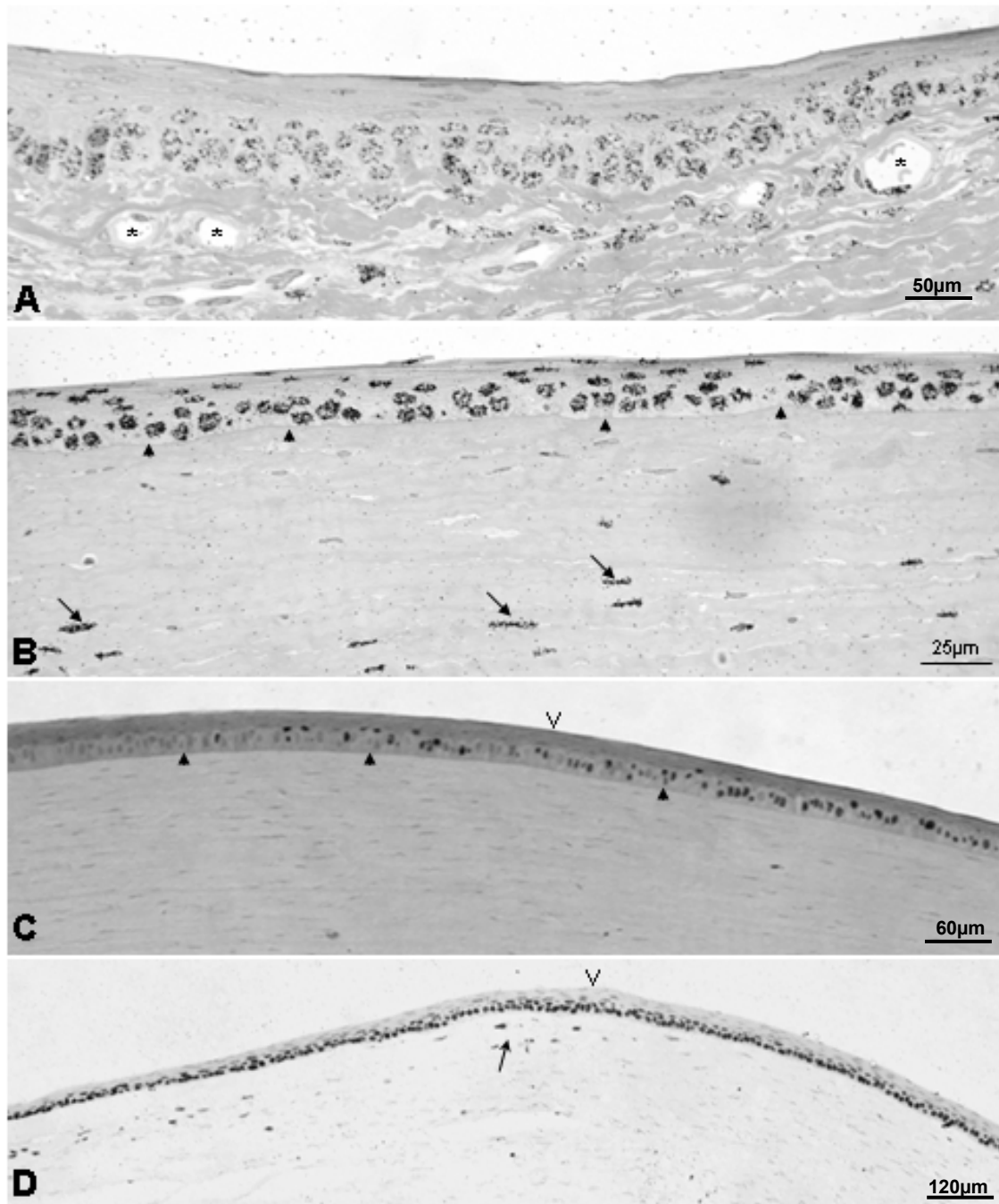


Figura 5: Fotomicrografias de cortes semifinos (A-C) de córneas em vários dias após as três raspagens do epitélio periférico.

- A-** Região do limbo 1 dia após injeção de $^3\text{H-TdR}$. A maioria das células da camada basal encontra-se marcada.
- B-** Região intermediária 2 dias após injeção, praticamente todas as células epiteliais encontram-se marcadas. Nota-se marcação dos queratócitos (seta).
- C-** Aspecto da região central da córnea no intervalo de 1 dia. O epitélio central intacto é observado à esquerda (cabeça de seta aberta), ao passo que a transição e o epitélio neoformado estão à direita. Praticamente todas as células da camada basal do epitélio neoformado encontram-se marcadas. Não há marcação de queratócitos nessa região.
- D-** Corte em parafina da região similar à mostrada em C, 3 dias após injeção. Uma contínua fila de núcleos fortemente marcados é visualizada no estrato basal em toda extensão do corte. Queratócitos marcados são observados a esquerda da cabeça de seta aberta que limita a região do epitélio regenerado.

4.5. A raspagem central da córnea

O epitélio neoformado foi observado recobrando totalmente a área debridada desde o primeiro dia após raspagem (Figura 6A) e era constituído por uma camada basal composta por células cubóides ou colunares baixas exibindo leve coloração. A porção suprabasal continha uma ou duas camadas de células escamosas fortemente coradas. A autorradiografia dos cortes semifinos ilustradas nessa série de experimentos estão agrupadas nas figuras 6-8 e suas respectivas análises quantitativas nas figuras 9 e 10.

O índice de marcação no intervalo de 1 dia foi $5,5 \pm 1,5$ para região do epitélio neoformado e $4,8 \pm 0,6$ para o epitélio da periferia a 0,5 mm - 1 mm do limbo (Figuras 6A,G; 7A; 9). Em geral, as marcações dos núcleos foram dispersas, e mais raramente visualizadas como, por exemplo, na Figura 6A.

Após 2 dias da raspagem, as características morfológicas do epitélio neoformado foram similares aquelas descritas para 1 dia, exceto o estrato superficial que estava mais espesso devido ao aumento do número de camadas de células escamosas (Figura 6B). Neste intervalo alto índice de marcação foi observado no epitélio neoformado: $72 \pm 9,5$ contra $5,1 \pm 1,0$ para o epitélio intacto da periferia da córnea. A maioria dos núcleos marcados foram localizados no estrato basal com muito poucos na camada suprabasal (Figuras 6B, H).

Após 3 dias da raspagem do epitélio central, o epitélio neoformado era composto por quatro camadas, uma basal sendo similar à descrita para o intervalo anterior e o restante, composto por células escamosas. O índice de marcação atingiu 88 ± 9 contra $8,6 \pm 1,6$ para o epitélio periférico da córnea (Figuras 6C, I; 9). Algumas células claras basais do epitélio do limbo estavam

marcadas (Figura 7C). Isso nem sempre foi observado no total de olhos utilizados para esta série de experimentos (Figura 7). Queratócitos marcados foram visualizados no estroma logo abaixo do sítio da raspagem epitelial (Figura 6D-F; 8C).

Com 4 dias o epitélio neoformado exibiu características morfológicas de um normal, incluindo a presença do estrato intermediário. Núcleos marcados foram detectados não apenas no estrato basal, mas também na camada interna do estrato superficial (Figuras 6D,J; 7D; 9). Neste intervalo o índice de marcação foi $71 \pm 4,7$ no centro e $17 \pm 8,8$ na periferia.

Nos intervalos 14 (Figuras 6E,K), 28 (Figuras 6F,L) e 49 dias após raspagem, os índices de marcação foram respectivamente, $99 \pm 0,6$, $91 \pm 2,3$ e $75 \pm 9,3$ para o epitélio central da córnea. A intensidade da marcação do núcleo diminuiu nos intervalos de 28 e 49 dias, e isso tornou mais evidente na periferia da córnea (Figuras 7E; 8 e 9). No olho do animal controle sacrificado no intervalo 49 dias os núcleos exibiram marcação principalmente na região central da córnea em todas as camadas do epitélio, incluindo o estrato basal. A marcação da periferia da córnea e limbo foi extremamente fraca e infrequentes (Figuras 8D-F).

A marcação de todas as camadas epiteliais foi observada apenas no 14º dia. Nos intervalos curtos de tempo (1 e 2 dias), o epitélio remanescente (não raspado) em torno da lesão estava mais fino do que na periferia, embora tendo no mínimo três camadas de células.

O índice de marcação, de 70% ou mais, do epitélio corneano não se restringia à área debridada, de 5 mm na região central, uma vez que nos

intervalos superiores a 2 dias a sua extensão aumentou, atingindo até 8,5 mm nos intervalos mais longo (Figura 10).

A comparação entre o índice de marcação das células epiteliais no limbo do controle e dos olhos raspados revelaram níveis comparáveis de proliferação (Figura 9A), exceto para o intervalo de tempo de 14 dias quando o índice de marcação dos olhos controle foi mais do que o dobro nos olhos experimentais. A alta resolução da autorradiografia mostrou que até nos intervalos de tempo curto após raspagem e injeção $^3\text{H-TdR}$ as células marcadas do limbo estavam preferencialmente localizadas no estrato suprabasal na maioria dos olhos, ambos raspados e controle (Figura 7).

Os dados mostrados na Figura 9B revelam que os índices de marcação na periferia (intacta) do epitélio da córnea operada foram similares ao controle, uma situação completamente diferente quando comparados aos valores observados na região central (Figura 9C) onde o epitélio neoformado era composto por células que exibiam uma alta freqüência de núcleos marcados com $^3\text{H-TdR}$ de 2 a 49 dias, após raspagem.

4.6. Múltiplas Raspagens Centrais da Córnea (três raspagens)

Os resultados dos experimentos foram similares aos obtidos numa simples raspagem dos animais sacrificados 2 dias após injeção $^3\text{H-TdR}$ (Figuras 6B, H; 11). A alta freqüência dos núcleos marcados foi observada no epitélio neoformado (sítio da raspagem), bem como na região ao seu redor, aparentemente intacta. Marcação dos queratócitos foi observada no sítio da raspagem. O limbo exibiu poucos núcleos marcados que estavam predominantemente localizados nas camadas suprabasais; a marcação no epitélio periférico da córnea foi infrequente (Figura 11 A-B).

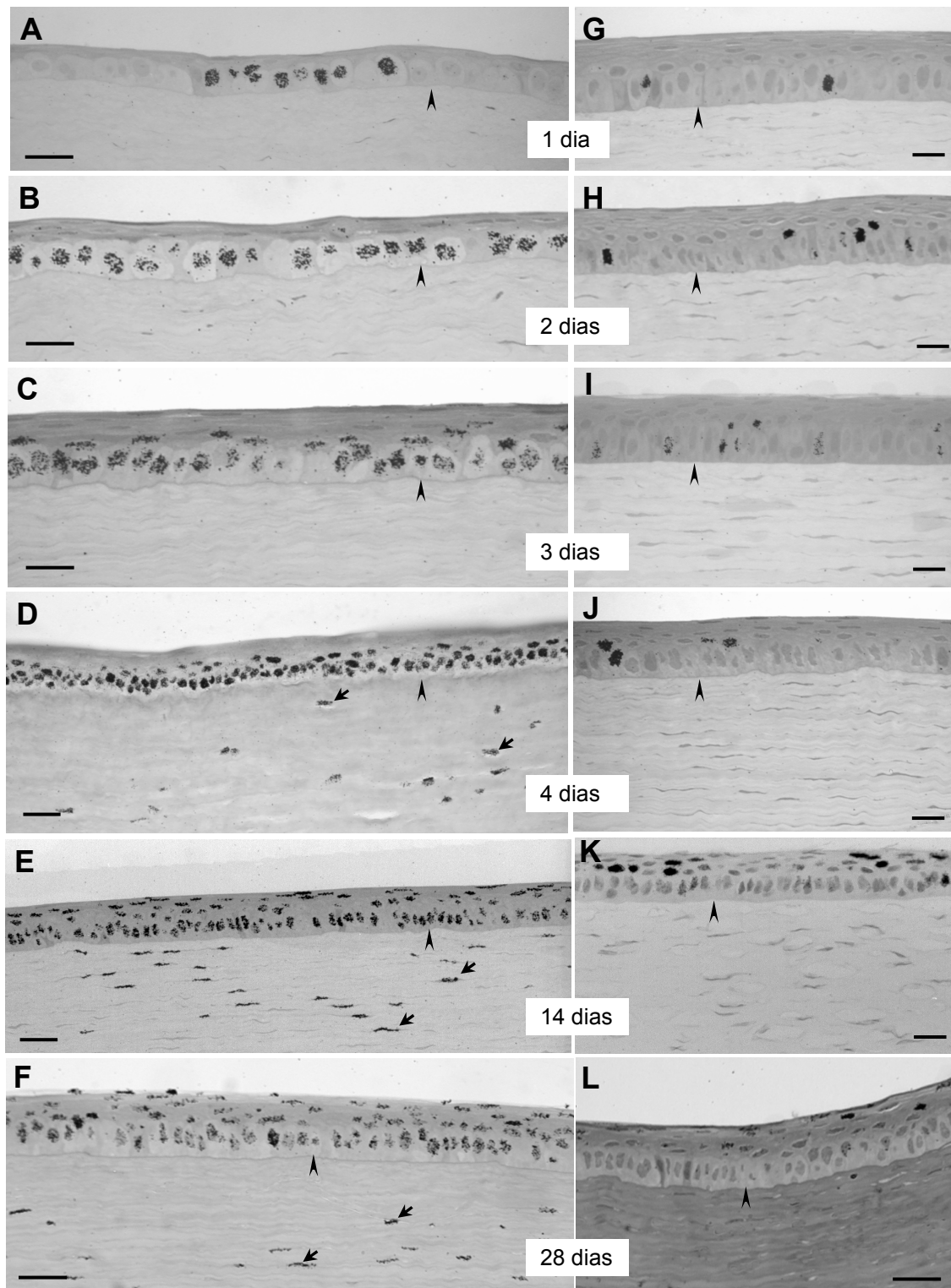


Figura 6: Fotomicrografias de cortes semifinos de córneas em diferentes intervalos de tempo após raspagem de 5 mm da região central e injeção de ^3H -TdR. **Centro** (coluna esquerda) e suas respectivas regiões **periféricas** (coluna direita). Cabeças de seta indicam a membrana basal e setas queratócitos marcados. Grãos de prata por núcleo são numerosos. Note a diferença da marcação no epitélio neoformado central e a região periférica não estimulada. Barra: 20 μm .

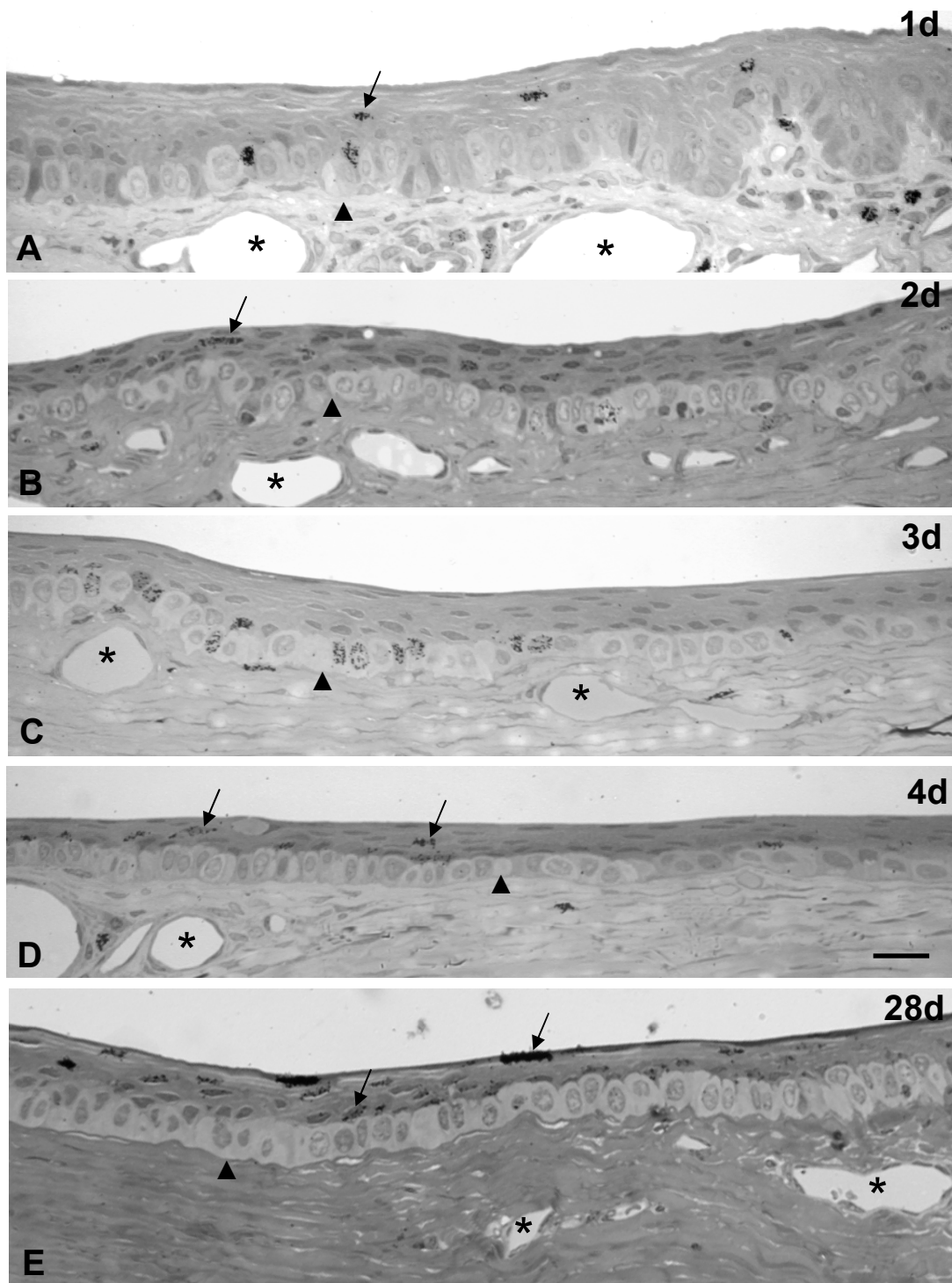


Figura 7: Fotomicrografias de cortes semifinos do limbo após raspagem de 5 mm da região central e injeção de $^3\text{H-TdR}$. O intervalo de tempo entre a raspagem e o sacrifício está indicado no canto direito de cada figura. Apenas o animal sacrificado 3 dias exibiu marcação no estrato basal. A maioria das células marcadas se localiza nas camadas suprabasais de 1 a 28 dias após a raspagem. Cabeças de seta indicam a membrana basal e setas apontam as células epiteliais marcadas. Asteriscos indicam os vasos. Barra: 25 μm .

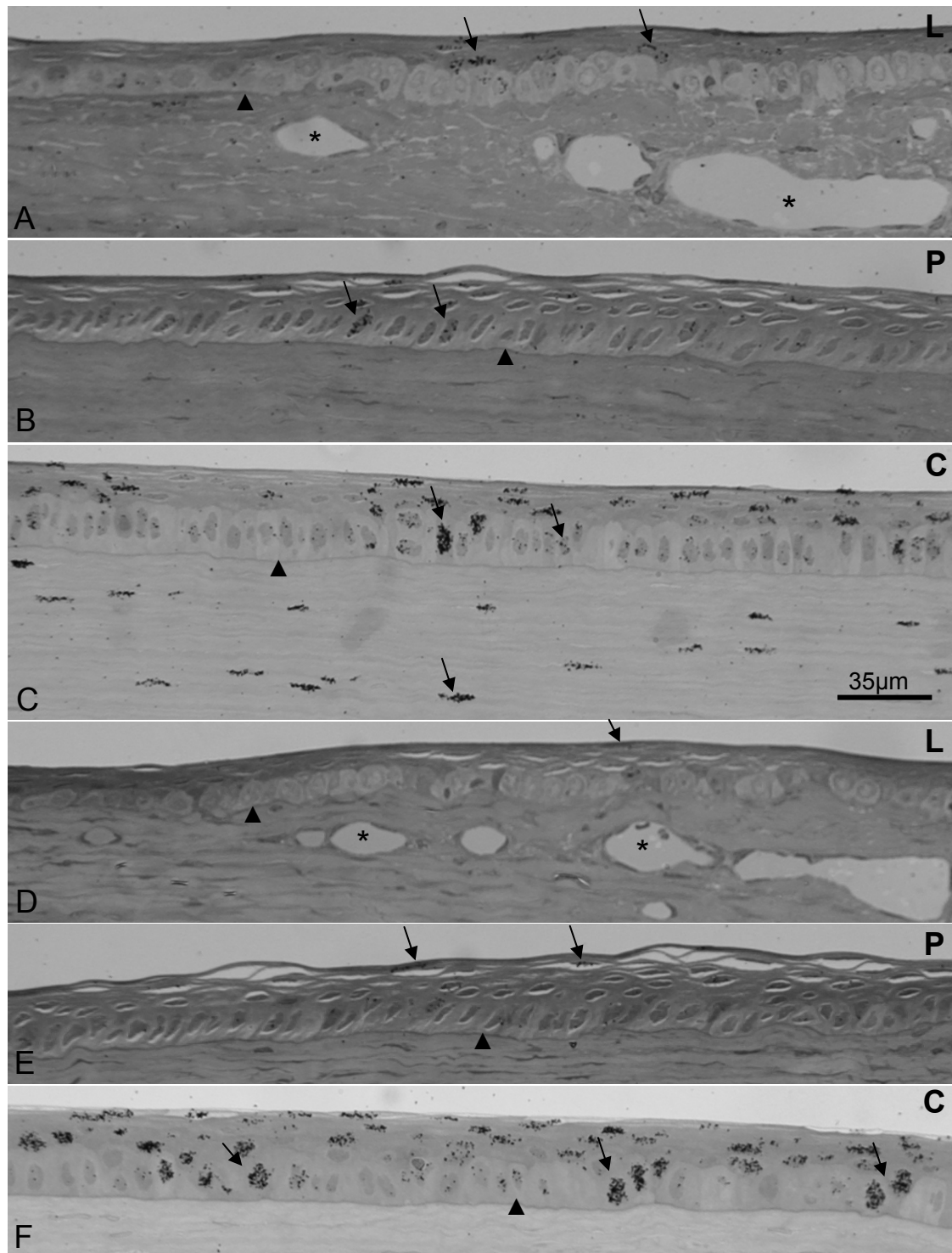


Figura 8: Fotomicrografias de cortes de córneas de animal sacrificado 49 dias após raspagem central do epitélio da córnea e uma única injeção de $^3\text{H-TdR}$ (A-C); olhos controle do mesmo animal (D-F). Fraca marcação dos núcleos foi visualizada no epitélio do limbo assim como na periferia da córnea de ambos os olhos. A marcação dos núcleos foi frequente e conspícua no epitélio central nos olhos experimentais (C) e controles (F). Queratócitos marcados são observados apenas na região central da córnea debridada (C). As letras no canto superior direito de cada figura, indicam as regiões: **L**: limbo; **P**: periferia e **C**: córnea. As setas apontam as células epiteliais marcadas.

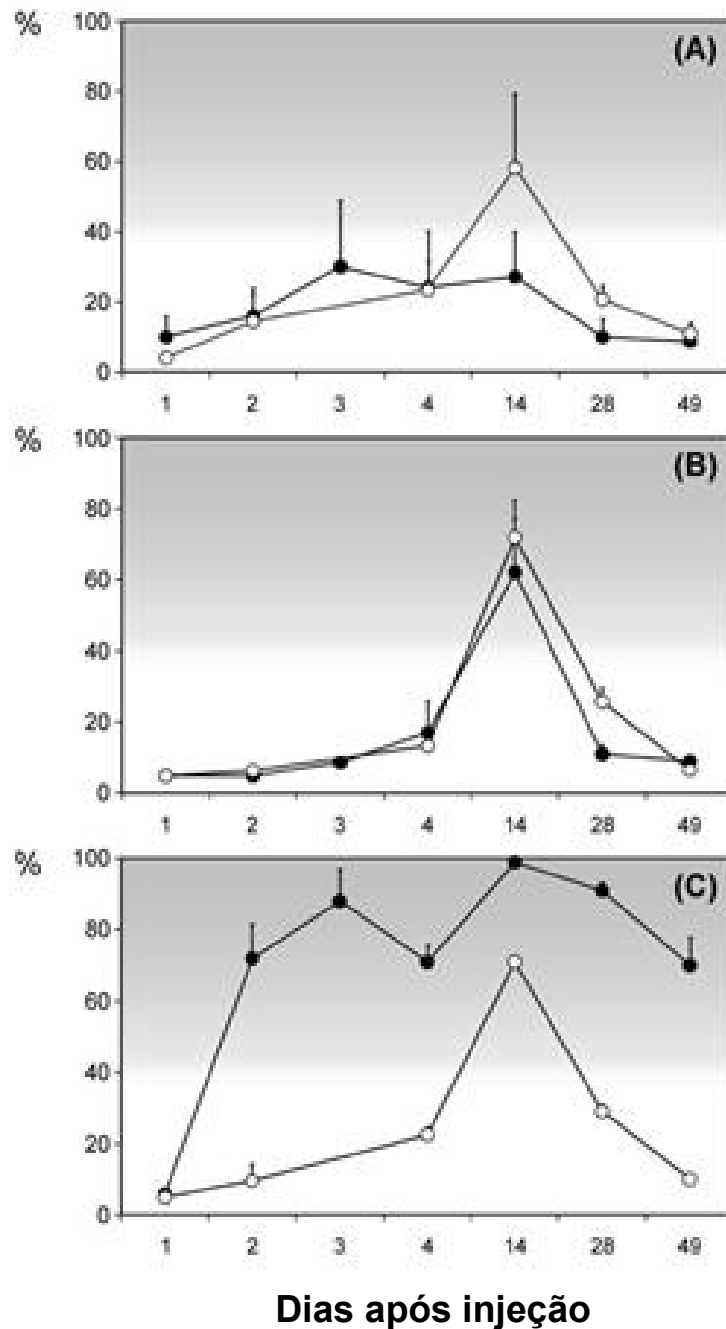


Figura 9: Índices de marcação (\pm desvio padrão da média) das células epiteliais do limbo (A), periferia da córnea 0,5 - 1 mm (B) e córnea central (C) dos animais em diferentes intervalos de tempo após a raspagem central nos olhos direito (•-•) e os respectivos índices dos olhos controle (o-o). Note que os índices de marcação nos olhos experimentais e controles foram similares no limbo exceto no intervalo de tempo de 14 dias no controle (A). Não houve diferenças na periferia da córnea em ambos os grupos (B). O índice de marcação no epitélio neoformado atingiu altos valores entre 2 e 49 dias.

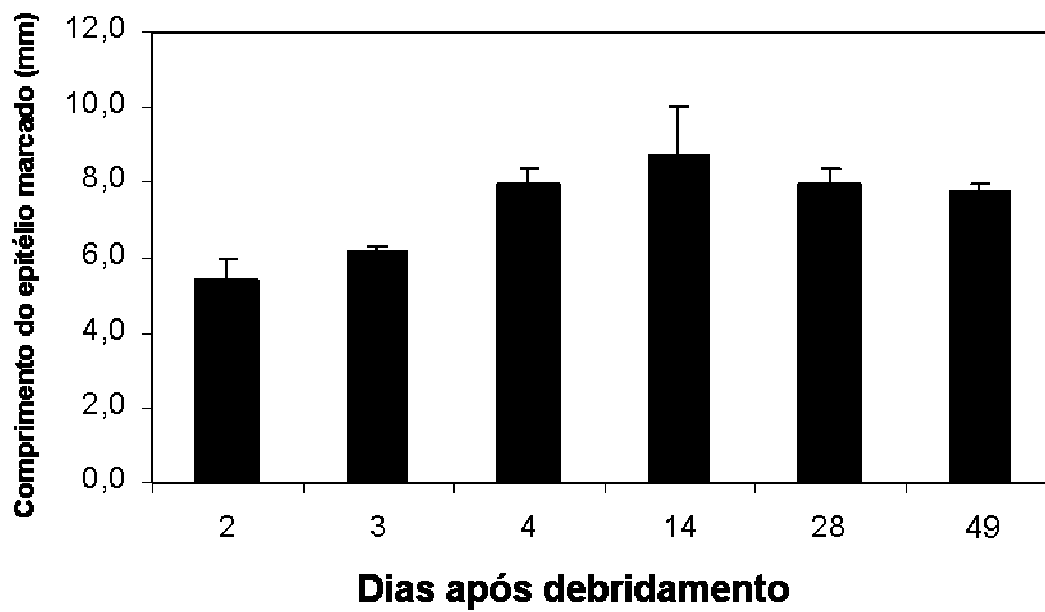


Figura 10: Área do epitélio central exibindo 70% do índice de marcação, nos diferentes intervalos de tempo após raspagem central do epitélio mais a injeção de $^3\text{H-TdR}$. Autorradiografia de cortes de córneas incluídos em parafina.

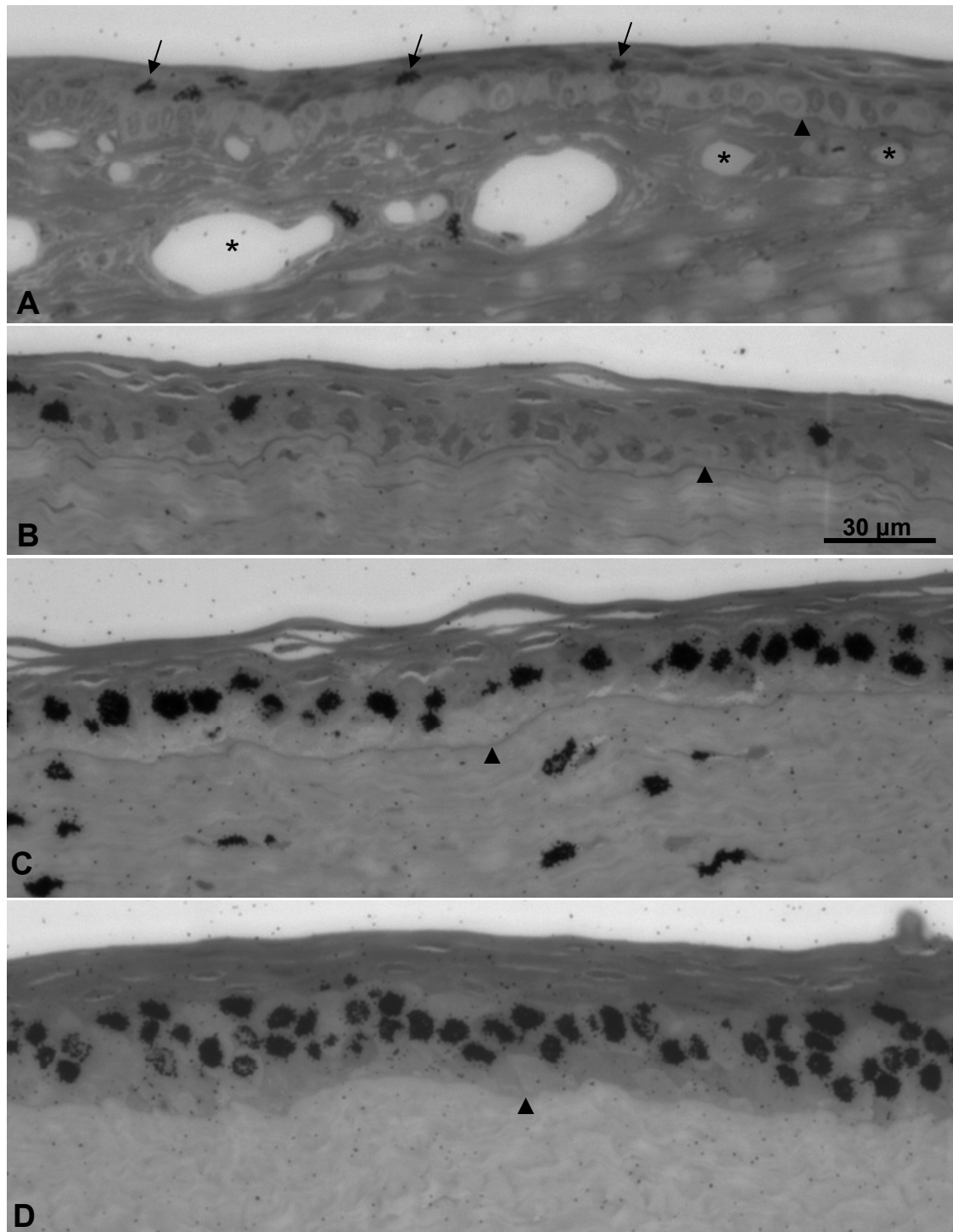


Figura 11: Fotomicrografias de cortes semifinos de córneas após três raspagens na região central e injeção de $^3\text{H-TdR}$ um dia após a terceira raspagem. Sacrificio 1 dia após injeção. **A:** LIMBO - poucas células suprabasais marcadas (setas); **B:** PERIFERIA - três núcleos marcados são visualizados no epitélio; **C:** Área da raspagem exibindo uma contínua fileira de células basais marcadas; note também marcação dos queratócitos. **D:** Corte oblíquo, epitélio da córnea adjacente à borda da área lesada; numerosas células marcadas, predominantemente no estrato basal. Cabeças de seta indicam a membrana basal e setas apontam as células epiteliais marcadas.

5. DISCUSSÃO

Tem sido proposto, usando-se apenas análises morfológicas, que o principal evento envolvido na reparação do epitélio da córnea, durante o primeiro dia, é o deslizamento de células e não sua proliferação (Kuwabara et al., 1976; Hutcheon et al., 2007). Os resultados mostrados nas análises morfológicas e autorradiográficas acrescentam mais evidências para este conceito. Isto também está de acordo com o esperado para a duração do ciclo celular que é de aproximadamente 24 horas (Alberts et al., 2008). Desse modo, seria necessário a proliferação das células do estrato basal, migração e diferenciação das células filhas em escamosas para fechar a interrupção, dentro de 24 horas, com um epitélio estratificado (Figura 6A). Tal evento não pode ser explicado somente pela proliferação celular num período de 24 horas.

É provável que a raspagem funcione como estímulo para que as células epiteliais remanescentes ou outro tipo celular da córnea ou as glândulas lacrimais liberem fatores de crescimento que induzam direta ou indiretamente a replicação celular na córnea (Klenkler et al., 2004).

Os resultados da autorradiografia demonstraram que o alto índice de marcação foi observado a partir de 2 dias apenas no epitélio neoformado e não na periferia e no limbo (Figuras 6-9). Isto significa que a lesão na região central não estimulou o limbo ou epitélio da periferia da córnea a proliferar (Figuras 6 G-L), como proposto para o camundongo, em condições experimentais similares (Cotsarelis et al., 1989; Lehrer et al., 1998; Lavker et al., 2004).

A lesão do epitélio da região central, mesmo em caráter múltiplo, não causou estímulo proliferativo no epitélio de revestimento do limbo ou da

periferia da córnea (Figura 11). Entretanto, o debridamento do epitélio da região periférica, próxima ao limbo, além de estimular com grande intensidade o epitélio central, provocou também proliferação do epitélio do limbo (Figura 5). Em ambos os casos, o deslizamento epitelial inicial, visando ao fechamento da lesão, causou diminuição da sua espessura o que funcionou como estímulo à proliferação. Quando se provocou a lesão central, com 5 mm de diâmetro, o deslizamento epitelial não causou diminuição na periferia da córnea, já que o evento foi observado principalmente no epitélio em torno do debridamento (Figura 6).

Nos intervalos mais longos onde se observou persistência da marcação epitelial, até 7 semanas após a lesão, houve expansão centrífuga da região contendo altos índices de marcação (Figura 10), demonstrando-se o papel quase solitário do epitélio central na regeneração do epitélio corneano, sem qualquer evidência morfológica ou autorradiográfica da participação do limbo (Figuras 6 e 7).

Nos trabalhos realizados com a córnea de camundongos a destruição do epitélio central foi feita com produto químico (álcool), associada ou não com lesão mecânica (revisto em Majo et al., 2008). Considerando as reduzidas dimensões da córnea do camundongo (cerca de 4,5 mm de arco), o tamanho da área nominalmente lesada (1 mm) e a difusibilidade do álcool, é bem provável que a lesão epitelial tenha ultrapassado o limite planejado de 1 mm e que tenha atingido as cercanias do limbo. Assim, ocorreu um estímulo do epitélio límbico e periférico corneano para o reparo da lesão. Tal situação foi também verificada na córnea de coelhos, quando se realizou o debridamento periférico que atingiu os limites do limbo (Figuras 4 e 5). Entretanto, os mesmos

experimentos indicaram a importante função do epitélio central na regeneração epitelial, conforme observado nos intervalos mais curtos (12-36 horas), quando se verificou que o epitélio central contribuiu com cerca de 75% para o fechamento da ferida.

Outro ponto a ser considerado são as características morfológicas do limbo do coelho, quando comparadas às do humano ou do camundongo (Figura 1). A heterogeneidade do limbo do coelho ficou claramente demonstrada pelo minucioso estudo morfológico empreendido com os microscópios de luz e eletrônico (Góes et al., 2008), em amostras sistematicamente colhidas de olhos de coelhos (Figura 1). Na imensa maioria dos trabalhos realizados com olhos humanos e de camundongo nenhuma indicação existe sobre o local exato da colheita das amostras, tal como a sua localização por quadrante, por exemplo, (Dilorio et al., 2005; DePaiva et al., 2006; Majo et al., 2008). Além disso, as amostras de limbo obtidas de coelhos, medindo cerca de 2 mm de largura (Espana et al., 2003; Wang et al., 2003) podem conter tecido de três regiões: córnea periférica, limbo e conjuntiva, uma vez que o limbo do coelho não ultrapassa 0,6 mm em extensão (Góes et al., 2008).

Em condições fisiológicas, foi observada marcação das células do estrato basal do epitélio do limbo (local das possíveis células tronco) em tempos relativamente curtos (6horas-2 dias), após uma única injeção intravítrea de ³H-timidina (Góes et al., 2008). Além disso, observou-se que células dos estratos suprabasais também se apresentavam marcadas, indicando que as células basais, após a mitose, podem migrar rapidamente para as camadas suprabasais. No intervalo de 28 dias após injeção, a marcação no limbo era praticamente inexistente no estrato basal, permanecendo apenas nos

suprabasais, enquanto que na córnea a marcação nuclear ocorria em todas as camadas, havendo cerca de 20% de marcação no estrato basal (Góes et al., 2008). Esses dados se opõem aos conceitos correntes de que o estrato basal do limbo é a “residência” de células de ciclo lento, assim como de células que retêm a marcação nuclear adquirida em ciclo celular anterior, ambas situações consideradas características fundamentais de células tronco (revisão Schlötzer-Schrehardt e Kruse 2005). Essas seriam as células que adquiririam estímulo para proliferação, após lesão no epitélio central (revisão em Lavker et al., 2004), na córnea de camundongos. Entretanto, tal não ocorreu no coelho (Figuras 6 e 7). Além disso, a autorradiografia de alta resolução (Salpeter et al., 1974) em cortes semifinos de limbo conduziu a resultados que indicaram as células basais do limbo desprovidas das características das células tronco.

A marcação do epitélio corneano, em condições fisiológicas, 8 horas e 24 horas após uma única injeção de ^3H -TdR, está resumida na figura 2. Se ausência de marcação nuclear, nesses intervalos, indica a existência de ciclo lento, tal evento foi observado em todas as regiões da córnea de coelhos. Portanto, não existe na córnea uma região preferencial que abrigue células epiteliais de ciclo lento.

As células que retiveram marcação nuclear por períodos longos, ou seja, até 7 semanas após uma única injeção intravítrea do marcador radioativo, foram observadas nos estratos suprabasais do limbo e em todos os estratos do epitélio corneano, incluindo-se o basal. Atualmente, retenção de marcação vem sendo considerada como a mais fidedigna característica das células tronco (revisão Schlötzer-Schrehardt e Kruse 2005). Assim, se tal característica é a “marca” das células tronco, estas existiram em toda a extensão da córnea e

não no limbo, partindo-se da premissa de que a sua localização no estrato basal seja igualmente importante na sua caracterização (Figuras 8 D-F; 9).

Os resultados também demonstraram a capacidade do epitélio da região central na manutenção e regeneração do epitélio da córnea. Assim, as lesões centrais de até 5 mm foram reparadas com a participação exclusiva do epitélio que existia em torno da ferida, conforme já discutido anteriormente (Figuras 6-11). Mais importante foram os experimentos em que ocorreu a eliminação mecânica do epitélio da região periférica uma (Figuras 3 e 4) e mais vezes (Figura 5). Quando o fechamento (re-epitelização) da superfície do estroma ainda estava incompleto (36 horas), foi possível medir a extensão do epitélio originado das regiões central e periférica, tendo-se observado que a região central contribuiu com cerca de 75% da área recoberta. Tal achado morfológico foi corroborado pelos resultados da autorradiografia que demonstraram frequente marcação nuclear no epitélio neo-formado (Figura 5B), a partir da região em que o epitélio original começou a adelgaçar-se (Figura 5C). O estímulo para a proliferação celular continuou nos intervalos mais longos após o debridamento, quando se observou marcação nuclear praticamente total no estrato basal tanto do epitélio neo-formado como no epitélio original (Figura 5 D). O debridamento periférico, por atingir a região do limbo, também causou estímulo para a proliferação do seu epitélio (Figura 5A), tendo os dados morfológicos indicado a sua contribuição em cerca de 25% para a re-epitelização.

Os experimentos em que ocorreram múltiplos debridamentos periféricos na mesma córnea também demonstraram que o epitélio central não se esgotou na sua capacidade de proliferação. Além disso, os experimentos em que os

debridamentos múltiplos ocorreram na região central (Figura 11) já indicavam tal possibilidade.

Em conjunto, os resultados da presente investigação levantam dúvidas sobre a questão da localização de células tronco epiteliais exclusivamente no limbo, conceito altamente difundido na literatura oftalmológica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

1. O debridamento único ou múltiplo de área central, de 5 mm de diâmetro, causada por eliminação mecânica do epitélio, foi reparado com a participação exclusiva do epitélio que existia em torno da ferida.
2. O debridamento periférico, por atingir a região do limbo, também causou estímulo para a proliferação do seu epitélio, tendo os dados morfológicos indicado a sua contribuição em cerca de 25% para a re-epitelização. Entretanto, a maior participação no reparo epitelial decorreu da proliferação de células da região central.
3. As múltiplas raspagens periféricas na mesma córnea também demonstraram que o epitélio central não se esgotou na sua capacidade de proliferação.
4. A presente investigação levanta dúvidas sobre a questão da localização de células tronco epiteliais exclusivamente no limbo, conceito altamente difundido na literatura oftalmológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). The cell cycle. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition Garland Science, New York, NY, pp.1053-1114.

Beebe DC, Masters BR (1996). Cell lineage and the differentiation of corneal epithelium cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1815-1825.

Bron AJ, Tripathi RC, Tripathi BJ (1997). *Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit*, 8th ed., Chapman & Hall Medical. London.

Bron, AJ and Seal DV (1986). The defences of ocular surface. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105: 18.

Busacca A (1952). Region Limbique. In: *Biomicroscopie et Histopathologie de L'oeil*. Généraliés, Conjonctive, Cornée. Zurich, Schweizer Druck-und Verlagshaus S.A. 1: 186 -193.

Cope C, Dilley PN, Kaura R (1986). Wettability of the corneal surface: a reappraisal. *Curr Eye Res* 5: issue 10, 777-785.

Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57:201-209.

Daniels JT, Dart JKG, Tuft SJ, Khaw PT (2001). Corneal stem cells in review. *Wound Rep Reg* 9: 483-494.

DePaiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ (2006). Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem cells* 24: 368-375.

Dilorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, DeLuca M (2005). Isoforms of Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9523-9528.

Dilly PN (1985). Contribution of epithelium to the stability of the tear film. *Trans Ophthalmol Soc UK* 104: 381.

Espana EM, Kawakita T, Romano A, DiPasquale M, Smiddy R, Liu C, Tseng SCG (2003). Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 5130-5135.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983). Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 31:13-20.

Gipson IK, Westcott MJ, Brooksby NG (1982). Effects of cytochalasins B and D and colchicine on the migration of corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 633-642.

Góes RM, Barbosa FL, Faria-e-Sousa SJ, Haddad A (2008). Morphological and autoradiographic studies on the corneal and limbal epithelium of rabbits. *Anat Rec* 291:191-203.

Haddad A (2000). Renewal of the rabbit corneal epithelium as investigated by autoradiography after intravitreal injection of ³H-thymidine. *Cornea* 19:378-383.

Haskjold E, Bjerknes R, Bjerknes E (1989). Migration of cells in the rat corneal epithelium. *Acta Ophthalmologica* 67:91-96.

Hutcheon AEK, Sippel KC, Zieske JD (2007). Examination of the regeneration of epithelial barrier function following superficial keratectomy. *Exp Eye Res* 84: 32-38.

Klenkler B, Sheardown H (2004). Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 79: 677-688.

Kopriwa BM, Leblond CP (1962). Improvements in the coating technique for radioautography. *J2 Histochem Cytochem* 10:269-284.

Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC (1990). Expression of 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 448-456.

Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG (1976). Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15:4-14.

Lanza R (2006). Essentials of Stem Cells Biology. *Elsevier* 581.

Lavker RM, Tseng SCG, Sun TT (2004). Corneal epithelial stem cell at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res*. 78: 433-446.

- Leblond CP (1965). The time dimension in histology. *Am J Anat.* 116: 1-28.
- Leblond CP, Inoue S (1989). Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185: 367-390.
- Leblond CP (1991). Time dimension in cell biology: a radioautographic survey of dynamic features of cells, cell components, and extracellular matrix. *Protoplasma* 160: 5-38.
- Lehrer MS, Sun T-T, Lavker, RM (1998). Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 111: 2867-2875.
- Li DQ, Tseng SC (1995). Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 163: 61-79.
- Liotet S, Van Bijsterveld OP, Kogbe O (1987). A new hypothesis of tear film stability. *Ophthalmologica* 195: 119.
- Majo F, Rochat A, Nicolas M, Georges AJ, Barrandon Y (2008). Oligopotent Stem Cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 456: 250-255.
- Matic M, Petrov IN, Chen S, Wang C, Dimitrijevic SD, Wolosin JM (1997). Stem cells of corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity. *Differentiation* 61: 251-260.

Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT (2003). Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research* 76:521-542.

Nelson JD, Havener VR, Cameron JD (1983). Cellulose acetate impressions of the ocular surface: dry eye state. *Ach Ophthalmol*, 101:1869 -1872.

Pfister RR (1975). The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14: 648-661.

Rogers AW (1979). Techniques of Autoradiography. 2nd edition, Elsevier, Amsterdam.

Salpeter MM, Budd GG, Mattimoe S (1974). Resolution in autoradiography using semithin sections. *J Histochem Cytochem* 22: 217-222.

Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81: 247-264.

Schantz A, Schechter A (1965). Iron-hematoxilin and safranin O as a polichrome stain for epon sections. *Stain Technology* 40:279-282.

Schermer A, Galvin S, Sun TT (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggest limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*, 103:49-62.

Schofield R (1983). The stem cell system. *Biomed Pharmacother* 37:375-380.

Szereneyi K, Wang XW, Gabrielian K, LaBree L, McDonnell PJ (1994). Immunohistochemistry with 5-bromo-2-deoxyuridine for visualization of mitotic cells in the corneal epithelium. *Cornea* 13:487-492.

Thoft RA, Friend J (1977). Biochemical transformation of regenerating surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 14-20.

Thoft RA, Friend J (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance (letter). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1442-1443.

Tseng SCG, Jarvinen J J, Nelson WG (1982). Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell*, 30: 361-372.

Tseng SCG (1989). Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 3:141-57.

Tseng SCG, Tsubota K (1997). Important concepts for treating ocular surface and tears disorders. *Am J Ophthalmol*, 124: 825-835.

Wang D-Y, Hsueh Y- J, Yang VC, Chen JK (2003). Propagation and phenotype preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4698-4704.

Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA (1992) Characterization of a potential marker for corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:143-152.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)