

Marcele Cristina Caetano

**EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS
NUCLEARES DE CÉLULAS EM
PROLIFERAÇÃO NA
SUPERFÍCIE OCULAR DE
CÃES JOVENS E ADULTOS.**

MARCELE CRISTINA CAETANO

**Expressão dos antígenos nucleares de células em
proliferação na superfície ocular de cães jovens e
adultos.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia – Curso de Medicina Veterinária para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Clínica e Cirúrgica)

Orientador: Prof. Ass. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Araçatuba

2006

DADOS CURRICULARES

DADOS CURRICULARES

Marcele Cristina Caetano

NASCIMENTO 23.02.1976 – Araçatuba/SP

FILIAÇÃO Claudemir Caetano
Luci Lamar Guermandi Caetano

1995/1999 Curso de Graduação (Medicina Veterinária)
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia
Curso de Medicina Veterinária

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luci e Claudemir e ao meu esposo Fernando,

Dedico este trabalho, pois sempre acreditaram em minha capacidade e ajudaram-me desde o início a alcançar mais esta vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Ao **Prof. Ass. Dr. Alexandre Lima de Andrade**, que com sua paciência e senso crítico deu formas definitivas à esse projeto, meu agradecimento pela orientação e amizade, pontos comuns que trilharam essa jornada.

À **Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizzoto**, pelos ensinamentos, orientação e apoio constante, um agradecimento sincero.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Animal, UNESP-Araçatuba, pela ajuda e paciência em todos os momentos.

À **Profa. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim**, por ter ajudado no momento decisivo deste trabalho, sem o qual esse projeto não se completaria, meu agradecimento especial.

À **Profa. Ass. Dra. Silvia Helena Venturolli Perri**, pela orientação e organização na análise estatística.

Aos colegas de pós-graduação, pela amizade, apoio e companheirismo.

À Capes pelo apoio financeiro.

À todas as bibliotecárias do campus da Medicina Veterinária, pela ajuda nas referências bibliográficas.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia; pois, o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia da córnea de cão

Figura 2 - Fotografia do corte sagital do bulbo ocular

Figura 3 - Processamento dos cortes histológicos

Figura 4 - Representação esquemática do corte sagital de olho

Figura 5 - Representação gráfica da porcentagem de células imunomarcadas

Figura 6 - Fotomicrografia da região da córnea, limbo e conjuntiva de olhos de cães dos grupos GA e GB

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e erro padrão da média da porcentagem de células imunomarcadas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Lista de Abreviaturas e Símbolos

K5/K14 = par de queratinas basais ou tipo B

K3/K12 = par de queratinas corneais

K6/K16 = par de queratinas hiperproliferativas ou tipo H

AE5 = anticorpo monoclonal anti-queratina 3

AE1 = anticorpo monoclonal anti-queratina 1

X, Y e Z = teoria da regeneração epitelial de THOFT & FRIEND

X representa a proliferação das células epiteliais basais

Y é a proliferação e migração centrípeta das células epiteliais limbares

Z representa a perda celular epitelial

Ki-67 = antígeno de proliferação Ki-67

DNA = ácido desoxiribonucléico

S = fase da mitose com pico de síntese de DNA

GA = grupo A

GB= grupo B

PCNA = antígeno nuclear de proliferação celular

MIB-1 = anticorpo monoclonal anti-Ki-67

H.E = Hematoxilina e eosina

% = por cento

V = volume

°C = graus Celsius

mL = mililitro

μl = microlitro

SAS = statistical analysis system

pH = potencial de hidrogênio iônico

DAB = diaminobenzidina

mM = milimol

SUMÁRIO

Introdução	24
Revisão de literatura	27
Objetivos	40
Material e métodos.....	42
Resultados	50
Discussão.....	55
Conclusão	60
Referências.....	62
Trabalho	68
Anexos	93

RESUMO

As células-tronco (*stem cells*) têm um papel fundamental nos processos reparativos e regenerativos da córnea. A exata localização destas é bem conhecida no olho do homem, bem como as suas funções. Entretanto, as mesmas ainda não foram descritas em medicina veterinária, sequer a sua localização em olhos de animais de companhia, tratando-se assim, de assunto que merece novas e originais investigações. Anticorpos monoclonais que reagem superficialmente com as citoqueratinas são empregados para determinar este tipo celular presente nos tecidos, no entanto, existem outros marcadores capazes de reagir antigenicamente com núcleos celulares. Entre eles, o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e o Ki-67 (antígeno de proliferação Ki-67) são capazes de marcar células em proliferação. Uma vez que isso nunca fora descrito anteriormente, e considerando-se a necessidade e importância científica em se determinar a localização de células em proliferação na superfície ocular de cães, o presente estudo teve por objetivos: 1) determinar a expressão de células em proliferação pela marcação imunoistoquímica com anticorpos monoclonais anti-PCNA e anti-MIB-1 (anticorpo monoclonal anti-Ki-67), bem como, sua localização na superfície ocular; 2) comparar se há diferença estatística significativa na marcação dessas células em diferentes idades. Para tanto, foram utilizados 24 cães jovens e adultos, sadios, dos quais o bulbo ocular

esquerdo foi removido, fixado e corado pela H.E. (hematoxilina e eosina), além da imunistoquímica empregando-se os anticorpos monoclonais anti-PCNA e anti-MIB-1. Concluiu-se que a presença de células em proliferação imunomarcadas pelo PCNA e pelo MIB-1 foi observada em diferentes tecidos da superfície ocular de cães, sendo os tecidos mais marcados: o limbo e o epitélio da córnea. É possível que, as células marcadas pelos imunomarcadores sejam células-tronco da superfície ocular de cães, no entanto, para tal comprovação sugere-se a necessidade da utilização de anticorpos monoclonais espécie-específicos como o AE5.

Palavras-chave: córnea, PCNA, MIB-1, células-tronco

ABSTRACT

The stem-cells has a fundamental paper in process of cornea's tissue repair and regeneration. In man, the well-know localization and functions had been descriebed a long time ago, however the same ones had not yet been descriebed in veterinary medicine, at least your localization in eyes of company animals, what deserve new and original inquiries. Monoclonais antibodies that react superficially with the cytokeratins are used to determine this cell type presence in ocular surface. However, exist another markers capable to react with cell nucleoli, for example, PCNA and MIB-1 are capable to mark proliferation cells. Considering the necessity and scientific importance to determining the localization of proliferation cells on dog's ocular surface, a time that, never was descriebed previously, the present study had for objectives: 1) determineted the expression of proliferation cells immunohistochemically by PCNA and MIB-1 and its localization in ocular surface; 2) compare if has statistically significant difference in immunoexpression of proliferation cells in different ages. In the study was used 24 healthy dogs, young and adults, witch had the left eyes removed, fixed in buffered formalin and stained with H.E. (hematoxilin and eosin) and with monoclonal antibodies anti-PCNA and anti-MIB-1. The presence of immunostained cells was most observed in corneal epithelium and limbo. Probably the immunostained cells are stem-cells in dog's ocular surface, however for

such evidence it is necessary the use of monoclonais antibodies specie-specific as AE5, not yet avaiable to dogs.

Key-words: cornea, PCNA, MIB-1, stem-cells

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Das estruturas que compõem o aparelho da visão, não há como ressaltar a importância de uma estrutura isoladamente, um detrimento das demais. Todas, em sua função e conjuntamente, colaboram para uma boa e perfeita visão. O tempo, a evolução e os avanços médicos têm demonstrado que cada componente desse sistema participa efetivamente do mecanismo de formação da imagem, permitindo assim, que o organismo perceba o meio *externo* através da visão.

A córnea, que representa uma das estruturas da túnica fibrosa do bulbo ocular, constitui-se em um tecido vulnerável, dada a sua localização externa. Por ser transparente, está diretamente envolvida na visão e tem sido estudada intensamente no homem e nos animais nos últimos tempos, devido ao crescente número de doenças corneais, algumas ainda, de etiologias e tratamentos desconhecidos.

No entanto, sabe-se do papel fundamental das células-tronco (*stem cells*) no processo regenerativo corneal. A literatura humana descreve a exata localização, bem como as funções dessas células. Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado a capacidade de diferenciação dessas células em um tipo celular requerido em diversos distúrbios da superfície *ocular*. Entretanto, o mesmo ainda não ocorreu na medicina veterinária, sequer a localização das células-tronco em olhos de animais de companhia foi descrito, tratando assim, de assunto que merece novas

e originais investigações.

A localização das células tronco no tecido corneal do homem pode ser influenciada pela idade, mas poucos trabalhos científicos foram realizados objetivando esse aspecto. É provável que o mesmo ocorra em animais. Elas se constituem em células germinativas, imaturas, com função de promover a reposição da massa celular de um determinado tecido. Essas células são requeridas como um último recurso no caso de regenerações. Na maioria das vezes, estão concentradas na região do fórnice conjuntival (Meller *et al.*, 2001), e apresentam um comportamento cíclico em relação à renovação do epitélio e atividade de células do sistema imune, que estão sob constante *turnover*.

Sendo assim, considerando-se a necessidade e importância científica em se determinar a localização de células em proliferação da superfície ocular de cães, o presente estudo teve por objetivos: 1) determinar a expressão de células em proliferação pela marcação imunoistoquímica por anticorpos monoclonais anti-PCNA e anti-MIB-1, bem como, sua localização na superfície ocular; 2) comparar se há diferença estatística significativa na marcação dessas células em diferentes idades.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Córnea*

A córnea é uma estrutura anesférica e transparente que, juntamente com a esclera, compõe a túnica fibrosa do olho. A região de transição entre essas duas estruturas chama-se limbo esclerocorneal, que é um pouco mais largo nas porções inferior e superior. Naturalmente não pigmentada e avascular, desempenha as funções de manutenção da forma do olho, além da convergência dos raios luminosos nela incidentes (Andrade, 2002; Brunelli, 2004). No cão, a córnea é formada por quatro camadas distinguíveis, da mais externa para a mais interna: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Andrade, 2002) e compõe um quinto da túnica fibrosa do olho (Brunelli, 2004) (Figura 1).

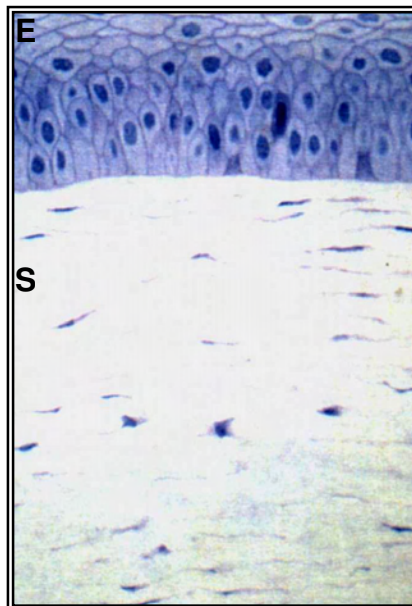


Figura 1. Fotomicrografia de 2 duas camadas da córnea do cão: E: epitélio; S: estroma (Andrade, 2002).

2.2 Superfície Ocular

A superfície ocular é composta pelos epitélios da córnea, limbo e conjuntiva. Os três epitélios apresentam características comuns, porém diferenciam-se tanto fenotipicamente quanto funcionalmente. São do tipo pavimentoso, estratificado não-queratinizado e repousam sobre uma membrana basal composta basicamente de colágeno tipo I e IV e proteínas da matriz extracelular. Anteriormente, encontram-se revestidos pelo filme lacrimal, com que tem relação metabólica íntima e fundamental (Gomes *et al.*, 2000). Além disso, os epitélios corneal e escleral podem ser distinguidos pela expressão de diferentes tipos de queratina, mucinas

e glicocálice. (Meller *et al.*, 2002).

Vários trabalhos clínicos e experimentais têm fornecido evidências sobre a importante relação funcional desses epitélios com a manutenção das funções básicas da superfície ocular:

1) formar uma barreira de proteção à perda líquida e evitar a entrada de patógenos;

2) pela sua interação com o filme lacrimal, compor uma superfície lisa e regular;

3) possuir mecanismos cicatriciais altamente desenvolvidos, para responder de maneira rápida e eficaz às agressões físicas externas (Gomes, 2000).

O epitélio da superfície ocular, além de ser constantemente protegido por um filme lacrimal estável, também participa ativamente na formação da estabilidade desse filme. Isso é garantido pela liberação de gel formador de mucina pelas células conjuntivais caliciformes, o qual é um dos importantes componentes do filme lacrimal. Além disso, ambas as células epiteliais corneais e as conjuntivais não caliciformes apresentam mucina em suas superfícies, o que as mantém umidificadas (Andrade, 2002).

2.2.1 Epitélio da córnea

As células basais da córnea são metabolicamente mais ativas e

possuem maior número de mitocôndrias do que as células superficiais. As células epiteliais localizadas mais superficialmente possuem microplicatas e microvilosidades revestidas por glicocálice, que se encontra intimamente relacionado com a parte de mucina do menisco lacrimal. Os nutrientes para a córnea provêm de três fontes principais: o filme lacrimal, que fornece a maior parte do oxigênio, os vasos sangüíneos limbares e o humor aquoso, que fornecem glicose e aminoácidos. A membrana basal do epitélio da córnea é sintetizada pelas células basais epiteliais. Possui várias funções, como auxiliar a migração e adesão do epitélio corneal, manter a arquitetura do tecido e atuar como membrana semi-permeável à passagem de substâncias produzidas pelo epitélio e pelos ceratócitos. Sua composição é basicamente de colágeno do tipo I mas também há na córnea do adulto, laminina, heparina e, em menores quantidades, de fibronectina e fibrina. O citoesqueleto das células epiteliais é composto basicamente de três filamentos protéicos: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os filamentos intermediários são formados pelas queratinas, que constituem uma família complexa composta de aproximadamente 30 proteínas, divididas em duas classes: tipo I ou ácidas e tipo II ou neutro-básicas. Assim que as células epiteliais começam a diferenciar-se das camadas basais para a camada apical, três pares de queratinas principais são seqüencialmente expressos: queratinas basais ou tipo B (K5/K 14); queratinas relacionadas à diferenciação ou tipo D (corneais K31K12) e hiperproliferativas ou tipo H

(K6/K16) (Rodrigues *et al.*, 1986; Gomes, 2000).

2.2.3 Limbo da córnea

O epitélio do limbo tem aproximadamente de 10 a 12 camadas de células em espessura e contém melanócitos, células de Langerhans e as terminações em alça da rede vascular conjuntival. O estroma e o epitélio limbares formam elevações radiais fibrovasculares, denominadas paliçadas de Vogt, que se encontram presentes em toda a circunferência da córnea, porém melhor definidas superior e inferiormente (Gomes, 2000).

O epitélio limbal do homem contém *stem cells* (Girolamo *et al.*, 1999) e essas são responsáveis pela substituição e regeneração teciduais. São indispensáveis à manutenção da integridade da superfície ocular, promovendo sua renovação em condições normais e de reepitelização em processos reparatórios (Brunelli, 2004).

2.2.4 Epitélio da conjuntiva

A conjuntiva bulbar é composta por 6 a 9 camadas de células epiteliais. Essas células são menos regulares e estão agrupadas de maneira menos compacta do que na córnea. Característica típica do

epitélio conjuntival é a presença de células caliciformes secretoras de mucina, que correspondem aproximadamente a 7% da população de células basais. Algumas células epiteliais podem conter grânulos de melanina (Gomes, 2000). O epitélio conjuntival contém células secretórias, denominadas "goblet" (Girolamo *et al.*, 1999).

2.3 Renovação Epitelial da Superfície Ocular

As *stem cells* são células germinativas, imaturas, com função de promover a reposição da massa total de células de um determinado tecido. Essas células são requeridas como último recurso no caso de regenerações. Na maioria das vezes estão concentradas principalmente na região do fórnice da conjuntiva (Meller *et al.*, 2001).

A superfície ocular é caracterizada por um comportamento cíclico em relação à renovação do epitélio e atividade de células do sistema imune que estão sob constante *turnover*. A população de células epiteliais da superfície ocular é mantida pelo equilíbrio entre a divisão celular e a morte celular. As *stem cells* possuem ilimitada capacidade de divisão. São consideradas células com capacidade proliferativa "livre de erros" e após a proliferação ordenada, transformam-se em células de transição e, finalmente, em epitélio corneal diferenciado (Brunelli, 2004).

A população de células do epitélio corneal é mantida pelo equilíbrio entre a divisão no limbo e a camada de células basais do

epitélio (Zhou *et al.*, 2000). No cão, a renovação se dá em cerca de uma semana. As células da sua camada superior estão continuamente se descamando, sendo substituídas por células basais que se proliferam (Brunelli, 2004). As células maduras migram de forma centrípeta e anterior e se fixam quando atingem a superfície (Schermer *et al.*, 1986). As células maduras são eliminadas pelo filme lacrimal e expõem novas células epiteliais. A manutenção da integridade da superfície epitelial corneal pode ser explicada pelo modelo X, Y, Z. As células epiteliais descamadas (componente Z) seriam continuamente renovadas pela proliferação das células basais (componente X) e pela proliferação e migração centrípeta das células do limbo (células-tronco, componente Y). Por tal hipótese, o equilíbrio, quanto a sua renovação, seria mantido quando $X + Y$ fosse igual a Z (Brunelli, 2004). O deslocamento final para término da diferenciação celular é feito pelo ato de piscar. Além disso, a presença de células apoptóticas no epitélio corneal de coelhos sugere um mecanismo alternativo de morte celular (Cotsarelis *et al.*, 1989). A renovação do epitélio conjuntival é semelhante ao corneal, entretanto a localização das *stem cells* ainda é debatida (Zhou *et al.*, 2000).

As desordens do globo ocular representam uma porção significativa do espectro de doenças oftálmicas com etiologias diferentes como, inflamatória, infecciosa, neoplásica, tóxica, iatrogênica, congênita, hereditária, traumática e degenerativa. Algumas dessas injúrias possuem um tratamento limitado, e em alguns casos, há danos severos na

superfície ocular, o que leva a uma restrição nos mecanismos de reparo celular dessa superfície, principalmente das *stem cells*. Em situação de estresse, o epitélio corneal inicia uma resposta aumentando o número de mitoses e a reposição celular, sendo que a migração de células epiteliais é a primeira resposta diante da injúria. No homem, sabe-se que as *stem cells* do epitélio corneal na região do limbo são responsáveis pela manutenção da integridade da superfície ocular (Han *et al.*, 2002).

A maioria das células encontrada na córnea são células epiteliais, queratinócitos e células endoteliais. Essas células têm sido usadas para estudos biológicos referentes ao crescimento celular, proliferação e diferenciação celular epitelial e endotelial (Minami *et al.*, 1992).

2.4 Queratinas

As queratinas são um grupo de proteínas insolúveis, produzidas pelos queratinócitos, cujo peso molecular varia de 40-70 kilodaltons, e compõem filamentos intermediários numa ampla variedade de células epiteliais. A subunidade da queratina vai depender da variação no tipo de célula epitelial, do período de desenvolvimento celular, do estágio de diferenciação histológica e do comportamento do crescimento celular (Cooper *et al.*, 1984; Moroi *et al.*, 2003). Em 1995, apenas as citoqueratinas foram descobertas como moléculas constituintes dos filamentos intermediários, e, desde então, vem sendo investigada a

presença dessas proteínas na zona entre o limbo e a córnea periférica, na intenção de melhor compreender o processo básico de reposição e o *turnover* celular no epitélio corneal (Gan *et al.*, 1995).

Estudos bioquímicos e imunológicos demonstraram que todas as queratinas epiteliais humanas podem ser divididas em dois grupos: subfamília A (tipo I), que consiste nas queratinas ácidas, as quais reagem com o AE1 e a subfamília B (tipo II), que consiste nas queratinas neutro-básicas (Cooper *et al.*, 1984).

Han e colaboradores, em 1998, demonstraram que as células do epitélio corneal derivadas das *stem cells* do limbo e cultivadas *ex-vivo* mantêm sua diferenciação específica expressa pela queratina K3. No estudo, demonstraram que as células de epitélio corneal que cresceram no cultivo de gel de fibrina e expressam queratina K3 mantêm as mesmas características de diferenciação que as células epiteliais da córnea.

Meller e colaboradores, em 2002, demonstraram que em cultivo de epitélio conjuntival utilizando-se membrana amniótica, a resposta do anticorpo monoclonal AE5 (o qual reconhece a queratina K3) é negativa na conjuntiva, mas positiva nas células suprabasais do epitélio do limbo.

Em coelhos, a queratina K3, expressa pelo anticorpo monoclonal AE5 é básica e está localizada na camada suprabasal do limbo e também em todas as camadas do centro da córnea. A expressão dessa queratina é característica das células suprabasais, fato que a torna útil para marcar a diferenciação celular do epitélio corneal. A ausência da queratina K3

nas células basais do limbo, mas a sua presença em todas as células epiteliais do centro da córnea a torna um bom marcador para verificação do estágio de diferenciação epitelial da córnea (Kiritoshi *et al.*, 1991).

A queratina K3 é uma das queratinas de escolha para o estudo da diferenciação celular no epitélio corneal, por 3 motivos:

- Está presente em grande quantidade no epitélio corneal (cerca de 30%), mas está ausente no epitélio conjuntival, na epiderme em outros epitélios,
- A expressão dessa queratina é dependente da diferenciação celular,
- É caracterizada pela localização suprabasal (Rodrigues *et al.*, 1987).

2.5 Marcadores nucleares

Além dos anticorpos monoclonais que reagem superficialmente com as citoqueratinas e determinam o tipo celular presente nos tecidos, existe marcadores capazes de reagir antigenicamente com os núcleos celulares. Entre eles, o PCNA e o Ki-67 são capazes de marcar células em proliferação.

O PCNA é uma proteína nuclear endógena que atua como co-fator para a polimerase delta, e se expressa diferentemente de acordo

com o ciclo celular. A sua taxa de síntese é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular. Essa proteína serve como um marcador não apenas de células em proliferação, mas também de células em reparo de DNA. É expressa durante a replicação do DNA, no início da fase G1, com expressão máxima na fase S e declínio na fase G2. Além disso, as células PCNA positivas provavelmente são as *stem cells* na córnea (Gan *et al.*, 1998). Anteriormente, já haviam sido observadas células PCNA positivas no epitélio corneal com alta taxa de proliferação, principalmente no limbo, sugerindo que essa região seja composta principalmente por células-tronco, porém o endotélio corneal não reage positivamente ao PCNA (Gan *et al.*, 1995).

Entre os marcadores de proliferação celular utilizados na imunistoquímica de tecidos tumorais, o Ki-67 é sem dúvida, o de maior valor. A proteína Ki-67 é um antígeno de proliferação celular presente nas fases G1, S, G2 e mitose do ciclo celular (Ruiz *et al.*, 2004). É descrito como excelente marcador da atividade proliferativa, porém seu uso está restrito à material fresco congelado (Neto *et al.*, 2001). O MIB-1 constitui um anticorpo monoclonal desenvolvido contra o antígeno Ki-67, que pode ser utilizado rotineiramente em tecidos fixados. É produzido pelos recombinantes do Ki-67 com características equivalentes. Vários grupos já relataram uma correlação positiva entre o índice de marcação nuclear do Ki-67 com o MIB-1 (Neto *et al.*, 2001). O MIB-1 também é utilizado

para avaliar a atividade de proliferação celular de tumores, permitindo avaliar a morfologia e cinética das células tumorais (Pich *et al.*, 1994).

A diferença básica entre o PCNA e o MIB-1 é que o primeiro é um antígeno de proliferação e de reparo de DNA, ao passo que o segundo, apenas de proliferação do DNA; isso o torna mais específico para se determinar proliferação celular. Ambos marcadores se caracterizam pela marcação nuclear, evidenciada pela coloração acastanhada (Ruiz *et al.*, 2004) em microscopia de luz.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Considerando-se a necessidade e importância científica em se determinar a localização de células em proliferação da superfície ocular de cães, o presente estudo teve por objetivos:

- Determinar a expressão de células em proliferação pela marcação imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-PCNA e anti-MIB-1, bem como, sua localização na superfície ocular;
- Comparar se há diferença estatística significativa na marcação dessas células em cães jovens e adultos, utilizando-se dois grupos experimentais distintos.

MATERIAL e MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 24 cães, entre machos e fêmeas, de diferentes raças e idades, de peso variado, encaminhados ao Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Araçatuba, que foram a óbito vítimas de traumatismos. Excluíram-se os animais que apresentavam problemas oftálmicos prévios.

Imediatamente após o óbito, procedeu-se a enucleação subconjuntival unilateral dos bulbos oculares esquerdos, bem como o levantamento individual sobre os dados gerais, achados clínicos e exame oftálmico. Foram formados dois grupos de estudo:

- **Grupo A (GA):** constituído por treze cães com idade entre dois e doze anos;

- **Grupo B (GB):** constituído por onze cães com idade entre um e doze meses.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (SP) da UNESP - Campus de Araçatuba.

4.1.1 Colheita dos fragmentos oculares para análise e processamento do material

Após a enucleação subconjuntival unilateral esquerda, o globo ocular foi fixado em solução de formaldeído 10% tamponado (Formol PA, Merck®) por um período de sete dias. Atentou-se para uma manipulação cuidadosa do tecido colhido, a fim de se evitarem danos teciduais que comprometessem a avaliação histológica. Após a fixação, cada bulbo ocular fora cortado com lâmina de bisturi, no sentido sagital, compreendendo as regiões de conjuntiva bulbar superior, limbo superior, córnea, limbo inferior e conjuntiva bulbar inferior (Figura 2).

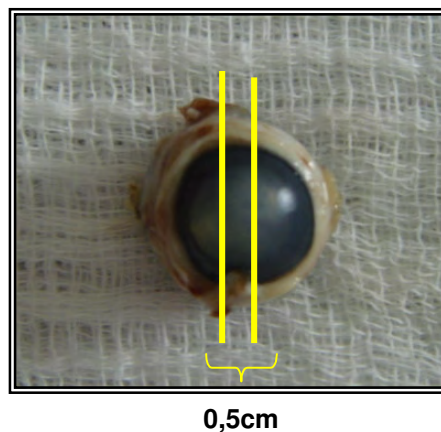


Figura 2. Fotografia identificando local do corte sagital no bulbo ocular esquerdo

Os fragmentos de aproximadamente 0,5 cm foram cuidadosamente introduzidos em cassetes individuais e identificados. Os cassetes foram incluídos em parafina para realização do processamento do histotécnico (Histologie, Merck®) e cortados em micrótomo a uma

espessura de 5µm para a confecção das lâminas. Foram feitas 3 lâminas para cada animal (lâminas de vidro para histologia com extremidade fosca) (Figura 3).

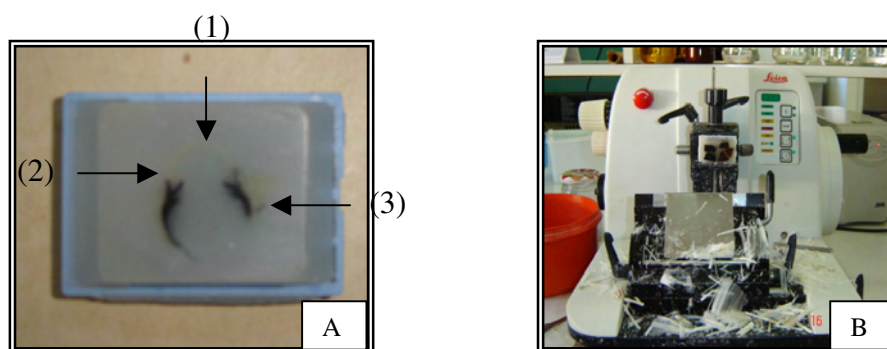


Figura 3. Em A: fotografia de cassete parafinado com o fragmento de córnea (1), esclera (2) e conjuntiva (3); em B: micrótomo utilizado para confecção dos cortes histológicos.

Cada fragmento foi submetido ao processamento convencional para histopatologia e corados pela H.E. (hematoxilina e eosina) e processados pela técnica de imunohistoquímica com os marcadores PCNA (Dako®) e MIB-1 (Dako®).

A observação das lâminas imunomarcadas com PCNA e MIB-1 foi individual, usando-se microscópio de luz com aumento de 400x e foram contadas 100 células em campos bem preservados do epitélio corneal, do limbo e da conjuntiva (Figura 4). As células imunomarcadas apresentavam núcleos evidentes e acastanhados. Para a análise estatística, o número de células imunomarcadas foi convertido em porcentagem. A positividade aos exames imunohistoquímicos para PCNA e

MIB-1 foi subjetivamente analisada e os resultados obtidos foram transformados em cruces, sendo que:

- + : imunomarcção fraca
- ++ : imunomarcção média
- +++ : imunomarcção forte

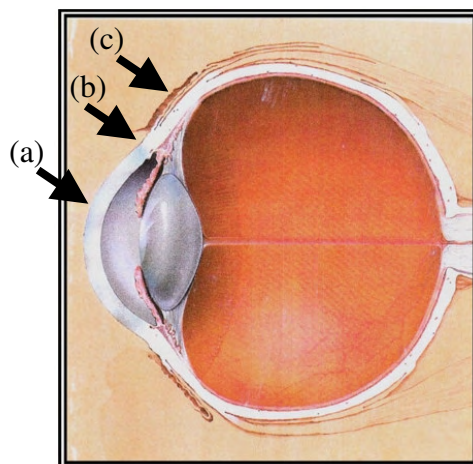


Figura 4. Representação esquemática do corte sagital de olho. No esquema observam-se as regiões do bulbo ocular aonde foram realizadas as contagens de células marcadas pelo PCNA e MIB-1. Em (a): epitélio da córnea; (b): região do limbo e (c): conjuntiva bulbar.

4.2 Imunoistoquímica

Inicialmente realizou-se a desparafinização em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos. A hidratação dos cortes foi realizada utilizando-se álcool absoluto, 95% e 85% (5 minutos em cada álcool), seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos e finalizando-se com duas passagens em água destilada.

A recuperação antigênica dos cortes foi realizada pelo calor em microondas com solução de citrato 10mM (2,1 g de ácido cítrico monohidratada diluídos em 1000 mL de água destilada), corrigindo-se o pH = 6.0, em duas passagens no microondas de 5 minutos cada, deixando-se o material esfriar em temperatura ambiente. É importante na recuperação antigênica verificar o nível da solução de citrato 10Mm a cada passagem, pois caso haja sua diminuição é necessário completá-lo. Ato contínuo, as lâminas foram lavadas em água corrente para a realização da próxima etapa.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, usou-se solução de 100,0 mL de água oxigenada (20V) diluída em 100,0 mL de metanol durante 30 minutos, com lavagem subsequente em água corrente e banho em solução TRIS (tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4: 1000mL de água destilada + 6g de tris base + 8,5g de cloreto de sódio, com variação de pH entre 7,2 e 7,6).

A incubação com os anticorpos primários aconteceu na seqüência, enquanto as lâminas ainda estavam na solução TRIS. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-MIB-1 e anti-PCNA, Dako[®]) por 18 horas (*overnight*) a uma temperatura de 4^oC (em geladeira). Em seguida, foram incubadas em estufa a 37^oC por 120 minutos e, então, as lâminas foram lavadas em solução tampão TRIS (pH=7,4) por 10 minutos.

Como próxima etapa, realizou-se a incubação com os anticorpos secundários. As lâminas foram incubadas com “kit” LSAB (Dako[®]), pronto para uso, que contempla os anticorpos secundários, por 30 minutos em câmara úmida (37^oC). Em seguida fez-se uma passagem em solução tampão TRIS (pH = 7,4) por 10 minutos. As diluições usadas foram 1:100 para o PCNA e 1:50 para o MIB-1.

Ato contínuo, a revelação foi conduzida utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB = 100ml de solução tampão TRIS + 0,025g de DAB + 600µl de água oxigenada 20V), com sucessiva lavagem em solução tampão TRIS por 5 minutos, em água corrente por 10 minutos e, por fim, em água destilada por 5 minutos.

Em seguida foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Meyer (Dako[®]), usando-se 5,0 mL por lâmina e lavagem em água destilada por 5 minutos.

Para finalização, as lâminas foram desidratadas em lavagens decrescentes de álcoois, e, posteriormente, montadas em resina sintética (Permunt[®]) e com lamínulas de vidro.

4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos da contagem do número de células pelos marcadores de proliferação celular foram submetidos à análise de variância em parcelas subdivididas (“split-plot”) onde estas foram consideradas os grupos, e as sub-parcelas foram consideradas as técnicas.

A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, no nível de significância de 5%. Os resíduos foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, considerados pré-requisitos necessários para a análise de variância. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System) (Zar, 1998).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Nas lâminas coradas pela H.E., observou-se normalidade no padrão histológico do bulbo ocular, atentando-se ao tecido corneal, cujas camadas apresentavam-se íntegras, com o contorno do epitélio bem definido em toda sua extensão e também as demais regiões anatômicas do olho estavam preservadas. Essas lâminas, coradas pelo H.E., foram utilizadas como controle à observação das regiões imunomarcadas.

O presente estudo revelou a expressão do PCNA e do MIB-1 em células do tecido corneal em cães de diferentes idades, principalmente nas regiões do limbo e epitélio corneal.

A Tabela 1 apresenta média e o erro padrão da média da porcentagem de células marcadas pelo PCNA e MIB-1 em ambos os grupos.

Tabela 1. Média (\bar{x}) e erro padrão da média (EPM) da % de células marcadas, segundo as técnicas e grupos.

Marcadores de proliferação celular	% de células marcadas ($\bar{x} \pm \text{EPM}$)	
	Grupo A	Grupo B
PCNA	68,1 \pm 5,9 aA	76,9 \pm 4,6 aA
MIB -1	30,2 \pm 5,3 bA	43,5 \pm 6,2 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Nota-se que estatisticamente, não há diferença significativa ao nível de significância de 5% entre os grupos A e B, ou seja, a idade não influenciou a proliferação celular na superfície ocular de cães. Entretanto, biologicamente notou-se essa diferença, pois os cães jovens tiveram um maior número de células imunomarcadas. Embora fora observado uma maior marcação para o PCNA, a análise dos dados não revelou diferença estatística para ambos os marcadores entre os grupos, mas houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o número de células marcadas pelo PCNA e MIB-1 dentro de cada grupo (Figura 5).

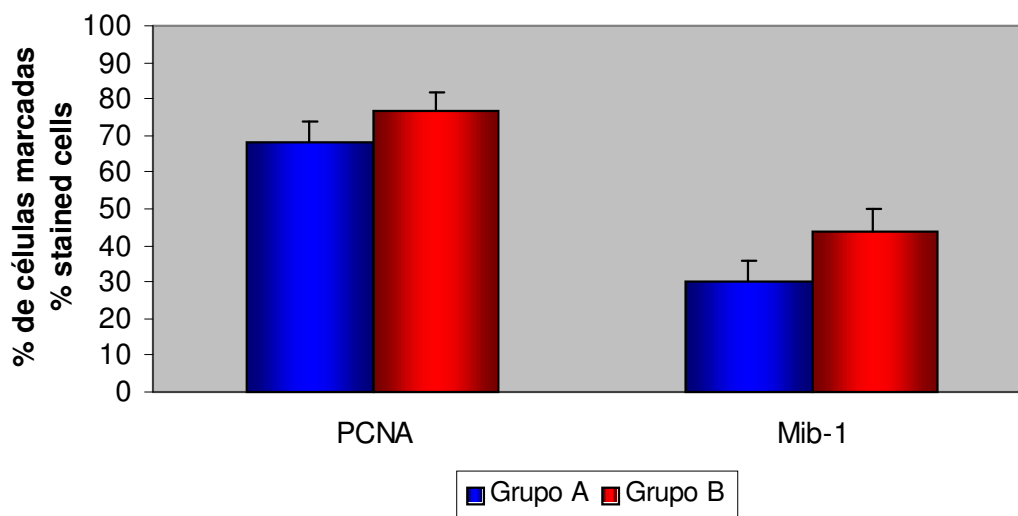


Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de células imunomarcadas pelas técnicas de PCNA e MIB-1 nos grupos de estudo (GA e GB).

Evidenciou-se ainda, que nos animais mais jovens (GB) a expressão dos marcadores nucleares (PCNA e MIB-1) foi maior do que a observada nos animais adultos (GA), como mostra a Figura 6. As células imunomarcadas (núcleos evidentes e acastanhados) concentraram-se principalmente no limbo e no epitélio corneal em ambos os grupos. A imunomarcagem do MIB-1, entretanto, foi menor nos dois grupos de estudo, quando comparado com o PCNA. Nos demais tecidos da superfície ocular a imunomarcagem foi discreta, com ausência total de marcação no endotélio corneal.

Em todas as lâminas observou-se que a região limbal fora a mais imunomarcada, tanto para o PCNA como para o MIB-1, em ambos os grupos de estudo.

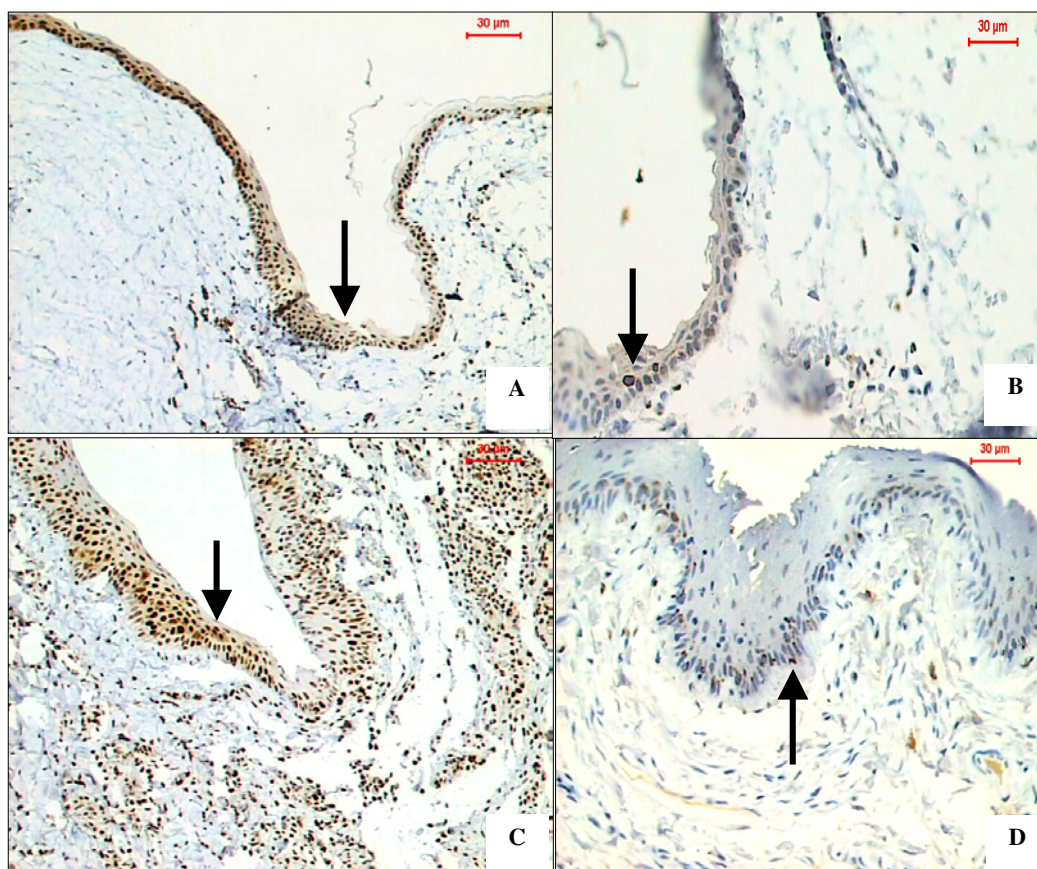


Figura 6. Fotomicrografia da região da córnea, limbo e conjuntiva de olhos de cães dos grupos GA e GB coradas pelas técnicas de imunistoquímica para os marcadores nucleares PCNA e MIB-1. A: região de limbo de animal adulto (GA) marcada pelo PCNA; B: região de limbo de animal adulto (GA) marcada pelo MIB-1; C: região de limbo de animal jovem (GB) marcada pelo PCNA; D: região de limbo de animal jovem (GB) marcada pelo MIB-1. Nas setas, observam-se as células imunomarcadas, com núcleos evidentes e acastanhados. Notar maior imunomarcção de células em proliferação pela técnica do PCNA.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No homem, a exata localização das células tronco já está bem estabelecida. Entretanto, não se encontram relatos quanto a este aspecto em medicina veterinária. Brunelli (2004) investigando experimentalmente a eficiência do transplante autólogo de limbo em cães com destruição total desta região ocular, concluiu que o mesmo foi eficiente em possibilitar a recuperação da transparência corneal dos olhos lesados. No mesmo sentido, os olhos dos cães doadores não apresentaram complicações, fornecendo evidências que o limbo seja a fonte doadora dessas células na superfície ocular. Com as particularidades anatômicas da córnea e limbo no cão, nem sempre é possível extrapolar, de forma segura, os resultados de pesquisas desenvolvidas no homem. Sendo assim, optou-se por estudar a exata localização deste tipo celular nos olhos de cães em diferentes idades. Para tanto, foram utilizados os marcadores de proliferação celular PCNA e MIB-1, ainda que a imunomarcação com anticorpo monoclonal AE5 fosse mais específica por marcar a citoqueratina K3 que é expressa pelas células-tronco (Kiritoshi *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2002; Meller *et al.*, 2002). Porém, a inexistência no mercado de anticorpos espécie-específico para o cão com essa finalidade, foi determinante para a utilização dos dois marcadores de proliferação celular (PCNA e MIB-1) nesse estudo. Apesar desses dois

imunomarcadores também serem espécie-específicos para o homem, ambos reagem bem com a superfície ocular de cães.

Nos cortes histológicos corados pelo H.E., observou-se normalidade no padrão histológico do bulbo ocular atentando-se ao tecido corneal, cujas camadas apresentavam-se íntegras, bem como as demais regiões anatômicas do olho. Essas, foram utilizadas como controle à observação das regiões imunomarcadas.

O presente estudo revelou a expressão do PCNA e do MIB-1 em células do tecido corneal em cães de diferentes idades, principalmente nas regiões do limbo e epitélio corneal. Gan *et al.* (1995), descreveram que a integridade corneal depende de uma constante reposição das células epiteliais. Qualquer injúria no tecido corneal provocará como resposta, um aumento na atividade proliferativa de células indiferenciadas da córnea, mas, que na dependência do estímulo, diferenciar-se-iam em células epiteliais corneais. É importante ressaltar que o endotélio corneal não foi marcado, conforme fora descrito no homem pelos mesmos autores.

Embora fora observado uma maior marcação para o PCNA, a análise dos dados não revelou diferença estatística para ambos os marcadores entre os grupos, mas houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o número de células marcadas pelo PCNA e MIB-1 dentro de cada grupo. Era esperado que tal fato ocorresse, pois o MIB-1 é mais específico por marcar apenas células em proliferação. Salienta-se que o

emprego desse marcador no olho não fora reportado anteriormente em medicina humana e veterinária. Pode-se observar que é possível utilizá-lo em pesquisas desta natureza, sendo, portanto, um marcador confiável aos objetivos propostos. Alguns estudos têm analisado o valor preditivo do MIB-1 em carcinomas vesicais e neoplasias prostáticas no homem, e tumor venéreo transmissível em cães (Neto *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2004).

O PCNA, além de ser um marcador de células em proliferação também se constitui em um marcador de células em reparação (Gan *et al.*, 1995). Nos olhos aqui estudados, observou-se um maior número de células marcadas pelo mesmo, no entanto, não se pode afirmar que todas as células marcadas estejam em proliferação e que, portanto, tratem-se de células-tronco. A sua utilização em estudos da córnea humana como marcador de *stem cell* e células transicionais, permitiu inferir que este é bom sinalizador de células em proliferação da superfície ocular. O mesmo pode-se sugerir no estudo ora descrito. Salienta-se, que a taxa de síntese de PCNA está diretamente correlacionada com a taxa de proliferação celular (Gan *et al.*, 1998), ou seja, quanto maior positividade da imunomarcção, maior o grau de proliferação celular. Embora não fosse objetivo deste estudo correlacionar tal aspecto, foi possível observar a presença de células fortemente ou fracamente imunomarcadas em todas as regiões estudadas, independentemente do grupo avaliado.

Os resultados observados permitem sugerir que a região superior do limbo foi a que apresentou maior taxa de núcleos imunomarcados pelo

PCNA e MIB-1, independentemente do grupo estudado. Entretanto, também foram contadas células imunomarcadas na conjuntiva e na porção superior do epitélio corneal, em quantidades menores. O mesmo fora descrito por outros autores que utilizaram o PCNA na identificação de *stem cells* na superfície ocular do homem (Gan et al., 1995).

Com esse estudo, evidenciou-se que, nos animais mais jovens (GB), a expressão dos marcadores nucleares (PCNA e MIB-1) foi maior do que a observada nos animais adultos e mais velhos (GA). Isso sugere uma maior atividade de proliferação celular nos animais jovens, possivelmente em função da taxa do metabolismo mais acelerada.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nas condições aqui adotadas, pode-se concluir ao término deste trabalho que:

- A presença de células em proliferação imunomarcadas pelo PCNA e pelo MIB-1 foi observada em diferentes tecidos da superfície ocular de cães, sendo os tecidos mais marcados foram o limbo e o epitélio da córnea;
- Cães mais jovens apresentam um maior contingente de células em proliferação nos tecidos oculares estudados, do que o observado nos cães adultos, embora estatisticamente isso não fora visto.
- É provável que, as células imunomarcadas sejam células-tronco da superfície ocular de cães. No entanto, para tal comprovação, sugere-se a necessidade da utilização de anticorpos monoclonais espécie-específico como o AE5 no homem.
- Esse trabalho servirá de base para futuros estudos e delineações científicas sobre a cinética, fisiopatologia e anatomia da superfície ocular de cães

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ANDRADE A.L. *Efeitos da membrana amniótica humana sobre a cicatrização de córneas de coelho submetidas a traumas mecânico e químico: aspectos clínicos, morfológicos e bioquímicos*. Botucatu, 2002. 247p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

BRUNELLI, A, T., J. Transplante autógeno de células-tronco e do limbo esclerocorneal, simultaneamente, em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). Jaboticabal, 2004. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal

CHUN, E., BUKUSOGLU, G., ZIESKE, J. D. Localization of corneal epithelial stem cells in the developing rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 33, n. 7, p. 2199-2206, 1992.

COOPER, D.; SCHERMER, A.; PRUSS, R.; SUN, T.T. The use of a1F, AE1 and AE3 monoclonal antibodies for the identification and classification of mammalian epithelial *keratins*. *Differentiation*, vol. 28, p. 30-5, 1984.

COTSARELIS, G.; CHENG, S.; DONG, G.; SUN, T.; LAVKER, R. M. Existence of Slow-Cycling Limbal Epithelial Basal Cells That Can Be Preferentially Stimulated to Proliferate: Implications on Epithelial Stem Cells. *Cell*, vol. 57, p. 201-09, 1989.

GAN, L.; SETTEN, G.; SEREGARD, S.; FAGERHOLM, P. Proliferating Cell Nuclear Antigen Colocalization With Corneal Epithelial Stem Cells and Involvement in Physiological Cell Turnover. *Acta Ophthalmol. Scand.*, vol. 73, p. 491-95, 1995.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; EKENBARK, S. Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Corneas Kept in Long Term Culture. *Acta Ophthalmol. Scand.*, vol. 76, p. 308-13, 1998.

GIROLAMO, N.D.; TEDLA, N.; KUMAR, R.K.; McCLUSLEY, P.; LLOYD, A.; CORONEO, M.T.; WAKEFIELD, D. Culture and characterization of epithelial cells from human pterygia. *Br J Ophthalmol*, vol.83, p. 1077-82, 1999.

GOMES, J. A. P. Efeito do hialuronato de sódio na migração e proliferação do epitélio de córnea humana. São Paulo, 2000. 110p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo - USP.

HAN, B.; SCHWAB, I.R.; MADSEN, T.K.; ISSEROFF, R.R. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells.

Cornea, vol. 21, n.5, p. 505-10, 2002.

KIRITOSHI A., SUNDARRAJ N., THOFT R.A. Differentiation in culture limbal epithelium as defined by keratin expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 32, n. 12, p. 3073-3077, 1991.

MELLER, D.; DABUL, V.; TSENG, S.C.G. Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. *Exp Eye Res*, vol. 74, p. 537-45, 2002.

MINAMI, Y., SUGIHARA H., OONO, S. Reconstruction of córnea in three dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 34, n. 7, p. 2316-2324, 1993.

MOROI, S. E., GOKHALE, P. A., SCHTEINGART, M. T., SUGAR, A., DOWS, C. A., SHIMIZU, S., KRAFCHAK, C., FUSE, N., ELNER, S. G., ELNER, V. M., FLINT, A., EPSTEIN, S. G., BOENHKE, M., RICHARDS, J. E. Clinicopathologic correlation and genetic analysis in a case of porterior polymorphos corneal dystrophy. *Am J of Ophthalmology*, vol. 135, n. 4, p. 461-70, 2003.

NETO, J. A. D.; MARTINS, A. C. P.; PASTORELLO, M. T.; TUCCI, Jr. S.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J. Expressão Imunohistoquímica do MIB-1 em Carcinoma de Células Transicionais de Bexiga. *Acta Cirúrgica Brasileira.*, vol. 16, suppl.1, 2001.

PICH, A., PONTI, R., VALENTE, G., CHIUSA, L., GEUNA, M., NOVERO, D., PALESTRO, G. MIB-1, Ki-67 and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate grade malignant lymphomas. *Journal of Clinical Pathology*, vol. 47, p. 18-22, 1994.

RODRIGUES, M., BEM-ZVI, A., KRACHER, J., SCHERMER, A., SUN, T.T. Clinical, electron microscopic and monoclonal antibody studies of intraocular epithelial downgrowth. *Tr Am Phth Soc*, vol. 86, 1986.

RUIZ, C.M.; SOTO, G. M. T.; ZUCCARI, D. A. P. C. Estudo da Apoptose e da Proliferação Celular no Tumor Venéreo Transmissível Canino. *ARS Veterinária*, vol. 20, n.1, p. 107-14, 2004.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999

SCHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T. T. Differentiation related expression of a major 64k corneal keratin *in vivo* and culture suggests

limbal location of corneal epithelial *stem cells*. *J Cell Biol*, vol. 103, n. 1, p. 49-62, 1986.

SLATTER, D. Desenvolvimento e anormalidades congênitas. In: Slatter D. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. 2. cap. P. 23-35

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 930 p.

ZHOU, J., BEGLEY, C.G., WRIGHT, A., WILSON, G., TOKARSKI, T. Characterization of cells collected from the normal human ocular surface by contact lens cytology. *Cornea*, vol.19, n. 6, p. 824-32, 2000.

TRABALHO

Instruções aos Autores

- **Artigos Científicos**

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português e em inglês, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo e abstract

- Tanto o resumo, como o abstract devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, deve ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave e key words que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de**

tabelas, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor (modelos anexos).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, **em três vias (uma original e duas cópias)** impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½" de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias **deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.**

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

Expressão de Antígenos Nucleares de Células em Proliferação na Superfície Ocular de Cães Jovens e Adultos

Expression of Proliferation Cells Nuclear Antigens in Ocular Surface of Young and Adult Dogs

Marcele Cristina Caetano¹, Alexandre Lima de Andrade², Maria Cecília Rui Luvizotto³, Renée Laufer Amorin⁴, Silvia Helena Venturolli Perri³

¹ Médica Veterinária Autônoma, Pós-graduanda da Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba – Faculdade de Odontologia – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Rua Paraguai, 1810 Sala 03. Centro, Medianeira (PR). Fones: (45) 3264-5798; (45) 3240-2647; (45) 9934-4021. marcelecaetano@hotmail.com

² Professor Assistente Doutor – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista – Unesp – campus de Araçatuba.

³ Professora Assistente Doutora - Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista – Unesp – campus de Araçatuba.

⁴ Professora Assistente Doutora – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Unesp – campus de Botucatu

RESUMO

Expressão dos antígenos nucleares de células em proliferação na superfície ocular de cães jovens e adultos

As células-tronco (stem cells) têm um papel fundamental nos processos reparativos e regenerativos da córnea. A exata localização destas é bem conhecida no olho do homem, bem como as suas funções. Entretanto, as mesmas ainda não foram descritas em medicina veterinária, sequer a sua localização em olhos de animais de companhia, tratando-se assim, de assunto que merece novas e originais investigações. Anticorpos monoclonais que reagem superficialmente com as citoqueratinas são empregados para determinar este tipo celular presente nos tecidos, no entanto, existem outros marcadores capazes de reagir antígenoicamente com núcleos celulares. Entre eles, o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e o Ki-67 (antígeno de proliferação Ki-67) são capazes de marcar células-tronco em proliferação. Uma vez que isso nunca fora descrito anteriormente, e considerando-se a necessidade e importância científica em se determinar a localização de células em proliferação na superfície ocular de cães, o presente estudo teve por objetivos: 1) determinar a expressão de células em proliferação pela marcação imunohistoquímica com anticorpos monoclonais anti-PCNA e anti-MIB-1 (anticorpo monoclonal anti-Ki-67), bem como, sua localização na superfície ocular; 2) comparar se há diferença estatística significativa na marcação dessas células em diferentes idades. Para tanto, foram utilizados 24 cães jovens e adultos, saudáveis, dos quais o bulbo ocular esquerdo foi removido, fixado e corado pela H.E. (hematoxilina e eosina), além da imunohistoquímica empregando-se os anticorpos monoclonais anti-PCNA e anti-MIB-1. Concluiu-se que a presença de células em proliferação imunomarcadas pelo PCNA e pelo MIB-1 foi observada em diferentes tecidos da superfície ocular de cães, sendo os tecidos mais marcados: o limbo e o epitélio da córnea. É possível que as células marcadas pelos imunomarcadores sejam células-tronco da superfície ocular de cães. No entanto, para tal comprovação sugere-se a necessidade da utilização de anticorpos

monoclonais espécie-específicos como o AE5 (anticorpo monoclonal anti-queratina 3), ainda não disponíveis.

Palavras-chave: córnea, PCNA, MIB-1, células-tronco

ABSTRACT

Expression of proliferation cells nuclear antigens in ocular surface from young and adults dogs

The stem-cells has a fundamental paper in process of cornea's tissue repair and regeneration. In man, the well-know localization and functions had been described a long time ago, however the same ones had not yet been described in veterinary medicine, at least your localization in eyes of company animals, what deserve new and original inquiries. Monoclonais antibodies that react superficially with the cytokeratins are used to determine this cell type presence in ocular surface. However, exist another markers capable to react with cell nucleoli, for example, PCNA and MIB-1 that are capable to mark proliferation cells. Considering the necessity and scientific importance to determining the localization of proliferation cells on dog's ocular surface, that, never was described previously, the present study had for objectives: 1) determineted the expression of proliferation cells immunohistochemically by PCNA and MIB-1 and its localization in ocular surface; 2) compare if has statistically significant difference in immunoexpression of proliferation cells in different ages. In the study was used 24 healthy, young and adults dogs, witch had the left eyes removed, fixed in buffered formalin and stained with H.E. (hematoxilin and eosin) and with anti-PCNA and anti-MIB-1 monoclonal antibodies. The presence of immunostained cells was more evident in corneal epithelium and limbo. Probably the immunostained cells are stem-cells in dog's ocular surface, however

for such evidence it is necessary the use of monoclonais antibodies specie-specific as AE5, not yet avaiable.

Key-words: cornea, PCNA, MIB-1, stem-cells

INTRODUÇÃO

A superfície ocular é composta pelos epitélios da córnea, limbo e conjuntiva. Os três epitélios apresentam características comuns, porém diferenciam-se tanto fenotipicamente quanto funcionalmente (Gomes, 2000). A capacidade regenerativa destas estruturas tem sido alvo de incansáveis estudos em várias espécies, tratando-se ainda de assunto polêmico. No entanto, sabe-se do papel fundamental das células tronco (*stem cells*) neste processo regenerativo. A literatura humana descreve a exata localização, bem como as funções destas células. Entretanto, as mesmas ainda não foram descritas em medicina veterinária, sequer a sua localização em olhos de animais de companhia, tratando-se assim, de assunto que merece novas e originais investigações.

A localização das células tronco no tecido corneal no homem pode ser influenciada pela idade, mas poucos trabalhos científicos foram realizados objetivando esse aspecto. É provável que o mesmo ocorra em animais. Elas se constituem de células germinativas, imaturas, com função de promover a reposição da massa celular de um determinado tecido. São requeridas como um último recurso no caso de regenerações. Na maioria das vezes estão concentradas na região do fórnice conjuntival (Meller *et al.*, 2001) e apresentam um comportamento cíclico em relação à renovação do epitélio e atividade de células do sistema imune, que estão sob constante *turnover*. A população de células do epitélio corneal é mantida pelo equilíbrio entre a divisão no limbo e a camada de células basais do epitélio. As células maduras migram centripetamente e

anteriormente e se fixam quando atingem a superfície (Schermer *et al.*, 1986). As células antigas são eliminadas pelo filme lacrimal e expõem as novas células epiteliais. O deslocamento final para término da diferenciação celular é feito pelo ato de piscar. Em coelhos, a presença de células em apoptose no epitélio corneal sugere um mecanismo alternativo de morte celular. Cotsarelis *et al.* (1989) relataram, ainda, que a rápida e eficiente renovação e proliferação do epitélio limbal reflete diretamente a eficácia da regeneração do epitélio corneal, e isso reforça a hipótese de que o epitélio limbal é o maior sítio de células-tronco na superfície ocular. A renovação do epitélio conjuntival é semelhante à corneal, entretanto, a localização das *stem cells* ainda é discutida (Zhou *et al.*, 2000).

As desordens do globo ocular representam uma porção significativa do espectro de doenças oftálmicas de diferentes etiologias, tais como: inflamatória, infecciosa, neoplásica, tóxica, iatrogênica, congênita, hereditária, traumática e degenerativa. Algumas dessas injúrias possuem um tratamento limitado e, em alguns casos, há danos severos na superfície ocular, o que leva à restrição nos mecanismos de reparo celular dessa superfície, principalmente das células troco. Em situação de estresse, o epitélio corneal inicia uma resposta aumentando o número de mitoses e a reposição celular, sendo que a migração de células epiteliais é a primeira resposta frente à injúria. No homem, sabe-se que as *stem cells* do epitélio corneal localizadas na região do limbo são responsáveis pela manutenção da integridade da superfície ocular (Han *et al.*, 2002).

Existem marcadores capazes de reagir antigenicamente com os núcleos celulares. Entre eles, o PCNA e o Ki-67 são capazes de marcar células em

proliferação. O PCNA é uma proteína nuclear que atua como co-fator para a polimerase delta, e se expressa diferentemente de acordo com o ciclo celular. A sua taxa de síntese é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular (Gan *et al.*, 1995). Essa proteína constitui-se em um marcador de células em proliferação, sendo expressa durante a replicação do DNA, no início na fase G1, com expressão máxima na fase S e declínio na fase G2. Além disso, as células PCNA positivas provavelmente sejam as *stem cells*. As células PCNA positivas no epitélio corneal com alta taxa de proliferação, principalmente no limbo, sugerem que essa região seja composta principalmente por células-tronco (Gan *et al.*, 1995). Em outros estudos, Gan *et al.* (1998), demonstraram que o endotélio corneal não reage positivamente ao PCNA. A proteína Ki-67 é um antígeno de proliferação celular presente nas fases G1, S, G2 e mitose do ciclo celular (Ruiz *et al.*, 2004). O MIB-1 constitui um anticorpo monoclonal produzido pelos recombinantes do Ki-67 com características equivalentes. Vários grupos já relataram uma correlação positiva entre o índice de marcação nuclear do Ki-67 com o MIB-1 (Neto *et al.*, 2001). A diferença básica entre o PCNA e o MIB-1 é que o primeiro é um antígeno de proliferação e de reparo de DNA, ao passo que o segundo, apenas de proliferação do DNA; isso o torna mais específico para se determinar proliferação celular. Ambos marcadores se caracterizam pela marcação nuclear, evidenciada pela coloração acastanhada (Ruiz *et al.*, 2004) em microscopia de luz.

Sendo assim, considerando-se a necessidade e importância científica em se determinar a localização de células em proliferação da superfície ocular de cães, o

presente estudo teve por objetivos: 1) determinar a expressão de células em proliferação através da marcação imunistoquímica pelo PCNA e pelo MIB-1, bem como, sua localização na superfície ocular; 2) comparar se há diferença estatística significativa na marcação dessas células em diferentes idades.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 cães, entre machos e fêmeas, de diferentes raças e idades, adquiridos junto aos serviços hospitalares do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Araçatuba, que foram a óbito vítimas de traumatismos. Foram excluídos os animais que apresentaram problemas oftálmicos prévios. Imediatamente após o óbito, procedeu-se a enucleação subconjuntival unilateral dos bulbos oculares esquerdos, bem como o levantamento individual sobre os dados gerais, achados clínicos e exame oftálmico. Foram formados dois grupos de estudo: 1) Grupo A (GA) constituído por treze cães com idade entre dois e doze anos e 2) Grupo B (GB), constituído por onze cães com idade entre um e doze meses.

Colheita dos fragmentos oculares para análise e processamento do material

Após a enucleação, o globo ocular foi fixado em formol tamponado 10% por um período de sete dias. Após esse período, cada globo ocular foi cortado em

fragmentos de 0,5 cm na sua região central, no sentido sagital, compreendendo as regiões de conjuntiva bulbar superior, limbo superior, córnea, limbo inferior e conjuntiva bulbar inferior. Ato contínuo ao corte, colocou-se os fragmentos em cassetes individuais e identificou-se. Esses foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo a uma espessura de 5 μ m para a confecção das lâminas, fazendo-se três lâminas para cada animal, pois cada fragmento foi submetido ao processamento convencional para histopatologia e corado pela H.E. e processados pela técnica de imunohistoquímica com os marcadores PCNA e MIB-1. Os cortes foram avaliados em microscópio de luz quanto aos padrões histológicos normais e em relação à quantidade de células marcadas pelos dois marcadores de proliferação celular. Para tanto, em cada lâmina foram contadas as células do epitélio corneal, do limbo e da conjuntiva (Figura 1), totalizando a contagem de 100 células por campo observado, atentando-se para a positividade aos exames imunohistoquímicos do PCNA e MIB-1.

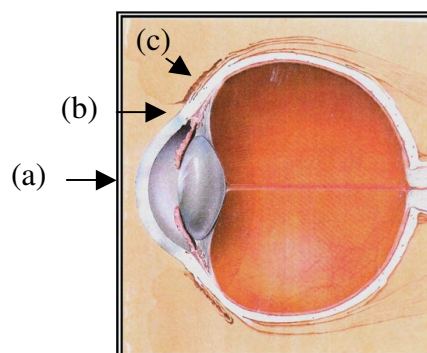


Figura 1 –Na representação esquemática observam-se as regiões do bulbo ocular aonde foram realizadas as contagens de células marcadas pelo PCNA e MIB-1. Em (a): Epitélio da córnea; (b): região do limbo e (c): conjuntiva bulbar.

Imunoistoquímica

Inicialmente realizou-se a desparafinização dos cortes histológicos em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos. A hidratação foi realizada utilizando-se álcool absoluto, 95% e 85% (5 minutos em cada), seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos e finalizando-se com duas passagens em água destilada. A recuperação antigênica pelo calor foi feita em microondas com solução de citrato 10,0 mM, pH = 6.0, em duas passagens de 5 minutos cada, deixando-se o material esfriar em temperatura ambiente e lavagem em água corrente. Para o bloqueio da peroxidase endógena, usou-se solução de água oxigenada (20V) diluída em metanol, em iguais proporções, durante 30 minutos, com lavagem subsequente em água corrente. Na seqüência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-MIB-1 e anti-PCNA, Dako[®]) por 18 horas a uma temperatura de 4⁰C. As diluições usadas foram 1:100 para o PCNA e 1:50 para o MIB-1. Em seguida foram incubadas em estufa a 37⁰C por 120 minutos e, então, as lâminas foram lavadas em solução tampão TRIS (pH=7,4). As lâminas foram incubadas com “kit” LSAB (Dako[®]), que contempla o anticorpo secundário, por 30 minutos em câmara úmida e, em seguida, em uma passagem em solução tampão. A revelação foi conduzida utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB), com sucessiva lavagem em solução tampão, água corrente e água destilada. Por fim, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Meyer (Dako[®]), 5,0 mL por lâmina e lavagem em água destilada. As lâminas foram desidratadas em lavagens decrescentes de alcóois e, posteriormente, montadas em resina sintética. A observação das lâminas marcadas

com PCNA e MIB-1 foi individual, usando-se microscópio de luz com aumento de 400x e foram contadas 100 células em campos bem preservados. As células imunomarcadas apresentavam núcleos evidentes e acastanhados.

Análise Estatística

Os dados obtidos da contagem do número de células pelos marcadores de proliferação celular foram submetidos à análise de variância em parcelas subdivididas (“split-plot”) onde as parcelas foram consideradas os grupos, e as sub-parcelas as técnicas. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, no nível de significância de 5%. Os resíduos foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, considerados pré-requisitos necessários para a análise de variância. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System) (Zar, 1998).

RESULTADOS

Nos cortes histológicos corados pela H.E. observou-se normalidade no padrão histológico do bulbo ocular atentando-se ao tecido corneal, cujas camadas apresentavam-se íntegras, bem como as demais regiões anatômicas do olho. Essas foram utilizadas como controle à observação das regiões imunomarcadas.

O presente estudo revelou a imunomarcção do PCNA e do MIB-1 em células do tecido corneal em cães jovens e adultos, principalmente nas regiões do limbo e epitélio corneal.

A Tabela 1 apresenta média e o erro padrão da média da porcentagem de células marcadas pelo PCNA e MIB-1 em ambos os grupos.

Tabela 1. Média (\bar{x}) e erro padrão da média (EPM) da % de células marcadas, segundo as técnicas e grupos.

Marcadores de proliferação celular	% de células marcadas ($\bar{x} \pm \text{EPM}$)	
	Grupo A	Grupo B
PCNA	68,1 \pm 5,9 aA	76,9 \pm 4,6 aA
MIB -1	30,2 \pm 5,3 bA	43,5 \pm 6,2 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Nota-se, entretanto, que estatisticamente, não há diferença significativa ao nível de significância de 5% entre os grupos A e B, ou seja, a idade não influenciou a proliferação celular na superfície ocular de cães. Embora fora observado uma maior imunomarcagem pelo o PCNA, a análise estatística dos dados não revelou diferença para ambos os marcadores entre os grupos, mas houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o número de células marcadas pelo PCNA e MIB-1 dentro de cada grupo (Figura 2).

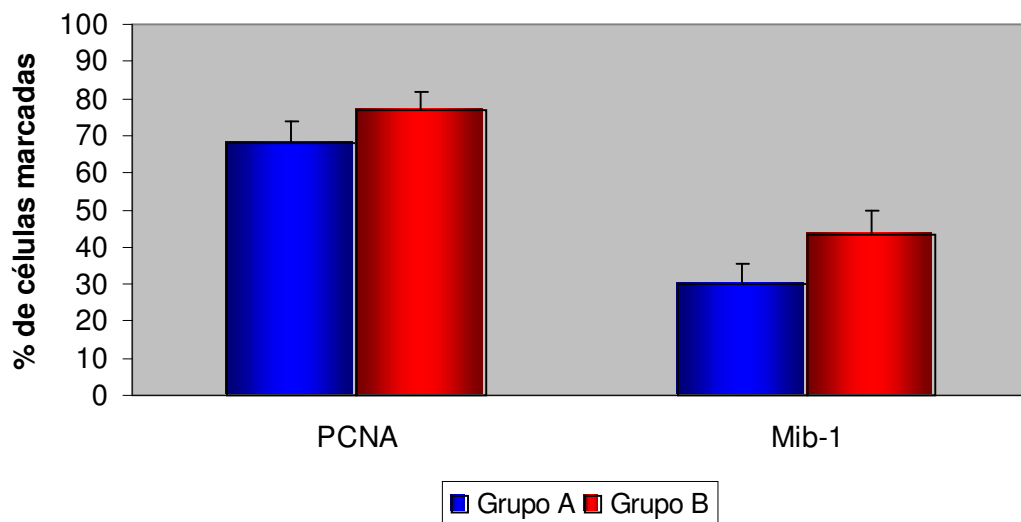


Figura 2. Representação gráfica da porcentagem de células imunomarcadas pelas técnicas de PCNA e MIB-1 nos grupos de estudo (GA e GB).

As células imunomarcadas concentraram-se principalmente no limbo e no epitélio corneal em ambos os grupos. A imunomarcagem do MIB-1, entretanto, é menor nos dois grupos de estudo, quando comparado com o PCNA. Nos demais tecidos da superfície ocular a imunomarcagem foi discreta, com ausência total de marcação no endotélio corneal.

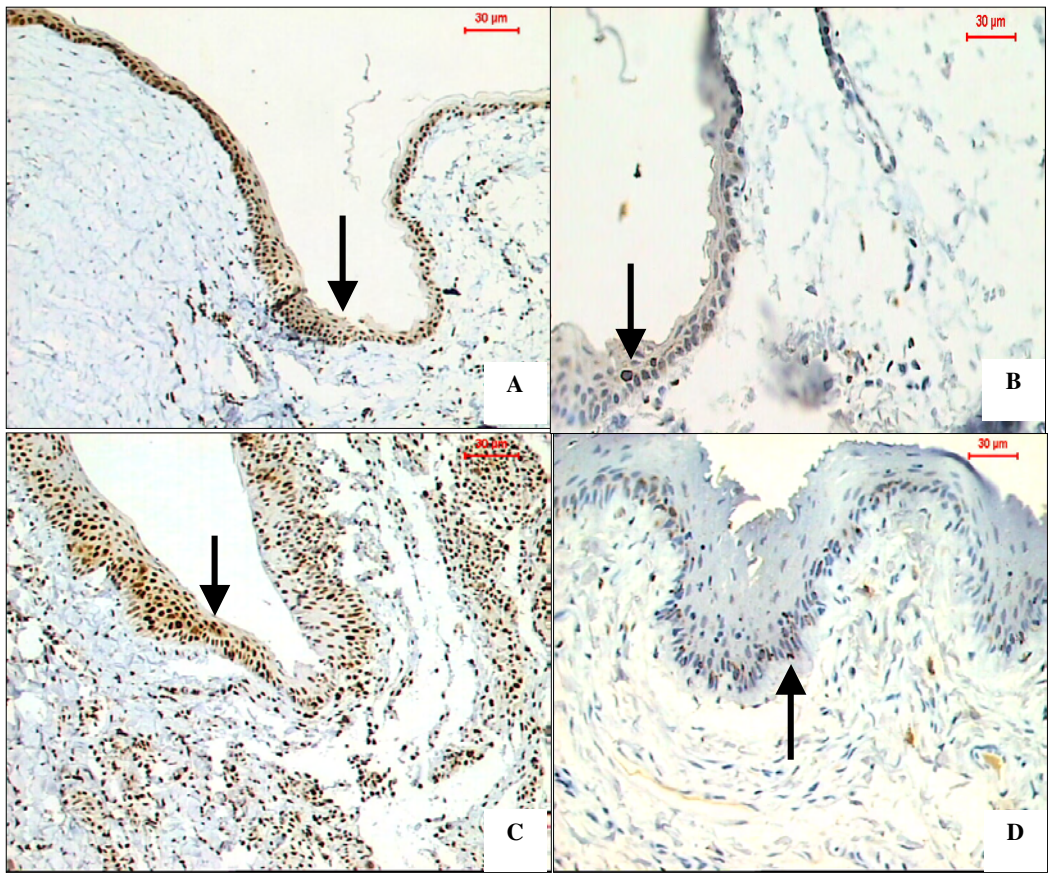


Figura 3. Fotomicrografia da região da córnea, limbo e conjuntiva de olhos de cães dos grupos GA e GB coradas pelas técnicas de imunohistoquímica para os marcadores nucleares PCNA e MIB-1. A: região de limbo de animal adulto (GA) marcada pelo PCNA; B: região de limbo de animal adulto (GA) marcada pelo MIB-1; C: região de limbo de animal jovem (GB) marcada pelo PCNA; D: região de limbo de animal jovem (GB) marcada pelo MIB-1.

Observa-se maior imunomarcção de células em proliferação pelo PCNA.

DISCUSSÃO

No homem, a exata localização das células tronco no homem já está bem estabelecida. Entretanto, não se encontram relatos quanto a este aspecto em medicina veterinária. Brunelli (2004) investigando experimentalmente a eficiência do transplante autólogo de limbo em cães com destruição total desta região ocular, concluiu que o mesmo foi eficiente em possibilitar a recuperação da transparência corneal dos olhos lesados. No mesmo sentido, os olhos dos cães doadores não apresentaram complicações, fornecendo evidências que o limbo seja a fonte doadora dessas células na superfície ocular. Com as particularidades anatômicas da córnea e limbo no cão, nem sempre é possível extrapolar, de forma segura, os resultados de pesquisas desenvolvidas no homem. Sendo assim, optou-se por estudar a exata localização deste tipo celular nos olhos de cães em diferentes idades. Para tanto, foram utilizados os marcadores de proliferação celular PCNA e MIB-1, ainda que a imunomarcação com anticorpo monoclonal AE5 fosse mais específica por marcar a citoqueratina K3 que são expressas pelas células-tronco (Kiritoshi *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2002; Meller *et al.*, 2002).

O presente estudo revelou a expressão do PCNA e do MIB-1 em células do tecido corneal em cães de diferentes idades, principalmente nas regiões do limbo e epitélio corneal. Gan *et al.* (1995), descreveram que a integridade corneal depende de uma constante reposição das células epiteliais. Qualquer injúria no tecido corneal provocará como resposta, um aumento na atividade proliferativa de células indiferenciadas da córnea, mas, que na dependência do estímulo,

diferenciar-se-ão em células epiteliais corneais. O PCNA, além de ser um marcador de células em proliferação também se constitui em um marcador de células em reparação. Nos olhos aqui estudados, observou-se um maior número de células marcadas pelo mesmo, no entanto, não se pode afirmar que todas as células marcadas estejam em proliferação e que, portanto, tratem-se de células-tronco. A sua utilização em estudos da córnea humana como marcador de *stem cell* e células transicionais, permitiu inferir que este é bom sinalizador de células em proliferação da superfície ocular. O mesmo pode-se sugerir no estudo ora descrito. Salienta-se, que a taxa de síntese de PCNA está diretamente correlacionada com a taxa de proliferação celular (Gan *et al.*, 1998), ou seja, quanto maior positividade da imunomarcção, maior o grau de proliferação celular. Embora não fosse objetivo deste estudo correlacionar tal aspecto, foi possível observar a presença de células mais ou menos marcadas em todas as regiões estudadas, independentemente do grupo avaliado.

Os resultados observados permitem sugerir que a região superior do limbo foi a que apresentou maior taxa de núcleos imunomarcados pelo PCNA e MIB-1, independente dos grupos estudados. Entretanto, também foram contadas células imunomarcadas na conjuntiva e na porção superior do epitélio corneal, em quantidades menores. O mesmo fora descrito por outros autores que utilizaram o PCNA na identificação de *stem cells* na superfície ocular do homem (Gan *et al.*, 1995).

Com esse estudo, evidenciou-se que, nos animais mais jovens (GA), a expressão dos marcadores nucleares (PCNA e MIB-1) foi maior do que a

observada nos animais adultos e mais velhos (GB). Isso sugere uma maior atividade de proliferação celular nos animais jovens, possivelmente em função da taxa do metabolismo mais acelerada.

CONCLUSÕES

Com base nas condições aqui adotadas, pode-se concluir que:

- A presença de células em proliferação imunomarcadas pelo PCNA e pelo MIB foi observada em diferentes tecidos da superfície ocular de cães, sendo os tecidos mais marcados o limbo e o epitélio da córnea;
- Cães mais jovens apresentam um maior contingente de células em proliferação na região do limbo e do epitélio corneal do que os cães observados em cães adultos;
- É provável que as células marcadas pelos imunomarcadores sejam células-tronco da superfície ocular de cães. No entanto, para tal comprovação, sugere-se a necessidade da utilização de anticorpos monoclonais espécie-específico como o AE5, ainda não disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNELLI, A, T., J. Transplante autógeno de células-tronco e do limbo esclerocorneal, simultaneamente, em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758).

Jaboticabal, 2004. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal

COOPER, D.; SCHERMER, A.; PRUSS, R.; SUN, T.T. The use of aIF, AE1 and AE3 monoclonal antibodies for the identification and classification of mammalian epithelial *keratins*. **Differentiation**, vol. 28, p. 30-5, 1984.

COTSARELIS, G.; CHENG, S.; DONG, G.; SUN, T.; LAVKER, R. M. Existence of Slow-Cycling Limbal Epithelial Basal Cells That Can Be Preferentially Stimulated to Proliferate: Implications on Epithelial Stem Cells. **Cell**, vol. 57, p. 201-09, 1989.

GAN, L.; SETTEN, G.; SEREGARD, S.; FAGERHOLM, P. Proliferating Cell Nuclear Antigen Colocalization With Corneal Epithelial Stem Cells and Involvement in Physiological Cell Turnover. **Acta Ophthalmol. Scand.**, vol. 73, p. 491-95, 1995.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; EKENBARK, S. Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Corneas Kept in Long Term Culture. **Acta Ophthalmol. Scand.**, vol. 76, p. 308-13, 1998.

GOMES, J. A. P. Efeito do hialuronato de sódio na migração e proliferação do epitélio de córnea humana. **2000. Dissertação (Doutorado). Universidade de São Paulo.**

HAN, B.; SCHWAB, I.R.; MADSEN, T.K.; ISSEROFF, R.R. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. **Cornea**, vol. 21, n.5, p. 505-10, 2002.

KIRITOSHI A., SUNDARRAJ N., THOFT R.A. Differentiation in culture limbal epithelium as defined by keratin expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 1991; 32(12): 3073-3077.

MELLER, D.; DABUL, V.; TSENG, S.C.G. Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. **Exp Eye Res**, vol. 74, p.537-45. 2002.

MOROI, S. E., GOKHALE, P. A., SCHTEINGART, M. T., SUGAR, A., DOWS, C. A., SHIMIZU, S., KRAFCHAK, C., FUSE, N., ELNER, S. G., ELNER, V. M., FLINT, A., EPSTEIN, S. G., BOENHKE, M., RICHARDS, J. E.

Clinicopathologic correlation and genetic analysis in a case of posterior polymorphous corneal dystrophy. **Am J of Ophthalmology**, vol. 135, n. 4, p. 461-70, 2003.

NETO, J. A. D.; MARTINS, A. C. P.; PASTORELLO, M. T.; TUCCI, Jr. S.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J. Expressão Imunohistoquímica do MIB-1 em Carcinoma de Células Transicionais de Bexiga. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 16, suppl.1, 2001.

RUIZ, C.M.; SOTO, G. M. T.; ZUCCARI, D. A. P. C. Estudo da Apoptose e da Proliferação Celular no Tumor Venéreo Transmissível Canino. **ARS Veterinária**, vol. 20, n.1, p. 107-14, 2004.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SLATTER, D. Desenvolvimento e anormalidades congênitas. In: Slatter D. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. 2. cap. P. 23-35

SCHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T. T. Differentiation related expression of a major 64k corneal keratin *in vivo* and culture suggests limbal location of corneal epithelial *stem cells*. **J Cell Biol**, vol. 103, n. 1, p.49-62, 1986.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 930 p.

ZHOU, J., BEGLEY, C.G., WRIGHT, A., WILSON, G., TOKARSKI, T. Characterization of cells collected from the normal human ocular surface by contact lens cytology. **Cornea**, vol.19, n.o 6, p.824-32. 2000.

ANEXOS

Anexo B – Fichas individuais dos 24 cães usados no estudo.**Grupo A: média de idade: 76,62 meses**

Número cão	Raça	Sexo	Peso aproximado (kg)	Idade aproximada (meses)
1	SRD	M	12	60
2	Poodle	F	3	120
3	Boxer	F	22	24
4	SRD	F	2	48
5	SRD	M	35	84
6	Lhasa Apso	M	5	48
7	SRD	M	8	72
8	Boxer	F	25	96
9	Dogue Alemão	M	50	36
10	SRD	F	5	144
11	Poodle	M	6	96
12	Poodle	M	3	60
13	Yorkshire	F	2	108

Grupo B: média de idade: 6,1 meses

Número cão	Raça	Sexo	Peso aproximado (kg)	Idade aproximada (meses)
1	SRD	M	2	9
2	Beagle	F	2	3
3	SRD	M	5	3
4	Rottweiler	M	15	11
5	Boxer	M	8	10
6	Pinscher	F	1	2
7	SRD	F	5	7
8	Pinscher	M	1	1
9	SRD	M	10	9
10	SRD	M	4	6
11	Teckel	F	3	6

Anexo C – Resultado da leitura dos cortes histológicos imunomarcados pelo PCNA e MIB-1.

Grupo A

Cão 1	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	++	+++	+++ epitélio	Epitélio córnea	82/100
MIB-1	+	++	+ epitélio	Limbo	11/100
Cão 2	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	93/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	23/100
Cão 3	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	++	+++	++	Limbo	65/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	54/100
Cão 4	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	+++	Epitélio córnea	93/100
MIB-1	+	+++	++	Limbo	68/100
Cão 5	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	87/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	13/100
Cão 6	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	79/100
MIB-1	+	+++	++	Limbo	44/100
Cão 7	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	92/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	56/100
Cão 8	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	++	+++	Epitélio córnea	88/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	31/100
Cão 9	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	++	+	Limbo	62/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	81/100
Cão 10	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	++	+	Limbo	38/100
MIB-1	+	++	++	Limbo	51/100
Cão 11	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	89/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	66/100
Cão 12	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	73/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	50/100
Cão 13	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	++	++	Limbo	59/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	18/100

Grupo B

Cão 1	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	++	+++	++ epitélio	Limbo	94/100
MIB-1	+	++	++ epitélio	Limbo	21/100
Cão 2	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	88/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	73/100
Cão 3	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	++	+++	Não visualizada	Limbo	84/100
MIB-1	+	++	Não visualizada	Limbo	39/100
Cão 4	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	Sem marcação	++	+	Limbo	37/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	16/100
Cão 5	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	++	+	Limbo	32/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	11/100
Cão 6	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	81/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	39/100
Cão 7	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	++	++	++	Limbo	72/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	19/100
Cão 8	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	63/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	27/100
Cão 9	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	++	+	Limbo	60/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	43/100
Cão 10	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	+	+++	++	Limbo	71/100
MIB-1	+	++	+	Limbo	28/100
Cão 11	Conjuntiva	Limbo	Córnea	Região mais Marcada	N° céls. Marcadas
PCNA	++	+++	++	Limbo	67/100
MIB-1	+	++	++	Limbo	16/100